Obsah

1. Souhrn v ČJ…….3
2. Souhrn v Aj (Summary)……..4
3. Úvod……5
4. Cíle práce…….9
5. Metodika……10
6. Výsledky……12
7. Diskuze a závěry……14
8. Literatura……17
9. Seznam publikací……21

1. Souhrn

Práce je zaměřena na roli NR1 podjednotky N-methyl-D-aspartátového receptoru v patofyziologii schizofrenie. Význam této podjednotky jsme studovali v animálním modelu, kde byly potkanům (kmene Wistar) do hipokampů aplikovány antisense oligodeoxynukleotidy (aODN) proti NR1, NR2A a NR2B podjednotkám (všechny kombinace). V chování jsme se zaměřili na změny v sensorimotorickém zpracování informací, hodnocené pomocí prepulzní inhibice úlekové reakce. Posléze jsme hodnotili exprese proteinů jednotlivých podjednotek a také exprese proteinů postsynaptické density (PSD-93, PSD-95). Výsledky našich experimentů ukázaly, že ani jedna z aplikovaných kombinací aODN nevyvolá významnou změnu prepulzní inhibice. Jedním z nejdůležitějších výsledků je statisticky významný pokles exprese PSD-95 ve skupinách s aplikací aNR2B a aNR2B.

Další část disertační práce je věnována post mortem studii, kde jsme hodnotili expresi panNR1 podjednotky a jejích sestřižených variant na úrovni mRNA a proteinu v hipokampech pacientů, kteří trpěli schizofrenií a v hipokampech kontrol. V expresi mRNA panNR1 se ukázalo, že rozdíly mezi levým a pravým hipokampem jsou významně větší u pacientů než u kontrol. Sestřižené varianty na úrovni mRNA ukázaly pokles dvou izoforem (NR1-2, NR1-4) u pacientů oproti kontrolám. Exprese proteinů panNR1 i varianty $NR1^{C1}$ vykázaly statisticky významnou interakci laterality a pohlaví. V levém hipokampu pacientů mužů byl významný pokles panNR1 oproti kontrolám.

Poslední část práce je zaměřená na význam regulátoru proteinové signalizace 4 (RGS4) v patofyziologii schizofrenie. Zde jsme v neuroblastomové buněčné linii hodnotili vliv snížené exprese genu RGS4 na expresní profil buněk. Výsledky ukázaly změnu exprese 67 genů, přičemž zde byly dvě funkční skupiny. Jedna byla tvořena geny pro histony a druhá geny pro transkripční faktory. Druhá skupina je však diskutabilní vzhledem k použité buněčné linii. Vztah snížené exprese RGS4 k neurotransmiterovým systémům tradičně spojovaným se schizofrenií jsme na genové úrovni nepotvrdili.

2. Summary

Our work is focused on the role of NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in pathophysiology of schizophrenia. In animal model using separately or in combination, antisense oligodeoxynucleotide (aODN) for NR1, NR2A and NR2B subunit of NMDAR, we affected expression of these proteins in rat hippocampus. We assessed prepulse inhibition of acoustic startle reaction (PPI) in rats and protein expression of NMDAR subunits and expression of PSD proteins. There were significant differences in expression of PSD-95 and NR1 between groups. Application of aODN (NR2A, NR2B) was associated with a significant decrease of PSD-95. PPI and expression of NR2A, NR2B and PSD-93 were not changed after aODN application.

The next part of the work concentrates on a human post mortem study. To assess actual changes in the expression of the NR1 subunit and its isoforms, we measured absolute differences in the levels of mRNA/protein for panNR1, as well as the individual mRNA/protein isoforms in the post mortem left/right hippocampus of patients with schizophrenia in comparison with non-psychiatric subjects. There were no significant differences in the panNR1 subunit mRNA expression, but the absolute left/right differences were much more pronounced in the patients with schizophrenia. The expression of splice variants in the mRNA level indicated decrease of the NR1-4b and NR1-2b isoform in the hippocampus of schizophrenic patients. Expression of NR1 and NR1 ^{C1} showed significant interactions of laterality and sex. Protein levels of the NR1 subunit in the left hippocampus in male schizophrenic patients were lower than controls.

The last part of the work is focused on the role of regulator of G protein signalization 4 (RGS4) in pathophysiology of schizophrenia. To elucidate this role of RGS4 we silenced RGS4 using siRNAs in human neuroblastoma cell lines and we studied the effects of differential RGS4 expression by microarray.

The cell lines with downregulated expression of RGS4 showed 67 genes with changed expression. We have detected two functional subgroups of genes which might be implicated in schizophrenia pathophysiology: histone genes and genes for transcription factors. The changes in TF expression observed in our experiment might be a side effect of the neuroblastoma cell line used. We did not detect changes in expression of any of the genes directly connect with neurotransmiter systems associated with schizophrenia.

