



**Univerzita Karlova v Praze  
3. Lékařská Fakulta**



**Vymezení úlohy NR1 podjednotky NMDA receptoru  
v patofyziologii schizofrenie**

**Mgr. Monika Vrajová  
Obor postgraduálního studia: Neurovědy**

**Vedoucí práce – Prof. MUDr. Jiří Horáček, Ph.D.  
2012**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně, že jsem řádně citovala všechny použité prameny a literaturu a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 27.5.2012

podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Psychiatrickému centru Praha v čele s prof. MUDr. Cyrilem Höschlem, DrSc. FRCPsych. Centru neuropsychiatrických studií – Projekt MŠMT 1MO517, Projektu MZ ČR MZOPCP2005 a grantu IGA MZČR NR/ 9324, z nichž byla financována většina mé práce.

Také chci poděkovat svým školitelům, prof. MUDr. Jiřímu Horáčkovi, PhD. a doc.MUDr. Františku Šťastnému, Csc. a vedoucí laboratoře RNDr.Daniele Řípové,Csc.

Dále pak spolupracovníkům a kolegům: MUDr. Soně Pekové, PhD., RNDr. Věře Valešové, PhD., RNDr. Janu Klaschkovi, Mgr. Janu Lochmanovi, PhD., MUDr. Emrichu Majerovi, prof. MUDr. Martinu Aldovi, FRCPC, Ing. Zdeně Křištofikové, PhD., RNDr. Haně Tejkalové, PhD. a MUDr.Tomáši Páleníčkovi, PhD.  
V neposlední řadě pak děkuji svému muži Ing. Bohuši Získalovi, PhD.

## 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 aNR2A. 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<sup>C1</sup> vykazaly 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 neurotransmitterovým systémům tradičně spojovaným se schizofrenií jsme na genové úrovni nepotvrdili.

## 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<sup>C1</sup> 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 neurotransmitter systems associated with schizophrenia.

## Obsah

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
<b>1 ÚVOD</b> .....	10 -
1.1 SCHIZOFRENIE .....	10 -
1.1.1 Symptomatologie schizofrenie.....	10 -
1.2 Schizofrenie - Průběh onemocnění .....	12 -
1.3 ETIOLOGICKÉ FAKTORY .....	12 -
1.3.1 Genetika .....	12 -
1.3.2 Environmentální rizika.....	16 -
1.4 NEUROCHEMICKÉ MECHANISMY SCHIZOFRENIE .....	17 -
1.4.1 Dopaminergní systém .....	17 -
1.4.2 Serotonergní systém.....	18 -
1.4.3 GABAergní systém.....	18 -
1.4.4 Glutamatergní systém .....	19 -
1.5 NMDA RECEPTOR .....	21 -
1.5.1 Stavba.....	21 -
1.5.2 Funkce NMDA receptorů .....	21 -
1.5.3 NMDA receptor v mozku pacientů se schizofrenií.....	24 -
1.5.4 NR1 podjednotka v mozku pacientů trpících schizofrenií.....	24 -
1.5.5 NMDA receptor v animálních modelech schizofrenie .....	26 -
1.6 RGS4 – KANDIDÁTNÍ GEN PRO SCHIZOFRENIÍ?.....	28 -
<b>2 CÍLE PRÁCE</b> .....	30 -
<b>3 ANIMÁLNÍ MODEL – BLOKÁDA NMDA RECEPTORU</b> .....	31 -
3.1 MATERIÁL A METODY .....	31 -
3.1.1 Zvířata .....	31 -
3.1.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce .....	33 -
3.1.3 Western blot .....	33 -
3.1.4 Statistická hodnocení .....	34 -
3.2 VÝSLEDKY .....	35 -
3.3 DISKUZE.....	37 -
<b>4 STUDIE POST MORTEM-EXPRESSE NR1 PODJEDNOTKY</b> .....	39 -
4.1 MATERIÁL A METODY .....	40 -
4.1.1 Odběr tkáně .....	40 -
4.1.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce panNR1 podjednotky .....	41 -
4.1.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce sestřižených variant NR1 podjednotky.....	42 -
4.1.4 Western blot panNR1, sestřižené varianty NR1 .....	43 -
4.1.5 Statistická hodnocení .....	44 -
4.2 VÝSLEDKY .....	45 -
4.2.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce pan NR1 podjednotky .....	45 -
4.2.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce sestřižených variant NR1 podjednotky.....	45 -
4.2.3 Western blot panNR1, sestřižené varianty NR1 .....	48 -
4.3 DISKUZE.....	50 -

4.3.1	Hipokampální hladiny panNR1 transkriptu .....	- 50 -
4.3.2	Sestřížené varianty mRNA NR1 podjednotky v hipokampu.....	- 50 -
4.3.3	Exprese proteinu panNR1 a NR1 <sup>C2</sup> varianty v hipokampu .....	- 52 -
5	<b>BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 „SILENCING“</b> .....	- 53 -
5.1	MATERIÁL A METODY .....	- 53 -
5.1.1	Neuroblastomová buněčná linie.....	- 53 -
5.1.2	Microarray.....	- 55 -
5.2	VÝSLEDKY .....	- 56 -
5.3	DISKUZE.....	- 59 -
6	<b>ZÁVĚR: Vymezení úlohy NR1 podjednotky NMDA receptoru v patofyziologii schizofrenie</b> .....	- 62 -
6.1	ANIMÁLNÍ MODEL – BLOKACE NMDA RECEPTORU .....	- 62 -
6.2	STUDIE POST MORTEM – EXPRESE NR1 PODJEDNOTKY.....	- 63 -
6.3	BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 „SILENCING“ .....	- 64 -
7	<b>LITERATURA</b> .....	- 65 -
8	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	- 84 -

## PŘEHLED POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

ACC	anterior cingulate cortex
ADCPYAP1R1 (PAC1)	adenylate cyclase-activating polypeptide 1 receptor
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoová kyselina
aODN	antisense oligodeoxynucleotide
ASR	acoustic startle reaction
ATCC	American Type Culture Collection
ATF5	activating transcription factor 5
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BSA	albumin from bovine serum
CNVs	copy number variations
COMT	katechol-O-methyl transferáza
DISC1	disrupted in schizophrenia 1
DLPFC	dorsolateral prefrontal cortex
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DSM-IV	Diagnostic and Statistic Manual
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERG1	early growth response 1
FCS	fetal calf serum
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GAD67	dekarboxyláza kyseliny glutamové, izoforma 67 kDa
GPCR	G protein-coupled receptor
GPR50	G protein-coupled receptor 50
5-HT	serotonin (5-hydroxytryptamin 5-HT)
HVJ	hemagglutinating virus of Japan
IEG	immediate early gene
LTP	dlouhodobá potenciace
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
mGluRs	metabotropní glutamátové receptory
MK-801	dizocilpin
MKN-10	mezinárodní klasifikace nemocí



MT1	melatoninový receptor
MT2A	metallothionein
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCP	phencyklidin
PFC	prefrontální kortex
PKC	protein kináza C
PMI	post mortem interval
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPI	prepulzní inhibice akustické úlekové reakce
PSD-95/93	protein postsynaptické density 95/93
PTMs	posttranslační modifikace
RGS4	regulátor G-proteinové signalizace 4
RRR	retenční signál ER
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
SNPs	single nukleotide polymorphisms
TBS-T	tris buffered saline - tween
TF	transkripční faktory

# 1 ÚVOD

## 1.1 SCHIZOFRENIE

Schizofrenie je devastující psychické onemocnění postihující celosvětově zhruba 1 % populace. Podle světové zdravotnické organizace trpí v současné době schizofrenií přibližně 24 milionů jedinců, přičemž asi polovina těchto pacientů nedostává patřičnou léčbu. O schizofrenii je lépe uvažovat ne jako o jednotlivém onemocnění, ale jako o skupině syndromů, které se liší souborem znaků a symptomů (Bleuer, 1911) s odlišnou patogenezi. Jedná se o onemocnění s chronickým průběhem, vyznačující se významným funkčním postižením a zhoršenou kvalitou života. U 25- 50 % pacientů se schizofrenií je zaznamenán pokus o sebevraždu, přičemž 4-13 % pacientů sebevraždu dokoná (Meltzer, 2001). 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 (Addington et al., 2003).