3. Úvod

Schizofrenie je devastující psychické onemocnění postihující celosvětově zhruba 1 % populace. O schizofrenii je lépe uvažovat ne jako o jednotlivém onemocnění, ale jako o skupině syndromů, které se liší souborem znaků a symptomů (1) s odlišnou patogenezí. Klinicky je charakterizována pozitivními symptomy, negativními symptomy, příznaky dezorganizace a taktéž kognitivním deficitem (2). Jedná se o onemocnění s chronickým průběhem, vyznačující se významným funkčním postižením a zhoršenou kvalitou života. Přestože je dnes prognóza pacientů s psychotickými onemocněními daleko lepší než v dobách Kraepelina, stejně se asi dvě třetiny pacientů se schizofrenií nevrátí do stádia fungování, v jakém byli před nemocí (3). Schizofrenie má silnou genetickou komponentu, přičemž heritabilita, prokázaná na základě rodinných a dvojčecích studií, je ~ 0,8 (4). Není zde však jednotlivý gen, který by generoval silný účinek, a tak u schizofrenie hovoříme o polygenním základu. Kandidátní geny jsou rozdělovány dle různých kriterií. Lze například hovořit o genech, jež jsou uloženy na chromozomálních regionech dříve spojovaných se schizofrenií (5): Neuregulin 1 (NRG1); dystrobrevin vázající protein 1 (dysbindin); regulátor G-proteinové signalizace 4 (RGS4); aktivátor oxidázy D-aminokyselin (DAOA); gen pro fosfatidylinositol-5-fosfát-4-kinázu typu II-α (PIP4K2A). Motivací pro studium dalších genů byla farmakologická či biochemická asociace s nemocí - geny pro dopaminové receptory a protein kinázu B (AKT1). Taktéž byl ukázán epistatický vztah s funkčním polymorfismem catechol-O-methyltransferázy (COMT), který je jedním z enzymů degradujících katecholaminy. Dalším kriteriem pro zařazení mezi kandidátní geny mohou být strukturální změny na chromosomech. Zde je typickým zástupcem gen pro „Disrupted in schizophrenia 1“ (DISC1).

Genetická etiologie schizofrenie je široce akceptovaným konceptem, nicméně enviromentální faktory jsou pro vyvolání nemoci nezbytné (6). Existuje široká škála nepříznivých událostí, hlavně během časného vývoje, které byly asociovány se zvýšením rizika rozvoje schizofrenie (7), velikost účinku asociovaná s těmito prenatálními rizikovými faktory je obvykle malá, což indikuje, že pravděpodobně nejsou samostatnými kauzálními agens.

Dopaminergní systém byl zhruba padesát předešlých let v rámci hypotéz schizofrenie dominantní cestou, kterou se ubíral výzkum tohoto onemocnění. Schopnost antipsychotik blokovat dopaminové receptory (D2 receptor) koreluje lépe než ostatní biochemické účinky s jejich působením na psychotické symptomy (8). Dopaminergní hypotéza tedy vychází z předpokladu, že schizofrenie je spojena se zvýšenou aktivitou neurotransmiteru dopaminu v CNS, a že neuroleptika tedy tuto aktivitu redukují. Nicméně tato hypotéza má své limity, ukazuje se, že současně koexistují kortikální hypodopaminergie a subkortikální hyperdopaminergie, přičemž mechanismy, které jsou podkladem těchto dopaminergních abnormalit, nejsou detailně známy.

Serotoninové receptory díky vlivu na neurotransmitery, integritu synapsí a plasticitu neuronů hrají roli v psychóze, kognici a také náladě (9). Kyselina γ-aminomáselná (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS, změny v GABAergní neurotransmisi jsou u schizofrenie opakovaně popisovány (10). V posledních zhruba dvaceti letech se pozornost obrátila k dysfunkcím spojeným s glutamatergním systémem v mozku (11). Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS, obecně rozšířený jak v kortexu, tak subkortikálně, a tedy přináší pohled na schizofrenii jakožto na poruchu přenosu informací, která se děje napříč mozkem. Poruchy glutamatergního systému také dokáží vysvětlit negativní a kognitivní symptomy. V minulých letech byly opakovaně popsány specifické funkční poruchy glutamaterních receptorů spojené s etiologií schizofrenie (12). Glutamaterní hypotéza se opírá o tvrzení, že hypofunkce tohoto neurotransmiteru v kortiko-striatální projekci vyvolává facilitaci thalamo-kortikálního okruhu, produkující nárůst sensorických vstupů. Dalším pozorovaným fenoménem je pokles poměru signál/šum a nárůst dopaminergního vstupu díky desinhibici ve ventrální tegmentální aree v mesencefalu (13). Jinou možností je generalizovaná desinhibice v kortexu vygenerovaná nesprávným fungováním NMDA receptorů v GABAergních interneuronech (14). Disociativní anestetika, jako ketamin nebo fencyklidin (PCP), způsobují psychóze podobné chování u dospělých jedinců (15).

1) Animální model - blokáda NMDA receptoru

Na základě dříve publikovaných prací týkajících se genetického a farmakologického ovlivnění NMDA receptoru v animálních modelech schizofrenie (viz.15-17) jsme se rozhodli použít antisense oligodeoxynukleotidy k potlačení exprese podjednotek NMDA receptoru s cílem ověřit vztahy expresí podjednotek tohoto receptoru a expresí proteinů postsynaptické density. PSD (PSD-95, PSD-93) jsou součástí proteinové postsynaptické sítě a patří do rodiny proteinů, které mají PDZ doménu vážící se k NMDA receptorům. Tyto proteiny jsou esenciálními propojeními mezi extracelulární synaptickou signalizací a patřičnými intracelulárními signálními drahami (18). Pro vytvoření genetického modelu jsme zvolili antisense oligodeoxynukleotidy, což jsou krátké jedno řetězcové úseky DNA komplementární k vybrané sekvenci. Díky sekvenčně specifické hybridizaci vytvářejí duplexy, které jsou následně degradovány RNasami. Dále jsme se zabývali vlivem potlačení exprese podjednotek NMDA receptoru na prepulzní inhibici akustické úlekové reakce, která hodnotí sensorimotorické zpracování informací. Jedná se o schopnost rozlišit a dát patřičnou významnost pouze určitým, důležitým podnětům z prostředí. Hodnocení sensorimotorického „gaitingu“ patří k nejpoužívanějším fyziologickým markérům v laboratořích studujících schizofrenii, a to jak u nemocných tak v modelech nemoci.

2) Studie post mortem

Hipokampus je oblastí, která je významně zapojena v patofyziologii schizofrenie, byly zde u pacientů nalezeny strukturní, funkční a biochemické změny (19). Dříve publikované práce studující v lidském hipokampu post mortem expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru nalezly na úrovni mRNA pokles exprese (20), nebo pouze levostranný pokles (21), popřípadě nenašly změnu v expresi mRNA (22). U exprese NR1 proteinu pak bylo dříve opakovaně popsáno, že není změněna (např.23). V levém hipokampu pak byla in vivo popsaná snížená vazba NMDA receptoru u pacientů se schizofrenií, kteří dosud nebyli medikováni antipsychotiky (24). Dvě zmíněné práce tedy ukazují na potřebu studovat změny exprese v mozcích pacientů s ohledem na faktor laterality. Dřívější práce ukázaly u potkanů na estrogeny jakožto na látky, které ovlivňují expresi a aktivitní změny NMDA receptorů (např.25). U schizofrenie se hovoří o estrogenové hypotéze, která říká, že estrogeny jsou protektivním faktorem, který oddaluje nebo dokonce chrání před nástupem tohoto

onemocnění ženy v reproduktivním období. Tuto teorii potvrdila práce, kde se hodnotilo množství estradiolu u žen, které trpěly psychózou, a porovnávalo s hodnotami u pacientek s jinými psychiatrickými diagnózami a u zdravých kontrol. Ukázalo se, že pacientky s psychózou měly zdaleka nejnižší hodnoty (26). Jelikož hipokampus je estrogen senzitivní strukturou, pohlavní srovnání exprese NMDA receptorů je tedy zajímavé. Dále se ukazuje, že zahrnutí všech sestřižených variant při hodnocení exprese NR1 podjednotky může přinášet příliš hrubý pohled, jelikož jednotlivé sestřižené varianty ovlivňují různým způsobem funkci NMDA kanálu. Proto předpokládáme, že k ovlivnění fungování NMDA receptoru u schizofrenie nemusí být nutná expresní změna pan formy NR1, ale může být dostatečná změna v poměrech exprese jednotlivých sestřižených variant NR1. V naší práci jsme v lidském hipokampu hodnotili expresi NR1 podjednotky a jejích sestřižených variant a to jednak na úrovni proteinu, a také na úrovni mRNA. V rámci hodnocení exprese jsme se zaměřili také na dva další parametry, které nejsou v této oblasti příliš prostudovány, nicméně mohou hrát významnou roli, a to je lateralita a vliv pohlaví.

3) RGS4 „silencing“ –buněčná linie

Gen pro regulátor G proteinové signalizace 4 (RGS4) byl dříve popsán ve vztahu ke schizofrenií (27). Snížená exprese tohoto genu byla opakovaně nalezena v různých strukturách mozku post mortem u pacientů se schizofrenií (28). Dále pak bylo ukázáno, že změny exprese RGS4 jsou specifické, jelikož u dalších RGS významné změny nalezeny nebyly (27). Ve farmakologickém modelu používajícím antagonistu NMDA receptoru - PCP bylo ukázáno na funkční souvislost mezi RGS4, 5-HT_{1A} a NMDA signalizací v neuronech PFC (29). Tato práce ukázala, že jednou z funkcí RGS4, která může vysvětlovat jeho roli v patofyziologii schizofrenie, je spojení s 5-HT_{1A} receptory, přičemž vztah serotoninového 5-HT_{1A} receptoru k inhibici funkce NMDA kanálu je znám již déle (30). Při použití amfetaminu v animálním modelu bylo ukázáno, že hladiny mRNA i proteinu RGS4 jsou pod kontrolou dopaminergních receptorů D_1 a D_2 (31). Nicméně vztah snížené exprese RGS4 ke zmíněným, ale i dalším biochemickým drahám, které jsou u schizofrenie poškozeny, není blíže znám. V následující práci nás proto zajímal vliv snížené exprese genu pro RGS4 na exprese genů pro aktéry serotoninové, dopaminové a v neposlední řadě glutamátové neurotransmise. V neuronální buněčné linii jsme nejprve potlačili expresi RGS4, a následně jsme hodnotili celogenomovou expresi.

4. Cíle práce

Ad 1) Našim cílem bylo zhodnotit v animálním modelu, založeném na aplikaci antisense oligonukleotidů (anti- NR1/2A/2B podjednotka) do obou hipokampů dospělého potkana prepulzní inhibici akustické úlekové reakce. Dále jsme stanovovali exprese proteinů patřičných podjednotek a také proteinů postsynaptické density.

Ad 2) V tomto kroku jsme v lidských post mortem hipokampech pacientů se schizofrenií a nepsychiatrických kontrol hodnotili expresi panNR1 podjednotky NMDA receptoru a jejích sestřižených variant na úrovni proteinu a mRNA.