### 1.1.1 Symptomatologie schizofrenie

Schizofrenie je značně heterogenní onemocnění, kde nacházíme velkou variabilitu příznaků. Klinicky je charakterizována pozitivními symptomy, negativními symptomy, příznaky dezorganizace a také kognitivním deficitem (Andersen et al., 1998). Pozitivní symptomy zahrnují sensorické poruchy, jako jsou zejména sluchové, vizuální, čichové nebo hmatové halucinace a poruchy v obsahu myšlení, jako jsou bludy – často s persekucní či nihilistickou tematikou. Dále je mezi pozitivními symptomy uváděn dezorganizovaný proces myšlení, který má za následek alogiku řeči i neverbálního projevu. Negativní symptomy typicky zahrnují sníženou či nepatřičnou expresi emocí, pokles iniciativy, ochuzení řeči, lhostejnost v běžných příjemných aktivitách a sociální stažení. Kognitivní deficity u schizofrenie zahrnují snížení obecně intelektuálních funkcí, deficit pracovní paměti, špatné exekutivní funkce a snížení pozornosti (Rosenberg et al., 2003). Jednou z univerzálních patologií tohoto onemocnění je poškození synaptické konektivity, což bylo nalezeno u mnoha pacientů post-mortem, toto také nepřímo potvrzují zobrazovací metody na funkční a strukturální úrovni (Selemon a Goldman-Rakic, 1999). Mezi nejvíce konsistentní abnormality

v oblasti struktury patří volumetricky nalezená redukce mediálního temporálního laloku (přesněji: hipokampální formace, subikula, parahipokampálního gyru) (Ross et al., 2006). K diagnostice jsou používána kritéria zanesená v MKN-10 (International Classification of Disease, ICD-10, dle Světové zdravotnické organizace) nebo DSM-IV (Diagnostic and Statistic Manual, dle Americké psychiatrické organizace). U schizofrenie také hovoříme o subtypech nemoci, jež jsou charakterizovány souborem dominujících příznaků (Tabulka 1).

**Tabulka 1**

<b>Subtyp schizofrenie</b>	<b>Dominující příznaky</b>
<i>Paranoidní</i>	<b>Halucinace a bludy</b> Halucinace: sluchové verbální, imperativní (někdy též taktilní), tělové, viscerální, čichové, chuťové - vkládání/odebírání myšlenek Bludy: vztahovačné, persekuční
<i>Hebefrenní</i> v DSM-IV Dezorganizovaná	Změna afektivity, emotivity a poruchy chování – nepřiléhavost chování a emocí Inkoherentní řeč, dezorganizované myšlení
<i>Katatonní</i>	<b>Poruchy psychomotoriky</b> Přehnaná excitovanost a hyperkinese vs. stupor (doprovázený negativismem, mutismem, nástavami a povelovým automatismem)
<i>Nediferencovaná</i>	Splňuje diagnostická kritéria pro schizofrenii, v symptomatologii nepřevládají příznaky žádného z uvedených typů
<i>Reziduální</i>	<b>Chronická fáze onemocnění</b> – převaha negativních příznaků
<i>Simplexní</i>	Negativní příznaky: emoční oploštění, pokles výkonnosti (ztráta zájmu, výrazná apatie a sociální stažení, autismus) Pomalou postupující změny chování, selhávání v běžných situacích

## **1.2 Schizofrenie - Průběh onemocnění**

V průběhu onemocnění schizofrenií existuje značná variabilita. Největší proměnlivost pak vykazují počáteční stádia nemoci. Nemoc může probíhat v atakách, kde dochází k nárůstu defektu, nebo je defekt stabilní. Popřípadě jsou ataky následovány částečnou či úplnou remisí. Další variantou je chronický průběh bez přechodných zlepšení. Onemocnění probíhá charakteristicky ve fázích: premorbidní, prodromální, akutní a chronické, přičemž tyto fáze jsou spojeny s korespondujícími neurovývojovými změnami (Lieberman, 1999). Pro premorbidní fázi je typická přítomnost sociálních a kognitivních odchylek, které jsou však stabilní, vedle toho se často objevují jemné neurologické abnormality (Davidson et al. 1999). Přejdem do prodromálního období končí stabilita, nastupují nespecifické příznaky (kolísavá úzkost, hloubavost, vztahovačnost, depresivní nálada), zhoršuje se psychosociální poškození. Nástupem psychózy začíná období cyklických zhoršení a remisí, taktéž pokračuje úbytek funkčních schopností. Střídání remisí a relapsů může být následováno stabilizací onemocnění do trvalé remise, jindy do remise s reziduálními příznaky. Akutní fáze může však také přejít do fáze chronické, kdy je diagnostikována reziduální schizofrenie.

## **1.3 ETIOLOGICKÉ FAKTORY**

### **1.3.1 Genetika**

Schizofrenie má silnou genetickou komponentu, přičemž heritabilita, prokázaná na základě rodinných a dvojčecích studií, je ~ 0,8 (Merikangas a Risch, 2003). U monozygotních dvojčat je uváděn poměr shody od 35 % do 58 % a u dizygotních dvojčat pak od 6 do 26 % (Trimble a George, 2010). Není zde však jednotlivý gen, který by generoval silný účinek, a tak u schizofrenie hovoříme o polygenním základu. Nejlépe popsaným molekulárně genetickým nálezem je u schizofrenie asociace s delecí na chromozomálním úseku 22q11.2, přičemž 20-30 % dospělých nositelů této delece trpí schizofrenií (Murphy et al., 1999). Hlavními metodickými přístupy v genetice schizofrenie jsou: nejtradičnější - klinické sledování; genetická epidemiologie; segregáční analýza. Z novějších metod se pak