Ad 3) Zajímal nás vliv snížené exprese RGS4 na expresi dalších genů. Pomocí siRNA jsme provedli silencing exprese mRNA pro RGS4 protein v neuronální buněčné lini, tuto sníženou expresi jsme ověřili, a následně pak pomocí microarray zhodnotili expresi ostatních genů.

5. Metodika

1) Animální model - blokáda NMDA receptoru

Pozorování byla prováděna na dospělých potkaních samcích kmene Wistar (BioTest Konárovice) o hmotnosti 250-270 g.

Aplikace do ventrálních částí obou hipokampů - vehikulum (fyziologický roztok), aODN/sODN - jsme prováděli rychlostí 1,0 µL/min pomocí Hamiltonovy stříkačky v thiopentalové anestézii, kterou jsme dle potřeby potencovali přidáním xylazinu. Dávka aODN/sODN nebo Phys činila: u skupiny A 1x nebo u skupiny B 2x 5 nmol/ 2,5 µL do každého z hipokampů. Rozdělení do skupin dle aplikace A viz (Vrajová et al., 2007) B viz (Vrajová et al., 2011). Pro odběr mozkové tkáně byli potkani anestezováni éterovými výpary a dekapitováni. Z rychle vybavených mozků jsme mikrochirurgicky vyřízli oba hipokampy. Kontrola přesnosti aplikačního vpichu byla prováděna mikroskopicky, hipokampy, kde nebyl vpich nalezen, jsme z dalších hodnocení vyřadili.

20 hodin po aplikaci byla zvířata přenesena do místnosti, kde byla po adaptační periodě měřena akustická úleková reakce (ASR) a její prepulzní inhibice (PPI). Reakce potkanů na zvukové podněty byla měřena pomocí zařízení SR-LAB (San Diego Instruments, USA). Principem je hodnocení velikosti úlekové reakce na neočekávaný podnět (zde akustický), přičemž úlek je měřen jako velikost motorické odpovědi – pohyb celého těla potkana (měřeno akcelerometrem). Slabý předpodnět (lehce nadprahový), který předchází v těsné časové blízkosti (milisekundy) inhibuje úlekovou reakci na vlastní podnět. Časový sled a intenzita předpodnětů (prepulsů, PP) v rámci vlastního experimentu byly uspořádány podle (32).

Hipokampy byly homogenizovány v 1 ml vychlazeného lyzačního pufru, z homogenátu byla získána P2 frakce. Koncentrace proteinů byla hodnocena pomocí Bredfordovy metody za použití hovězího sérového albumínu jakožto standardu (BioRad, USA). Po elektroforetickém rozdělení proteinů (BioRad, USA) byly proteiny elektroblotem přeneseny na nitrocelulózovou membránu (BioRad, USA). Po zablokování nespecifických vazeb byly membrány inkubovány s primárními protilátkami viz. (Vrajová et al., 2011). Po odmytí přebytů protilátek v PBS pufru byly membrány inkubovány v sekundárních protilátkách konjugovaných s křenovou peroxidázou (Dako, Dánsko). Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu (Pierce, USA) a hodnocena na GelDoc analyzačním systému (BioRad, USA).

2) Studie post mortem

Post mortem tkáň byla získána od jedinců s diagnózou schizofrenie (MKN-10) a od starších zemřelých kontrolnch osob. Na základě dokumentace byla ověřena diagnóza dle DSM-IV. Většina pacientů trpěla chronickou nebo residuální formou nemoci, v souboru nemocných byla skupina pacientů, kteří neměli antipsychotickou medikaci přibližně 2 měsíce před smrtí (Vrajová et al., 2010). Kontrolní skupina byla složena z jedinců, kteří neměli žádnou neuropsychiatrickou historii a získáni byli z PL Bohnice (LDN). Mezi skupinami nebyly signifikantní rozdíly ve věku ani v post mortem intervalu (PMI) (Vrajová et al., 2010). Délka skladování tkání při -78 °C před vlastním hodnocením se u skupin nelišila. Taktéž jsme zabránili opakovanému rozmražování a zamražování, aby nedocházelo k rozkladu tkáně. Veškeré experimenty byly prováděny v souladu s Helsinskou deklarací a taktéž se souhlasem etické komise Psychiatrického centra Praha.

Pro polymerázovou řetězovou reakci (panNR1) byla ze zamražené tkáně izolována RNA za pomoci TriZol (Invitrogen, USA); cDNA byla připravena pomocí Reverse-IT Blend kitu (Abgene, UK). Na základě našich testování byl vybrán β_2 – *mikroglobulin* jako nejvhodnější referenční gen pro testování v lidském hipokampu, jelikož vykázal největší stabilitu napříč testovanými vzorky. Detailní popis viz (Vrajová et al., 2010).