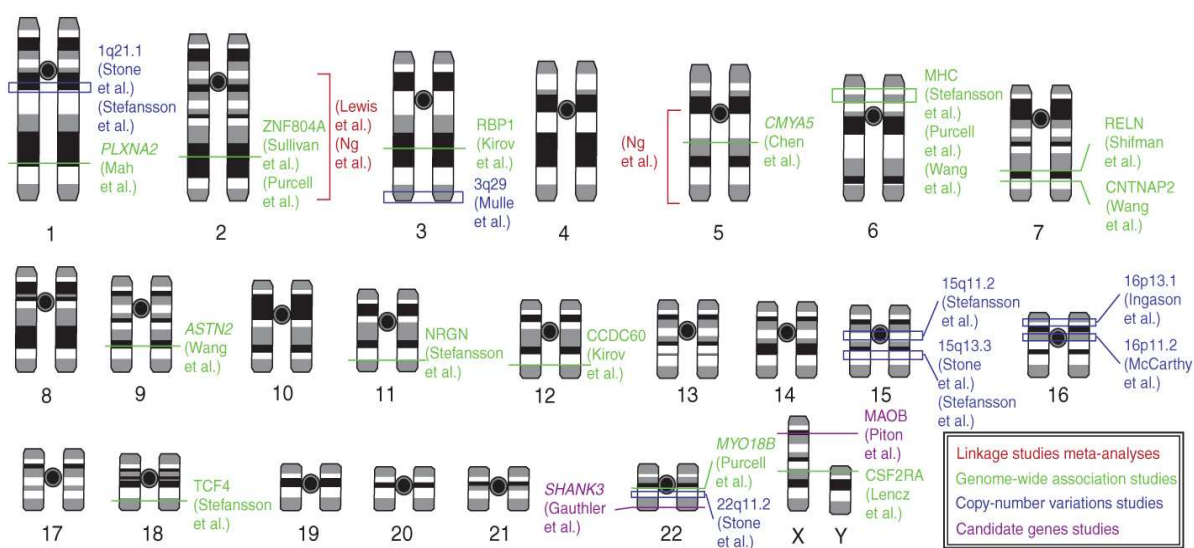
jedná o cytogenetiku používající karyotypování (viz nálezy delecí v úseku 22q11.2). Dále jsou to: vazebné studie založené na hledání regionů v rámci genomu, jejichž dědičnost je přítomná u postižených jedinců v rámci rodinných stromů; asociační studie hledající v genomu místa, která se liší frekvencí u schizofrenie a u kontrol; kandidátní geny, které jsou studovány na základě a priori hypotéz o etiologii schizofrenie. U mnoha těchto genů jsou nacházeny odlišné expresní profily a/nebo jednobodové záměny nukleotidů (SNPs). Jiný pohled pak přináší hledání abnormalit počtu kopií jednoho nebo více úseků DNA (copy number variations – CNVs). Přehled hlavních genetických studií schizofrenie viz (Obrázek 1).

Kandidátní geny jsou rozdělovány dle různých kritérií. Jednou z možností je rozdělení na základě chromozomálního umístění. Pak lze hovořit o genech, jež jsou uloženy na chromozomálních regionech dříve spojovaných se schizofrenií (Schwab a Wildenauer, 2009). Autoři studie do této skupiny genů zařadili Neuregulin 1 (NRG1) – vůbec první popsany kandidátní gen při použití této poziční aproximace (Stefansson et al., 2002). Do této skupiny patří též dystrobrevin vázající protein 1 (dysbindin), spojený s oblastí 6p22.3, který byl poprvé popsán u 265 Irských rodin (Straub et al., 1995) a regulátor G-proteinové signalizace 4 (RGS4), který leží v oblasti 1q23.3. Tento gen byl primárně studován díky post-mortem nálezům snížené exprese (mRNA) v různých oblastech mozku pacientů se schizofrenií (Mirnics et al., 2001). Dále je do této skupiny zařazován aktivátor oxidázy D-aminokyseliny (DAOA) spojený s chromozomem 13 (Blouin, 1998) a gen pro fosfatidylinositol-5-fosfát-4-kinázu typu II- $\alpha$  (PIP4K2A) ležící na chromozomu 10p12.2, což je oblast opakovaně spojovaná se schizofrenií (DeLisi et al., 2002; Schwab et al., 1998). Motivací pro studium dalších genů byla farmakologická či biochemická asociace s nemocí. Do této skupiny lze určitě zařadit geny pro dopaminové receptory. Přesto, že existuje mnoho negativních studií, obsáhlá metaanalýza postavená na genové databázi ukázala, že varianty D1, D2 a D4 receptorových genů vykazují silný doklad o asociaci se schizofrenií (Allen et al., 2008). Dále lze do této skupiny zařadit protein kinázu B (AKT1), která hraje klíčovou roli v intracelulární signalizaci. Bylo popsáno i spojení AKT1 signalizace s dopaminergním systémem (Tan et al., 2008). Taktéž byl ukázán epistatický vztah s funkčním polymorfismem catechol-O-methyltransferázy (COMT), který je jedním z enzymů degradujících katecholaminy. Dalším kritériem pro zařazení mezi kandidátní geny mohou být strukturální změny na chromosomech. Zde je

typickým zástupcem gen pro „Disrupted in schizophrenia 1“ (DISC1), v jehož případě dochází k regionální chromozomální translokaci, tato genová odlišnost je pak spojena s psychózou (Clair et al., 1990). Jak bylo zmíněno dříve, genetické riziko se neopírá o jednotlivý lokus, což podporují segreganční analýzy a taktéž vazebné studie (Carter a Chung, 1980). Proto se zdá být dobrým přístupem při pohledu na genetiku schizofrenie sledování epistatických interakcí. Prasad ve své práci zmiňuje u schizofrenie epistatické interakce objevující se u genů pro dysbindin, NRG1, DISC1, DAOA, AKT1 ve vztahu ke COMT (viz dříve popsání) (Prasad et al., 2010). Dalším zmíněným genem je pak gen GAD1 (gen pro dekarboxylázu kyseliny glutamové - isoformy 67-kDa GAD67), klíčový enzym v syntéze kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (GABA). Je zde popsána epistatická interakce SNPs GAD1 a COMT (Straub et al., 2007). Gen pro metabotropní glutamatergní receptor 3 (GRM3) je také asociován s variantami COMT (Tan et al., 2007). Přehled prací týkajících se genetické asociace glutamatergních receptorů a transportérů glutamátu se schizofrenií publikoval Cherlyn et al., 2010 (Tabulka 2). Genetická etiologie schizofrenie je široce akceptovaným konceptem, nicméně environmentální faktory jsou pro vyvolání nemoci nezbytné (Gottesman, 1990).

### Obrázek 1

Přehled hlavních genetických studií provedených u schizofrenie. Červeně – vazebné studie (meta-analýzy); zeleně – asocianční studie; modře – studie CNVs a fialově – kandidátní geny (převzato z Girard et al., 2011).



Current Opinion in Genetics & Development

## Tabulka 2

Souhrn nálezů genetických asociačních studií glutamaterních receptorů a transportérů glutamátu, počet pozitivních studií/ celkový počet studií.

Zkratky: **NMDA** – N-methyl-D-aspartátový receptor, GRIN1-3B – glutamátový ionotropní receptor NMDA1-3B; **AMPA** – (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoová kyselina), GRIA1-4 – glutamátový ionotropní receptor AMPA1-4; **Kainátové** – GRIK1-5 – glutamátový ionotropní receptor kainátový; **Met.GluR** – Metabotropní glutamátové receptory, GRM1-8 – glutamátový metabotropní receptor; **Glu.Transport** – glutamaterní transportéry, SLC1A1-12 – solute carrier family.

(Cherlyn et al., 2010 – upraveno)

Studovaný gen	Pozitivní nálezy u schizofrenie	Studovaný gen	Pozitivní nálezy u schizofrenie
<b>NMDAR</b> GRIN1	4/7	<b>Met. GluR</b> GRM1	NA
GRIN2A	3/5	GRM2	0/1
GRIN2B	6/7	GRM3	5/10
GRIN2C	0/1	GRM4	1/2
GRIN2D	1/2	GRM5	1/1
GRIN3A	0/1	GRM6	NA
GRIN3B	NA	GRM7	3/4
<b>AMPA</b> GRIA1	1/1	GRM8	1/2
GRIA2	0/1	<b>Glu Transport</b> SLC1A1	0/1
GRIA3	1/1	SLC1A2	1/1
GRIA4	1/3	SLC1A3	0/1
<b>Kainátové</b> GRIK1	NA	SLC1A4	NA
GRIK2	0/1	SLC1A5	NA
GRIK3	3/5	SLC1A6	1/1
GRIK5	0/1	SLC1A12	0/1

### 1.3.2 Environmentální rizika

Existuje široká škála nepříznivých událostí, hlavně během časného vývoje, které byly asociovány se zvýšením rizika rozvoje schizofrenie (Lewis a Levitt, 2002). K těm nejrobustnějším patří u jedinců se schizofrenií v in utero historii se zvýšenou frekvencí nacházená malnutrice matky během prvního trimestru (Susser a Lin, 1992) a chřipková infekce v druhém trimestru (Sham et al., 1992). Dále jsou zmiňovány komplikace během porodu (Geddes a Lawrie, 1995), které mohou být spojené s hypoxií. Ta může mít rovněž za následek poškození procesu prořezávání nezralých kortikálních synapsí (Cannon et al., 2002). Dále pak perinatální poškození mozku, inkompatibilita v Rh faktoru (Hollister et al., 1996), či prenatální stres (Myhrman et al., 1996). Velikost účinku asociovaná s těmito prenatálními rizikovými faktory je obvykle malá, což indikuje, že pravděpodobně nejsou samostatnými kauzálními agens (Jones a Buckley, 2006). Z širší perspektivy se ukazuje, že epigenetické modifikace jsou hojně regulovány během pozdního prenatálního a časného postnatálního vývojového období lidského mozku (Akbarian, 2010). Mezi později přicházejícími rizikovými faktory je pak popisován vliv kanabisu, přičemž efekt je dávkově závislý (Moore et al., 2007). Neurobiologické následky užívání kanabisu jsou obdobné těm, které se vyskytují u lidí se schizofrenií, tedy změny v aktivitách dopaminergních, GABAergních a glutamatergních neuronů (Moore et al., 2007). Na základě těchto skutečností je etiologie schizofrenie modelována jako interakce různých suspektních genů a environmentálních faktorů.

Pohled na schizofrenii jakožto na chorobu neuronálního vývoje se mimo jiné opírá o zpoždění mezi etiologicky signifikantní environmentální událostí a objevením se nemoci klinicky. Koncept neurovývojového základu schizofrenie je potom také podepřen množstvím pozorovaných jemných poruch motorických, kognitivních a sociálních funkcí během dětství a dospívání u jedinců, kteří později onemocněli schizofrenií (Lewis a Levitt, 2002).



## 1.4 NEUROCHEMICKÉ MECHANISMY SCHIZOFRENIE

### 1.4.1 Dopaminergní systém

Dopaminergní systém byl zhruba padesát předešlých let v rámci hypotéz schizofrenie dominantní cestou, kterou se ubíral výzkum tohoto onemocnění. Dopamin patří mezi katecholaminy a aktivuje pět typů dopaminových receptorů. Schopnost antipsychotik blokovat dopaminové receptory (D2 receptor) koreluje lépe než ostatní biochemické účinky s jejich působením na psychotické symptomy (Snyder et al., 1974). Dopaminergní hypotéza tedy vychází z předpokladu, že schizofrenie je spojena se zvýšenou aktivitou neurotransmiteru dopaminu v CNS, a že neuroleptika tedy tuto aktivitu redukuje. Výsledky studií zabývajících se genetickou variabilitou COMT ukázaly, že nositelé některých variant (specificky Val varianty) mají zvýšené riziko rozvoje schizofrenie (a také je tato varianta spojena s jak strukturálními, tak funkčními změnami mozku u pacientů se schizofrenií) (van Haren et al., 2008; Ross et al., 2006). 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. Dále pak dopaminergní dysfunkce dobře vysvětluje ze tří skupin symptomů pouze symptomy pozitivní. Omezená distribuce dopaminových neuronů v mozku se ukazuje být dalším limitujícím faktorem této hypotézy, jelikož v obecnějším rámci zahrnuje etiologie schizofrenie dysfunkce mnoha kortikálních a subkortikálních oblastí. Hlavní argumenty pro a proti dopaminergní hypotéze uvádí Trimble a George (2010).

Argumenty pro dopaminergní hypotézu:

- 1) amfetaminem indukovaná psychóza vyvolává schizofrenii podobné onemocnění
- 2) amfetamin zhoršuje schizofrenii;
- 3) látky, které blokují dopaminové receptory, fungují antipsychoticky
- 4) post – mortem studie a endokrinní studie
- 5) animální modely dopaminergního agonismu se blíží schizofrenii a vykazují reversibilitu dopamin blokujícími látkami.

Argumenty proti:

- 1) časový prostož mezi administrací dopaminového blokátoru a klinickou odpovědí
- 2) agonisté dopaminu mají nekonsistentní vliv na psychózu
- 3) přímý důkaz zvýšení dopaminové aktivity je nedostatečný.

#### **1.4.2 Serotonergní systém**

Serotonin (5hydroxytryptamin 5-HT) je jedním z nejdéle známých neurotransmiterů a jeho aktivita se uplatňuje díky vazbě na různé membránové receptory. 5-HT receptory díky vlivu na neurotransmitery, integritu synapsí a plasticitu neuronů hrají roli v psychóze, kognici a také náladě (Cooper et al., 2003). Jednobodové záměny nukleotidů (single nucleotide polymorphisms - SNPs) 5-HT1A, 5-HT2A a 5-HT2C receptorů jsou spojené s psychotickými symptomy, poruchami kognice a odpovědí na léčbu u schizofrenie (Masellis et al., 1998; Drago et al., 2008). Pozitronovou emisní tomografií byla také zjištěna u jedinců s rizikem schizofrenie snížená densita 5-HT2A receptorů v prefrontálním kortexu (Hurlemann et al., 2005). V preklinickém výzkumu je pak role 5-HT receptorů v kognitivních funkcích podpořena jejich vlivem na dopaminergní, glutamatergní a GABAergní funkce (Meltzer et al., 2003). Nízká dávka 5-HT1A agonisty, která aktivuje především presynaptické 5-HT1A receptory a snižuje uvolňování serotoninu v synaptických terminálech, vykazuje v animálním modelu schizofrenie založeném na aplikaci dizocilpinu (MK-801) antipsychotický profil (Sumiyoshi et al., 2008). Augumentační terapie 5-HT1A agonisty ve dvojité slepé placebem kontrolované studii ukázala na zlepšení kognitivních funkcí u pacientů trpících schizofrenií, kteří byli léčeni atypickými antipsychotiky (Sumiyoshi et al., 2007).

#### **1.4.3 GABAergní systém**

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS, svoji funkci realizuje díky GABA receptorům: ionotropním GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>C</sub> (iontové kanály), a dále metabotropním GABA<sub>B</sub> (receptory vázané na G-proteiny - GPCR).

Změny v GABAergní neurotransmisi jsou u schizofrenie opakovaně popisovány (Reynolds a Beasley, 2001; Lewis a Moghaddam, 2006). GABAergní dysfunkce mohou být přímo spojené s deficitem funkcí pracovní paměti (Lewis et al., 2004). Pozornost je nyní věnována GABA neuronům, které obsahují parvalbumin. Parvalbumin je, stejně jako calretinin a calbindin, vápník vázající protein. Úbytek buněk obsahujících parvalbumin byl nalezen ve frontálním kortexu a v hipokampu pacientů trpících schizofrenií. Což podporuje hypotézu GABAergního deficitu, jež narušuje v klíčových strukturách, jako je právě hipokampus či frontální kortex, uvolňování dopaminu (Trimble a George, 2010). Deficity v GABAergní signalizaci jsou v dorsolaterálním prefrontálním kortexu (DLPFC) v post mortem studiích spojovány se sníženou expresí mRNA dekarboxylázy kyseliny glutamové - isoformy 67-kDa (GAD67), enzymu jež zodpovídá za syntézu většiny GABA, v subpopulaci parvalbumin exprimujících GABAergních neuronů (Mirnics et al., 2000; Thomson et al., 2009). Snížená exprese GAD67 byla nalezena též v hipokampu (Knable et al., 2004). Současné práce ukazují, že změny parvalbuminových neuronů u schizofrenie jsou druhotným jevem hypofunkce N-methyl-D- aspartátového receptoru (NMDAR). Například NMDAR antagonismus (fencyklidin, ketamin) snižuje expresi mRNA pro parvalbumin a GAD67 (Cochran et al., 2003; Behrens et al., 2007).