Izolace mRNA pro polymerázovou řetězovou reakci (sestřižených variant NR1) ze zmaražené tkáně byla provedena pomocí mRNA Direc Kitu (Chemagen, Německo). Na základě publikované cDNA sekvence *GRINI* lidského genu pro NR1 podjednotku (NCBI access numbers: NM_021569.1, NM_007327.1, NM_000832.4) byly pomocí programu Primer3 navrženy čtyři primery (STR1-4) pro reverzní transkribci. Ve všech reverzně transkribčních reakcích byl také zahrnut primer pro β-aktin. Pomocí softvéru Primer Express 2.0 byly sestaveny dva sety primery-sonda. První set detekoval exon 19, přítomný u všech sestřižených variant *GRINI genu*. Druhý set primery-sonda detegoval exon 4 *GRINI genu*, a tedy odhaloval přítomnost/nepřítomnost tohoto exonu v jednotlivých sestřižených variantách. Sekvence a lokalizace primerů viz (Vrajová et al., 2010).

Western blot panNR1, sestřižené varianty NR1 - metodika viz. 1) .

Membrány byly inkubovány také v primárních protilátkách pro sestřižené varianty NR1 anti- $NR1^{C2}$, anti-$NR1^{C2'}$, anti-$NR1^{C1}$, anti-$NR1^{N}$ (1:100, Chemikon, USA).

3) RGS4 „silencing“ –buněčná linie

Byly použity primární neuronální buňky z American Type Culture Collection (ATCC; CRL-10442 a CRL-10742). Kultivace těchto buněk byla opakovaně neúspěšná (předčasná senescence), proto jsme pro naše experimenty zvolili imortalizovanou neuronální buněčnou linii. Jako model byla tedy použita neuroblastomová linie BE (2) – C (ATCC; CRL-2268). K silencingu lidského genu pro RGS4 jsme navrhli čtyři různé siRNA, které překrývaly různé části kódující sekvence RGS4. Pro stabilní silencing jsme použili retrovirový vektor pSilencer 5.1-H1 Retro (Ambion, UK). Verifikace všech siRNA Retro konstruktů připravených pro transfekci byla provedena pomocí sekvenování. Kontrola pozadí, transfekce a kultivace buněk viz. (Vrajová et al., 2011). Připravili jsme jedenáct stabilních buněčných linií exprimujících rozdílná množství siRNA proti lidskému RGS4. Expresi RGS4 jsme hodnotili pomocí kvantitativní Real-Time PCR, kde jsme jako kontrolní gen použili β_2 mikroglobulín.

Efekt rozdílné exprese RGS4 v modelové buněčné lini BE (2)-C jsme hodnotili pomocí GeneChip® Human Exon 1.0 ST array (Affymetrix, USA). Následující analýzy dat a detekce odlišně exprimovaných genů byly získány pomocí Bioconductor and R project software (http://www.bioconductor.org, http://www.r-project.org). Detail metodiky viz (Vrajová et al., 2011).

6.Výsledky

1) Animální model - blokáda NMDA receptoru

Při použití samostatných aplikací aODN (aNR1) nebo sODN (sNR1) a KONT se ukázalo snížení reflexní motorické odpovědi na silný akustický signál oproti skupině naivních (INT) zvířat, avšak toto snížení nebylo signifikantní, stejně tak byly nevýznamné změny v PPI (viz Vrajová et al., 2007). Exprese NR1 vykázala statisticky významný pokles v pravém hipokampu potkanů ovlivněných aODN oproti kontrolní skupině (KONT).

Velikost reflexní motorické odpovědi na silný akustický signál nebyla změněna u experimentálních skupin s dvojitou aplikací oproti skupině kontrolní. Rovněž hodnocení sensorimotorického gatingu založené na měření PPI

neprokázalo, že by některá z kombinací látek použitých pro intrahipokampální infuze ovlivňovala u mladých dospělých potkanů velikost PPI, což odpovídá našim předběžným výsledkům. Nejvýraznějším výsledkem je statisticky významná odlišnost exprese PSD-95 mezi jednotlivými aplikačními skupinami. Významný pokles exprese PSD-95 byl ve skupině aNR2A/Phys oproti kontrole a stejně tak ve skupině aNR2B/Phys. Exprese NR1 podjednotky ukázala významný rozdíl mezi jednotlivými aplikacemi. K nejvýraznějšímu poklesu exprese NR1 oproti kontrole došlo ve skupině aNR2A/aNR2B o 14 %. Zatímco samotná aplikace aNR1 vykázala pokles pouze o 7 % viz (Vrajová et al., 2011).

2) Studie post mortem

Pro zhodnocení vztahu exprese mRNA panNR1, mRNA sestřižených variant, proteinu panNR1 a $NR1^{C2}$ sestřižené varianty s PMI a věkem, byl použit Spearmanův korelační koeficient, nenašli jsme signifikantní rozdíly.

Relativní kvantifikace panNR1 na úrovni mRNA neukázala žádný signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů se schizofrenií. Avšak absolutní rozdíl exprese mRNA panNR1 v levém a pravém hipokampu byl u pacientů se schizofrenií signifikantně větší

Relativní kvantifikace sestřižených variant NR1 na úrovni mRNA ukázala, že N1 kazeta byla exprimována ve všech vzorcích mimo tří autopsií od pacientů a jedné kontrolní. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na C koncové domény. Oddělené analýzy levého a pravého hipokampu ukázaly signifikantní levostrannou interakci mezi faktorem sestřižené varianty a diagnózy. Post-hoc analýza ukázala na signifikantní pokles sestřižené varianty NR1-4 v levém a NR1-2 v pravém hipokampu pacientů se schizofrenií oproti kontrolní skupině.