#### **1.4.4 Glutamatergní systém**

V posledních zhruba dvaceti letech se pozornost obrátila k dysfunkcím spojeným s glutamatergním systémem v mozku (Kantrowitz a Javitt, 2010). Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS, svoji funkci realizuje jednak přes ionotropní receptory (iontové kanály): NMDA, AMPA (2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoová kyselina) a kainátové receptory, a dále přes metabotropní receptory - mGluRs. Glutamát je obecně rozšířený neurotransmiter 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 glutamatergních receptorů spojené s etiologií schizofrenie (Kim et al., 1980; Javitt 1987).

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 (Lang et al., 2007). Jinou možností je generalizovaná desinhibice v kortexu vygenerovaná nesprávným fungováním NMDA receptorů v GABAergních interneuronech (Stahl 2007; Lisman et al., 2008).

Blokáda NMDA receptorů je mechanismus, pomocí kterého antagonisté těchto receptorů napodobují symptomy obdobné těm, které se vyskytují u schizofrenie (Lodge a Johnson, 1990). Disociativní anestetika jako ketamin nebo fencyklidin (PCP) způsobují psychóze podobné chování u dospělých jedinců (Luby et al., 1959). Psychotomimetický efekt PCP je způsoben nekompetitivním antagonistickým účinkem na NMDA receptor (Javitt a Zukin, 1991). PCP podané zdravým jedincům vyvolá stav takřka nerozeznatelný od schizofrenie a u pacientů s diagnózou schizofrenie zhorší příznaky nemoci (Itil et al., 1967; Luby et al., 1959). U zdravých dobrovolníků vyvolá infuze ketaminu celou škálu schizofreních symptomů (Krystal et al., 1994), taktéž psychologických abnormalit spojovaných s tímto onemocněním (Umbricht et al., 2000), a také například zvýšený výdej dopaminu v subkortikální oblasti (Kegeles et al., 2000). Stabilizovaní pacienti se schizofrenií pak vykazují výraznou citlivost na ketamin s tím, že dochází k návratu jejich individuálních symptomů nemoci (Lahti et al., 2001).

mGluRs díky své modulační roli spojují glutamatergní systém s dopaminergním a GABAergním (Durand et al., 2008). V animálních modelech pak knockout mGluRs vyvolává neuropatologické změny a taktéž mění chování (Cryan et al., 2003). Nejvíce studovaným glutamatergním receptorem ve vztahu ke schizofrenii je v současné době NMDA receptor, viz [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

## 1.5 NMDA RECEPTOR

### 1.5.1 Stavba

NMDAR je heteromerní protein složený ze dvou ubikviterních NR1 podjednotek (alternativním sestřihem genu GRIN1 dochází ke vzniku 8 sestřižených variant) a dvou NR2 podjednotek (varianty NR2A-D) (Obrázek 2). Přičemž hlavními NR2 podjednotkami neuronů prefrontálního kortexu a hipokampálních neuronů jsou NR2A a NR2B (Portera- Cailliau et al., 1996). Všechny podjednotky obsahují transmembránové domény, extracelulární N konec a intracelulární C konec. Klonováním lidské podjednotky NR1 bylo zjištěno, že lidský gen GRIN1 je složen z 21 exonů (Foldes et al., 1993; Zimmer et al., 1995). Extracelulární N konec je kódován exonem 4 (21 aminokyselin), exony 20 a 21 kódují domény C konce (C1 a C2 kazety) (Tabulka 3). Vždy čtyři podjednotky tvoří iontový kanál, NR1 podjednotka disponuje vazebným místem pro glycin, přičemž toto místo není specifické jen pro glycin, ale mohou jej aktivovat i jiné endogenní ligandy (D-serin, D-alanin). Na NR2 podjednotkách je uloženo vazebné místo pro glutamát. V některých oblastech nervového systému mohou být NR2 podjednotky nahrazeny NR3 podjednotkami, které existují ve dvou variantách (NR3A a NR3B) (Lynch a Guttman, 2001). Receptor se tedy může poskládat v mnoha různých variantách, což těmto jednotlivým variantám také dává odlišné biofyzikální vlastnosti (Monyer et al., 1994), specifický vzorec pro expresi během vývoje, a také v maturovaném CNS savců (Dumas, 2005). Další variabilitu poskytují postranslační modifikace, jako je fosforylace, glykosilace, ubiquitinace, které ovlivňují jednak buněčnou lokalizaci, a taktéž funkci receptoru (Dingledine et al., 1999). Mnoho studií popisuje podjednotkové složení jako hlavní determinantu pro rozmanité vlastnosti NMDAR, jako například pro kinetiku kanálu (McBain a Mayer, 1994), pro regulace postranslačních modifikací (Kennedy a Manezerra, 2001) a pro intracelulární proteinovou asociaci (Wenthold et al., 2003).

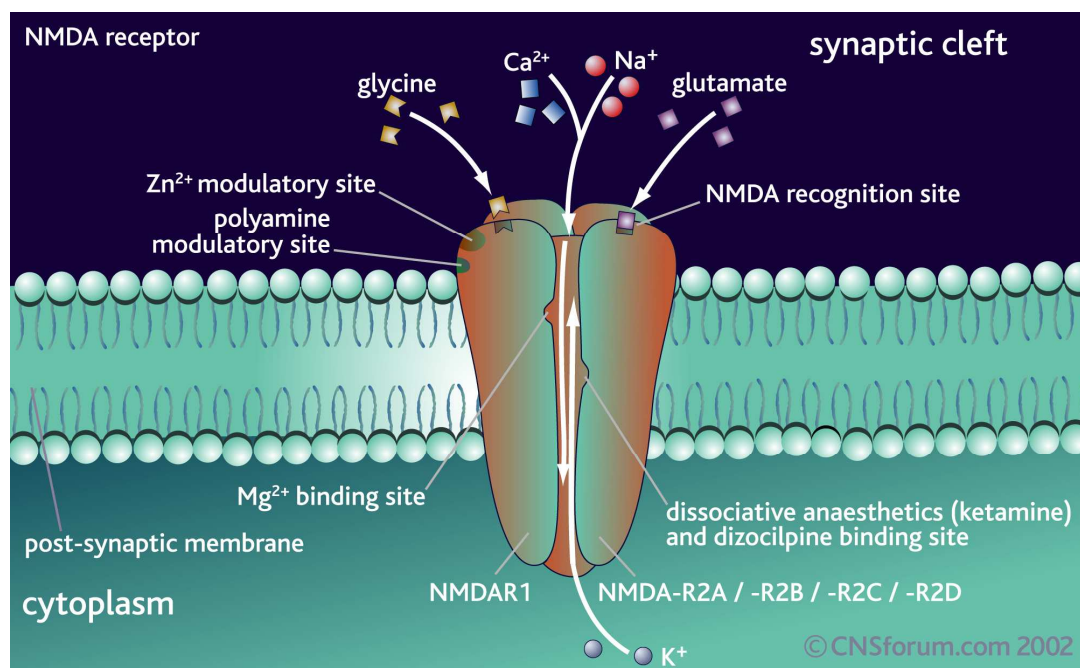
### 1.5.2 Funkce NMDA receptorů

NMDAR jsou ionotropní receptory pro excitační neurotransmitter glutamát a ke své funkci vyžadují přítomnost koagonisty glycinu. Na primární hipokampální