Kvantifikace panNR1 na úrovni proteinu vykázala významné pohlavní rozdíly – statisticky významnou interakci laterality a pohlaví, taktéž interakce pohlaví a diagnózy byla statisticky signifikantní. Rozdíly laterality mezi skupinou žen a mužů byly více vyjádřeny ve skupině pacientů se schizofrenií než u kontrol. Statisticky významný pokles byl v expresi panNR1 v levém hipokampu mužů (schizofrenie vs. kontrola). Protein sestřižené varianty $NR1^{C2}$ ukázal statisticky významnou interakci laterality a pohlaví.

3) RGS4 „silencing" –buněčná linie

Získali jsme jedenáct linií, které vykazovali odlišné hladiny genové exprese RGS4 v intervalu od 3,1 % do 123 % vztaženo k parentální buněčné linii. Dvě

linie, které vykazovali minimální změnu oproti parentální linii, byly použity jako pozadí. U buněčných linií se sníženou expresí RGS4 jsme nalezli 67 odlišně exprimovaných genů, 30 genů mělo zvýšenou expresi a 37 sníženou expresi v porovnání s parentální buněčnou linií. Ke klastrování jsme použili databázi DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (33). Nalezli jsme dvě funkční skupiny genů, přičemž jednu skupinu tvořily geny pro histony, v druhé skupině byly geny pro transkripční faktory. Ostatní odlišně exprimované geny tvořily heterogenní skupinu, která zahrnovala mimo jiné geny, jež byly dříve popsány v souvislosti se schizofrenií.

7. Diskuze a závěry

1) Animální model - blokáda NMDA receptoru

V animálním modelu jsme nepotvrdili vliv krátkodobého nebo dlouhodobého hipokampálního ovlivnění podjednotek NMDA receptoru (NR1, NR2A, NR2B) na sensorimotorický gaiting (PPI). Náš výsledek neodpovídá dříve publikované práci (16), kde zjistili po jednorázové aplikaci aODN (anti-NR1), avšak do šesti míst v hipokampu, narušení PPI. Při použití této metody však dosáhli snížení exprese NR1 až o 30%, v našem případě se jednalo o pokles o 20 % při samostatné blokádě NR1 a o 14% ve skupině s aplikací aNR2A/aNR2B. Nicméně jsme ukázali, že současné ovlivnění podjednotek NR2A a NR2B vyvolá významné snížení exprese proteinu postsynaptické density (PSD- 95), ačkoliv exprese proteinů podjednotek významně změněna nebyla. Tato skutečnost přináší informaci o vztahu exprese proteinů NR2 podjednotek a PSD-95. Náš výsledek odpovídá situaci, která byla popsána v oblasti předního cingularního kortexu u pacientů se schizofrenií, kde byla snížená exprese PSD-95 doprovázena nezměněnou expresí NR2B (34). V našich výsledcích, se mezi skupinami nelišila významně exprese NR2A podjednotky, v post-hoc analýze byl ve skupině s aplikací aNR2A pokles tohoto proteinu oproti kontrole u skupiny aNR2B a exprese NR2B se změna neprojevila. Náš výsledek odpovídá tomu, co bylo publikováno (35). Zmíněná práce popsala in vitro, že přemísťování NR2A ze synaptické membrány vyvolá kompenzační zvýšení NR2B podjednotky v membráně.

2) Studie post mortem

Výsledky post mortem studie ukazují v expresi panNR1 mRNA i v proteinu na význam biochemické laterality u schizofrenie. Lateralita byla výraznější u pacientů se schizofrenií oproti kontrolnímu souboru. Dále pak byl významný nález poklesu exprese proteinu panNR1 v levém hipokampu pacientů mužů, což je ve shodě s publikovanými daty (21). Ve zmíněné práci měli smíšenou skupinu v níž převažovali muži, a navíc hipokampy nebyly v párech, tedy levý a pravý od téhož pacienta. Práce která hodnotila pohlavní rozdíly v expresi NR1 podjednotky v míše po aplikaci NMDA antagonisty u mláďat potkana ukázala na větší množství NR1 pozitivních buněk u samic než u samců (36). Na základě této práce bychom mohli spekulovat, že muži jsou na poškození NR1 podjednotky citlivější a že tato citlivost se uplatňuje již velice brzo během vývoje a tudíž nemusí souviset s hormonální odlišností pohlaví. Tento výsledek přináší informaci o potřebě hodnotit biochemii mozku jednak s ohledem na lateralitu, a také s ohledem na pohlaví. Jako první jsme ukázali na změny exprese mRNA C-koncových sestřižených variant NR1 v hipokampu pacientů se schizofrenií. A to konkrétně na snížení exprese varianty NR1-4 v levém a NR1-2 v pravém hipokampu, dále pak na zvýšenou expresi variant obsahujících C1 kazetu (NR1-1, NR1-3) u pacientů. Tyto výsledky přináší podrobnější vysvětlení změn v expresi NR1 podjednotky v hipokampu pacientů se schizofrenií. Nicméně stále nejasným zůstává vliv antipsychotické medikace na expresi NR1, což je výrazným limitujícím faktorem post mortem studií tohoto typu, jelikož pacienti jsou medikováni po různě dlouhou dobu různými typy antipsychotik.