kultuře byly popsány dvě varianty aktivace NMDA receptoru a to jednak aktivace indukovaná agonistou a spontánní (nezávislá na agonistovi) (Tureček et al., 1997). Iontový kanál NMDAR je napětově závislým způsobem blokován ionty  $Mg^{2+}$  a vykazuje vysokou propustnost pro  $Ca^{2+}$ . Influx  $Ca^{2+}$  iontů spouští kaskády intracelulárních dějů, které regulují různé typy neuroplasticity zahrnující dlouhodobou potenciaci (LTP), synaptogenezi, tvorbu trnů a nastavení dendritických spojů (Greer a Greenberg, 2008; Wayman et al., 2008). Typ zastoupených NR2 podjednotek kriticky ovlivňuje biofyzikální a farmakologické vlastnosti NMDAR, jako je: senzitivita k iontům  $Zn^{2+}$ ,  $H^+$  a k polyaminům, pravděpodobnost otevření kanálu, deaktivací čas, vodivost kanálu a také interakce s intracelulárními signálními molekulami (Cull-Candy a Leszkiewicz 2004; Dingledine et al., 1999; Sheng a Kim 2002). Na podjednotkovém uspořádání NMDAR je také závislý pozitivní či negativní vliv pregnenolon sulfátu (derivát endogenního pregnenolonu) na receptor (Horák et al., 2006). Alternativní sestřih NR1 podjednotek ovlivňuje funkci kanálu díky rozdílnému zapojení sestřižených variant do rozdílných intracelulárních signálních drah (Bradley et al., 2006). Sestřižené varianty také ovlivňují farmakologické parametry, jako je afinita k agonistům, proudová amplituda, modulace  $Zn^{2+}$ , potenciace polyaminy a regulace pomocí protein kináz C (PKC) (Durand et al. 1993; Zheng et al., 1994). N koncová kazeta dává receptoru vyšší proudové maximum, nižší afinitu k agonistům a při saturaci glycinem chybějící potenciaci sperminem a ionty  $Zn^{2+}$  (Zukin a Bennett, 1995). C koncová kazeta C1 obsahuje hlavní fosforylační místa NR1 (Tingley et al., 1993), přičemž fosforylace je jedním z mechanismů regulujících funkci NMDAR (Kutsuwada et al., 1992).

Díky podjednotkově specializované interakci jsou NMDAR spojeny s multiproteinovou postsynaptickou sítí (postsynaptická densita PSD) (Conti et al., 1999). Do této skupiny proteinů patří PSD-95 a PSD-93, které se váží na C konec podjednotek NR2A a NR2B, přičemž protein PSD-95 je spojován se stabilizací NMDAR na buněčném povrchu (Roche et al., 2001). Funkčně jsou tyto proteiny (PSD-95, PSD-93) guanylátové kinázy, které fungují jako strukturní, a také signalizační molekuly (Elias a Nicoll, 2007).

Obrázek 2 NMDA receptor (Rang et al., 2001)



Tabulka 3 Nomenklatura NR1 sestřížených variant (izoforem)

Sestřížené varianty	Vložené kazety			C2'(21)
	N(4)	C1(20)	C2(21)	
NR1-1a	-	+	+	-
NR1-1b	+	+	+	-
NR1-2a	-	-	+	-
NR1-2b	+	-	+	-
NR1-3a	-	+	-	+
NR1-3b	+	+	-	+
NR1-4a	-	-	-	+
NR1-4b	+	-	-	+

### **1.5.3 NMDA receptor v mozku pacientů se schizofrenií**

Studie hodnotící expresi NMDA receptoru na úrovni transkriptu či proteinu v různých částech mozku pacientů, kteří trpěli schizofrenií, vykazují variabilní výsledky (Tabulka 4). Za rozdílností výsledků může být použití odlišných metodik a taktéž odlišnosti studovaných souborů. Mnoho z post mortem studií také našlo změny v expresi PSD-95 v různých strukturách mozku (Tabulka 4).

### **1.5.4 NR1 podjednotka v mozku pacientů trpících schizofrenií**

Exprese NR1 transkriptů byla nezměněna ve frontální oblasti a v parieto-temporálním kortexu u pacientů se schizofrenií (Akbarian et al., 1996), zvýšená exprese transkriptu byla naopak popsána v DLPFC, okcipitálním kortexu a horním temporálním gyru (Dracheva et al., 2001; Le Corre et al., 2000). Další práce pak našly naopak zvýšenou expresi v DLPFC a v horní temporální oblasti (Sokolov, 1998; Humphries et al., 1996). Exprese panNR1 měřená imunoautoradiografií byla v orbitofrontálním kortexu nezměněná (Toro a Deakin, 2005), stejně tak pomocí western blotu nebyly nalezeny změny v horním temporálním kortexu, DLPFC a anterior cingulate cortexu (ACC) (Kristiansen et al., 2006; Nudmamud-Thanoi a Reynolds, 2004). V levém hipokampu byla popsána snížená exprese transkriptu NR1 (Gao et al., 2000; Law a Deakin, 2001), recentnější práce pak tento výsledek nepotvrdila (McCullumsmith et al., 2006). Taktéž proteinová hladina celkové NR1 hodnocená western blotem neukázala na změny v expresi (Thompson et al., 2003) i v další práci, kde byla použita imunoautoradiografie, nebyly nalezeny změny (Toro a Deakin, 2005). V levém hipokampu pak byla nalezena in vivo snížená vazba NMDA receptoru u nemedikovaných pacientů se schizofrenií (Pilowski et al., 2006). Na malém souboru byla zhodnocena exprese panNR1 v talamu, kde se u schizofrenie neukázaly změny v expresi (Popken et al., 2002). Zatímco starší práce (Ibrahim et al., 2000) provedená na souboru starších pacientů našla snížení exprese transkriptu panNR1. Proteinová exprese NMDA byla studována v dorsomediálním a ventrálním talamu, kde ani v jedné ze struktur nebyla u pacientů se schizofrenií exprese panNR1 změněna (Clinton et al., 2006). V bazálních gangliích bylo nalezeno zvýšení exprese transkriptu v substantia nigra (Mueller et al., 2004), zatímco ve striátu u schizofrenie změny nalezeny nebyly (Meador-Woodruff et al., 2001).