3) RGS4 „silencing“ –buněčná linie

Vliv snížené exprese genu pro RGS4 na expresi genů neurotransmiterových drah, jejichž dysfunkce jsou podkladem patofyziologie schizofrenie, jsme nepotvrdili. V neuroblastomové lini se sníženou expresí RGS4 jsme nalezli významnou změnu v expresi 67 genů. V této skupině byly geny pro histony, jejichž změněné exprese lze spojit s epigenetickými mechanismy popisovanými u schizofrenie. Další geny se změněným expresním profilem pak patří k transkripčním faktorům. Tato skupina je diskutabilní vzhledem k použité buněčné linii, avšak tyto geny ukazují na možný vztah exprese RGS4 a early immediate gene (IEG). Poslední skupina genů se změněnou expresí byla heterogenní. Nadexprimován byl gen pro metallothionein (MT2A), mezi jehož

funkce patří neuroregenerace a neuroprotekce. Dále se zde vyskytly další geny pro G-proteiny vázající receptory a také dva geny, kódující proteiny vázající vápník. Jeden z nalezených genů pak patří do glutamatergní dráhy. Naše výsledky na úrovni genů ukazují na možné vztahy snížené exprese RGS4 s dalšími drahami. U pacientů se schizofrenií bylo post mortem nalezeno zvýšení exprese metabotropního glutamatového receptoru skupiny I (mGluR1) a zároveň snížení exprese RGS4 (37). Vyšší aktivita mGluR1 pak může fungovat jako kompenzační mechanismus NMDA hypofunkce u schizofrenie (37). Z našich výsledků však vyplývá, že snížení exprese RGS4 pravděpodobně není příčinou změny exprese mGluR1 receptorů. Sníženou expresi RGS4 lze na základě našich výsledků považovat spíše za následek předcházejících biochemických změn spojených s průběhem nemoci.

9. Literatura

(1) Bleuer E. Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. Leipzing und Wien: Deuticke F. 1911.

(2) Andersen NC, Paradiso S, O´Leary DS. „Cognitive dysmetria“ as an integrative theory of schizophreni: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuity? Schizophr Bull 1998; 24(5): 203-218.

(3) Addington J, Leriger E, Addington D. Symptom outcome 1 year after admission to an early psychosis program. Can J Psychiatry. 2003; 48:204–207.

(4) Merikangas KR, Risch N. Will genomics revolution revolutionize psychiatry? Am J Psychiatry 2003;160. 625 – 635.

(5) Schwab SG, Wildenauer DB. Update on key previously proposed candidate genes for schizophrenia. Curr Opin Psychiatry 2009; 22: 147-153.

(6) Gottesman I, Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness, WH Freeman, New York, 1991.

(7) Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopement. Annu Rev Neurosci 2002; 25: 409-32.

(8) Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, et al. Drugs, neurotransmitters and schizophrenia, Science 1974; 184: 1243–53.

(9) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The Biochemical Basis of Neuropharmacology 8th Edition. Oxford: Oxford University Press. 2003.

(10) Reynolds GP, Beasley CL. GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex-development and deficits in schizophrenia. J Chem Neuroanat 2001; 22(1-2): 95-100.

(11) Kantrowitz JT, Javitt DC. Thinking glutamaergically: Changing concepts of schizophrenia based upon changing neurochemical models. Clin Schizophr Relat Psychoses 2010; 4: 189-200.

(12) Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmuller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. Neurosci Lett 1980; 20: 379-382.

(13) Lang UE, Puls I, Muller DJ, Struz-Seebohm N, Galliant J. Molecular mechanisms of schizophrenia. Cell. Phisiol. Biochem. 2007; 20: 687-702.

(14) Stahl SM. The genetics of schizophrenia converge upon the NMDA glutamate receptor. CNS Spectr. 2007;12: 583–588.

(15) Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. AMA Arch. Neurol. Psychiatry 1959; 81: 363–369.

(16) Inada K, Ishigooka J, Anzai T, Suzuki E, Miyaoka H, Saji M. Antisense hippocampal knockdown of NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. Neuroscience research 2003; 45: 473-481.

(17) Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptore expression display behaviors related to schizophrenia. Cell 1999; 98: 427-436.

(18) Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. Nat. Rev. Neurosci 2004; 5: 771– 781.

(19) Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: Neurobiology. Schizophrenia Research 2008; 106: 89–107.

(20) Gao X-M, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA. Ionotropic glutamate receptors and expression of *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. Am J Psychiatry 2000; 157:1141-1149.

(21) Law AJ, Deakin JFW. Asymetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. NeuroReport 2001; 12:2971-2974

(22) McCullumsmith R, Kristiansen LV, Beneyoto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff JH. Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder.Brain Res 2006;1: 108-118.

(23) Toro C, Deakin JF. NMDA receptor subunit NR1 and postsynaptic protein PSD-95 in hippocampus and orbitofrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. Schizophrenia Res 2005; 80: 323-330.

(24) Pilowsky LS, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medicationfree schizophrenic patients. Mol. Psychiatry 2006;11: 118–119.

(25) Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS et al. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. J Neurosci 1997; 17:1848–1859.

(26) Huber TJ, Borsutzky M, Schneider U et al. Psychotic gonadal function: evidence supporting the oestrogen hypothesis. Acta Psychiatr Scand 2004; 109:269–274.

(27) Mirnics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P. Disease-specific changes in regulator of G-protein signalling4 (RGS4) expression in schizophrenia. Molecular Psychiatry. 2001; 6: 293–301.

(28) Bowden NA, Scott RJ, Tooney PA. Altered expression of regulator of G-protein signalling 4 (RGS4) mRNA in the superior temporal gyrus in schizophrenia. Schizophr Res. 2007; 89: 165–168.