**Tabulka 4** Souhrn post mortem studií zabývajících se expresí NMDA receptoru v mozku pacientů trpících schizofrenií. Černé čtverce představují transkript a červené protein ve studiích, kde nebyla změna. Šipky pak značí zvýšení či snížení exprese. Studie označené hvězdičkou hodnotily také expresi \*PSD-95, \*\* PSD-95 a PSD-93. (Kristiansen et al., 2007 – dopněno o nové studie)

Oblast mozku	Podoblast	NR1	NR2A	NR2B	NR2C	NR2D	NR3A	Reference
<b>Kortex</b>	Frontální pól	■ ■	■	■	↓	↑		(Akbarian et al., 1996; *Toro a Deakin, 2005)
	DLPFC	↑↓■	■ ■	■ ■	■	■	↑ ■	(*Dracheva et al., 2001; Sokolov, 1998; Mueller et al., 2004; *Kristiansen et al., 2006; Henson et al., 2008)
	ACC	↑	■	■	■	■		(*Kristiansen et al., 2006)
	Temporální	↑↓					■	(Le Corre et al., 2000; Humphries et al., 1996; <sub>1</sub> Mueller et al., 2004; Nudmamud-Thanoi et al., 2004)
<i>Lalok</i>	Parietální	■	■	■	■	■		(Akbarian et al., 1996)
	Ocipitální	↑	↑	■				(*Dracheva et al., 2001)
<b>Hipokampus</b>	Hipokampus	■↓■	■	↑■	■	■		(*Toro a Deakin, 2005; **McCullumsmith et al., 2006; Law a Deakin, 2001; Gao et al., 2000; Popken et al., 2002; Beneyto et al., 2007; Thompson et al., 2003)
<b>Talamus</b>	Talamus	↓■	■	↑↓	↓■	■		(*Clinton et al., 2004; Ibrahim et al., 2000)
	Dorsomediální	■	■	↑				(*Clinton et al., 2006)
	Ventrální	■	■	■				(*Clinton et al., 2006)
<b>Bazální ganglia</b>	Striatum	■	■	■	■	■		(Meador-Woodruff et al., 2001)
	Substantia nigra	↑	■	■	■	■	■	(* <sub>2</sub> Mueller et al., 2004)
<b>Mozeček</b>	Hemisféry	■	■	■	■	↑		(Schmitt et al., 2010)
	Vermis	■	■	■	■	↑		

### 1.5.5 NMDA receptor v animálních modelech schizofrenie

V rámci animálních modelů schizofrenie spojených s dysfunkcí NMDA receptorů lze hovořit v zásadě o třech variantách přístupu: neurovývojové, genetické a farmakologické. Neurovývojová hypotéza schizofrenie předpokládá, že poruchy, ke kterým dochází během prenatálního/perinatálního vývoje, se mohou v dospělosti manifestovat jako onemocnění (Weinberger, 1996). Neurovývojový model schizofrenie založený na podání dizocilpinu (MK801) a PCP, antagonistů NMDA receptoru, v pozdním fetálním a časném postnatálním období potkanům ukazuje na větší úmrtnost neuronů vlivem apoptózy (Ikonomidou et al., 1999). Podání těchto látek dospělým potkanům pak zapříčiňuje nárůst neuronální smrti vlivem nekrózy s následnou gliózou (Onley et al., 1991).

Genetický model schizofrenie postavený na hypotéze snížené exprese NMDA receptoru vytvořil Mohn (1999). Jedná se o myší linii se sníženou expresí NR1 podjednotky NMDA receptoru, která je získána díky vnesení genu pro rezistenci k neomycinu do 20 intronu lokusu NR1 (Mohn et al., 1999). Vliv inserce byl hodnocen na úrovni RNA, kde takto modifikovaná zvířata vykazovala expresi NR1 pouze kolem 10 %, a na úrovni proteinu byla exprese ještě nižší (kolem 8 %). Přičemž úplná deficience NR1 proteinu u myší je spojena s perinatální smrtí (Forrest et al., 1994). Zvířata se sníženou expresí NR1 vykazovala nárůst motorické aktivity a stereotypií obdobné těm, které jsou pozorovány u normálních myší po aplikaci antagonistů NMDA receptoru (PCP, MK801), a ke stimulačnímu efektu těchto látek byla tato zvířata rezistentní (Mohn et al., 1999). Dále NMDA deficientní myši vykazovaly deficity v sociálním a sexuálním chování (Mohn et al., 1999). U těchto myší byla zvýšená akustická úleková reakce (ASR), a dále deficit její prepulzní inhibice (PPI) (Duncan et al., 2004). PPI je markerem sensorimotorického gaitingu a deficit PPI byl nalezen u závažných neuropsychiatrických onemocnění, jako je schizofrenie (Geyer et al., 2001).

K objasnění významu NR1 podjednotky přispěl také myší model s genetickou mutací v glycinovém místě podjednotky Grin1D481N, tato mutace snižovala afinitu pro glycin (Kew et al., 2000; Labrie et al., 2008). Přičemž tento model představuje fenotyp relevantní pro negativní a kognitivní symptomy schizofrenie (Bondi et al., 2012).

Další variantou, jak snížit expresi NMDA, je použít antisense oligonukleotidy. Při jednorázové aplikaci komplexu NR1 antisense HVJ-liposomu do šesti míst obou hipokampů potkanů bylo western blotem prokázáno snížení exprese NR1 proteinu o 30 % (Inada et al., 2003). Toto snížení bylo spojeno s poklesem PPI, avšak neovlivnilo prostorovou paměť v Morrisově vodním bludišti (Inada et al., 2003).

V jiné práci, kde byl potkanům injekčně aplikován do obou ventrálních hipokampů vektor exprimující antisense RNA pro NR1 podjednotku, tato zvířata vykázala horší výsledky v testu vyhýbání se místu než kontroly (Cheli et al., 2006).

Farmakologické modely pracují s akutním, či chronickým podáním antagonistů NMDA receptoru, jako jsou dříve zmíněné látky: PCP, ketamin nebo také dizocilpin (MK-801). Podání MK-801 a PCP vyvolává u potkanů deficit PPI a zvyšuje akustickou úlekovou reakci (Geyer et al., 2001; Bubeníková et al., 2005; Seillier a Giuffrida, 2009). U potkanů bylo popsáno poškození PPI a taktéž hyperlokomoce indukované systémovým podáním ketaminu (Páleníček et al., 2011). Podrobnější informace o podání NMDA antagonistů v animálních modelech viz Bubeníková (Bubeníková et al., 2008).

NMDA receptory jsou v synapsích propojeny se systémem postsynaptické density (PSD), jak bylo popsáno dříve (1.5.2.). Ve farmakologickém modelu perinatálního podání PCP byl u 12 denních potkanů popsán signifikantní nárůst exprese PSD-95, u 5 týdenních nárůst exprese NR2A, NR1 a také PSD-95, naopak u 5 měsíčních byl zjištěn významný pokles NR2A, NR2B a PSD-95 (du Bois et al., 2012). Protein PSD-95 je kódován genem DLG4, přičemž DLG4 knockout myši vykazují deficit synaptické plasticity a poškození prostorového učení (Migaud et al., 1998). Gen DLG4 se nachází v oblasti 17p13.1, což je region chromozomu spojovaný se schizofrenií (Klei et al., 2005). Další farmakologická studie, kde byl potkanům podáván chronicky antagonist NMDA - PCP, ukázala na pokles exprese mRNA i proteinu RGS4 (regulátor genové exprese 4) v prefrontálním kortexu (Gu et al., 2007). Právě protein RGS4 a jeho genové varianty mohou představovat propojení mezi alterací glutamaterního systému a změnami dopaminu a dalších neuromodulátorů.