(29) Gu Z, Jiang Q, Yan Z. RGS4 modulates serotonin signaling in prefrontal cortex and links to serotonin dysfunction in a rat model of schizophrenia . Mol Pharmacol. 2007; 71(4): 1030–1039.

(30) Yuen EY, Jiang Q, Chen P, Gu Z, Feng J, and Yan Z Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. J Neurosci 2005; 25:5488–5501.

(31) Schwendt M, Gold SJ, McGinty JF. Acute amphetamine down-regulates RGS4 mRNA and protein expression in rat forebrain: distinct roles of D1 and D2 dopamine receptors. J Neurochem. 2006; 96: 1606–1615.

(32) Ellenbroek BA, Cools A. Early maternal deprivations and prepulse inhibition: the role of postdeprivation environment. Pharmacol Biochem Behav 2002; 73: 177-184.

(33) Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protoc 2009; 4(1):44-57.

(34) Kristiansen LV, Patel SA, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Expression of the NR2B-NMDA receptor subunit and its Tbr-1/CINAP

(35)Bard L, Sainols M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat Ch, Stephenson FA, Imperiali B, Choquet D, Groc L. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2A-NMDA receptor and PDZ proteins. PNAS 2010; 45: 19561-19566.

(36)Schlenker EH, Hansen SN. Comparison of NMDA modulation of breathing and NR1 expression in medullary nuclei of weanling male and female rats. Respir Physiol Neurobiol 2007; 155: 203-212.

(37)Volk DW, Eggan SM, Lewis DA. Alterations in metabotropic glutamate receptor 1α and regulator of G protein signaling 4 in the prefrontal cortex in schizophrenia. Am J Psychiatry 2010; 167: 1489-1498.

10. Seznam publikací

1) publikace vztahující se k tématu disertace

Vrajová M, Peková S., Horáček J, Höschl C. The effects of siRNA-mediated RGS4 gene silencing on the whole genome transcription profile: implications for schizophrenia. Neuroendocrinol Lett 2011; 32(3): 246-252. **(IF 1.6)**

Vrajová M, Šťastný F, Horáček J, Lochman J, Šerý O, Peková S, Klaschka J, Höschl C. Expression of the hippocampal NMDA receptor GluN1 subunit and its splicing isoforms in schizophrenia:
Postmortem study. Neurochem Res 2010; 35:994 – 1002. **(IF 2.6)**

Bubeníková-Valešová V, Horáček J, **Vrajová M,** Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. Neurosci Biobehav Rev. 2008; 32: 1014-1023. **(IF 7.8)**

Vrajová M, Klaschka J, Tejkalová H, Bubeníková-Valešová V. Vliv hipokampální aplikace NR1/NR2 antisense oligodeoxynukleotidů na expresi proteinů postsynaptické density a na prepulzní inhibici. Psychiatrie 2011; suppl. 2: 11-14.

Vrajová M, Horáček J, Klaschka J. Exprese $GluN1^{C2}$ podjednotky NMDA receptoru v hipokampu pacientů trpících schizofrenií – studie post mortem. Psychiatrie 2010 suppl. 2: 10-11.

Vrajová M, Tejkalová H, Šťastný F. Exprese NR1 podjednotky NMDA receptoru v hipokampu dospělého potkana po aplikaci antisenseNR1/NR2 oligodeoxynukleotidů. Psychiatrie 2009;
suppl . 2: 45.

Vrajová M, Tejkalová H, Klaschka J, Šťastný F. Ovlivňují anti-NR2A/ anti-NR2B oligodeoxynukleotidy hipokampální expresi proteinu NR1 podjednotky NMDA receptoru u dospělého potkana- pilotní studie. Psychiatrie 2008; suppl. 3: 81-83.

Vrajová M, Tejkalová H, Klaschka J, Šťastný F. Snížená exprese proteinu NR1 podjednotky po antisense oligodeoxynukleotidu NMDA-R1 neovlivní reakci potkana na akustický podnět. Psychiatrie 2007; suppl.3: 2-7.

Šťastný F, **Vrajová M**, Tejkalová H, Peková S, Mareš V, Kozmiková I, Jirásková J, Höschl C, Balcar VJ. Stavba a funkce NMDA receptoru u schizofrenie: Od animálních modelů k pacientovi.
Psychiatrie 2006; suppl.2: 7-14.

Šťastný F, Kozmiková I, Klaschka J, Peková S, Tejkalová H, **Vrajová M.** Exprese NR1 podjednotky NMDA receptoru v animálním modelu schizofrenie. Psychiatrie 2006; suppl.3: 12-15.

2) publikace bez vztahu k tématu disertace

Krištofiková Z , Řípová D, Bartoš A, Bocková M, Hegnerová K, Říčný J, Čechová L, **Vrajová M** and Homola J. Neuroinflammation and complexes of 17ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 10- amyloid ß in Alzheimer´s disease. Current Alzheimer Research 2012(Přijato k publikaci) **(IF 4.9)**

Páleníček T, Bubeníková-Valešová V, Horáček J, **Vrajová M**, Novák T. Účinky selektivního antagonisty serotoninového 5-HT_{2C} receptoru SB242084 na lokomoci potkana v animálnívh modelech psychóz. Psychiatrie 2006; suppl. 3:16-20.