## 1.6 RGS4 – KANDIDÁTNÍ GEN PRO SCHIZOFRENIÍ?

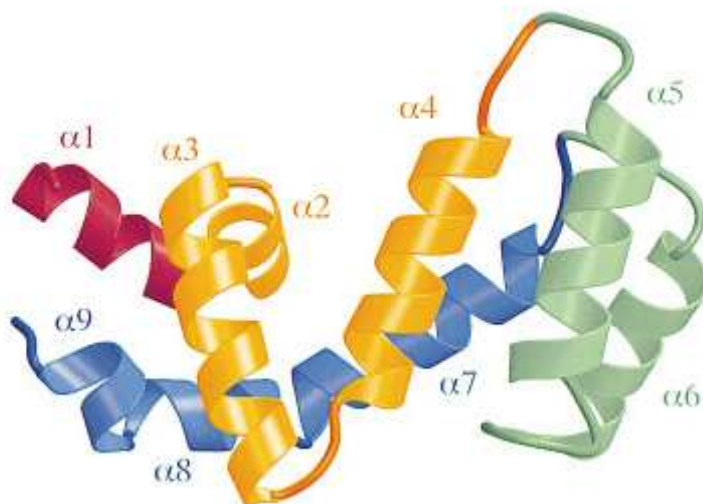
RGS4 patří mezi regulátory G-proteinové signalizace (RGS), které kontrolují časový průběh intracelulární signalizace mnoha receptorů spřažených s G-proteiny (GPCRs). Je-li nepřítomen specifický ligand, cytoplazmická doména GPCR je pevně navázána na heterotrimer G proteinu složený z  $G\alpha$ ,  $G\beta$  a  $G\gamma$  podjednotek. Po navázání neurotransmiteru na GPCR dochází k disociaci G proteinových podjednotek. Nezávislé podjednotky jsou pak schopné interagovat s buněčnými efektory, a tedy dochází k aktivaci nebo inhibici v různých signálních kaskádách. RGS proteiny jakožto GTPázové aktivátory zkracují délku intracelulární signalizace mnoha GPCRs, jako jsou dopaminové,  $\mu$ -opioidní, metabotropní glutamátové a muskarinové receptory (Ross a Wilkie, 2000).

Gen pro regulátor G-proteinové signalizace 4 (RGS4) se nachází na lokusu 1q23, což je jedno se suspektních míst pro schizofrenii v lidském genomu. Dále bylo několik SNPs tohoto genu asociováno s tímto onemocněním (Chovandri et al., 2008). RGS4 (Obrázek 3) je hojně exprimován v lidském mozku v PFC, struktuře, která je u schizofrenie poškozena (Erdeley et al., 2004). Post mortem studie ukázaly u pacientů, kteří trpěli schizofrenií, na snížení exprese RGS4 v mnoha oblastech mozku, a to ve frontálním kortexu – superior temporal gyrus (Bowden et al., 2007); prefrontálním, motorickém a visuálním kortexu (Mirnics et al., 2001). Snížení exprese mRNA pro RGS4 protein se ukázalo jako specifické, jelikož exprese dalších RGS významně změněna nebyla (Mirnics et al., 2001). Dále se pak tento nález zdá být specifický směrem k diagnóze schizofrenie, při hodnocení PFC pacientů s velkou depresí se rozdíl v expresi RGS4 neukázaly. Novější práce nenašla rozdíl v expresi RGS4 v PFC u pacientů se schizofrenií (Stuart et al., 2008). Další negativní studie (Lipska et al., 2006) nicméně ukázala na inverzní korelaci Val158Met genotypu katechol-O-metyl transferázy (COMT) s expresí mRNA RGS4 v DLPFC a na asociaci s expresí v PFC a hipokampu, přičemž nositelé Val alely vykazovali signifikantně nižší expresi než heterozygoti, či Met homozygoti. Čímž tedy studie upozornila na spojení exprese mRNA pro RGS4 a dopaminergní signalizací, jelikož COMT je hlavní enzym, který se podílí na degradaci dopaminu. Výsledky studia SNPs RGS4 pak přinesly informaci o vlivu variant RGS4 na manifestaci nemoci a taktéž na odpověď na léčbu risperidonem (Lane et al., 2008).

V animálním modelu používajícím PCP pak byl demonstrován pokles RGS4 exprese v neuronech PFC (Gu et al., 2007). Funkční studie jasně nepotvrdily, zdali expresní hladina RGS4 hraje roli v rozvoji schizofrenie (Buckholtz et al., 2007). Role RGS4 v patofyziologii schizofrenie může být tedy dána díky interakci s dalšími neurotransmitterovými drahami, viz zmíněná práce Lipska et al., 2006. Vztah změněné dopaminergní signalizace byl spojen se změnami exprese mRNA pro RGS4 také v animálním modelu založeném na podání amfetaminu (Schwendt et al., 2006). Inhibice RGS4 funkce způsobená specifickou protilátkou potencovala serotonergním 5HT1A receptorem mediovanou regulaci kanálů NMDA receptorů v PFC (Gu et al., 2007).

**Obrázek 3** Stužkový model RGS4

RGS4 se skládá z devíti helixů, které tvoří dvě subdomény: 1)  $\alpha$  1,2,3,8,9; 2)  $\alpha$  4,5,6,7. K  $G\alpha$  podjednotce G proteinu se váží především helixy  $\alpha$  6 a 7. Převzato z (Tesmer et al., 1997)



## 2 CÍLE PRÁCE

Jak ukazují práce s antagonisty NMDA receptoru, hromadí se důkazy potvrzující roli tohoto receptoru v patofyziologii schizofrenie. Mezi cíle této práce tak patří objasnění role NR1 podjednotky v etiologii schizofrenie, a to jednak ve vztahu k psychóze podobnému chování v animálním modelu, a dále expresní změny NR1 podjednotky v lidském hipokampu post mortem.

1) Naším cílem bylo zhodnotit vliv exprese podjednotek NMDA receptoru na rozvoj psychóze podobného chování. V animálním modelu, založeném na aplikaci antisense oligonukleotidů (anti- NR1/2A/2B podjednotka) do obou hipokampů dospělého potkana, jsme hodnotili prepulzní inhibici akustické úlekové reakce. Dále jsme stanovovali exprese proteinů patřících podjednotek a také proteinů postsynaptické density.

2) V dalším kroku nás zajímalo, jakým způsobem je změněna exprese NR1 podjednotky u schizofrenie, a tedy zda jsou expresní změny na úrovni celkové NR1 (panNR1) a/nebo na úrovni sestřižených variant. V lidských post mortem hipokampech jsme proto hodnotili expresi panNR1 podjednotky NMDA receptoru a jejich sestřižených variant. Expresi jsme zjišťovali na úrovni proteinu a také na úrovni mRNA, a to v hipokampech pacientů s diagnózou schizofrenie a v kontrolním souboru.

Pro naši práci také vycházíme ze skutečnosti, že regulátor G-proteinové signalizace 4 (RGS4) je považován za jeden z kandidátních genů schizofrenie. Jeho význam posiluje fakt, že je uložen na suspektním lokusu genomu. Publikovány jsou rovněž opakované nálezy snížené exprese v mozcích pacientů, kteří trpěli schizofrenií. Nicméně úloha RGS4 a jeho zapojení v metabolických drahách, které jsou u schizofrenie poškozené, není příliš známa.

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

### **3 ANIMÁLNÍ MODEL – BLOKÁDA NMDA RECEPTORU**

Na základě dříve publikovaných prací týkajících se genetického a farmakologického ovlivnění NMDA receptoru v animálních modelech schizofrenie (viz. 1.4.5.) 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 (Kim a Sheng, 2004). Pro vytvoření genetického modelu jsme zvolili antisense oligodeoxynukleotidy, což jsou krátké jedno řetězcové úseky DNA komplementární k vybrané sekvenci. Díky sekvenčně specifické hybridizaci vytváří duplexy, které jsou následně degradovány RNasami (Robinson, 2004). 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. Poškození PPI bylo poprvé u schizofrenie popsáno v roce 1978 (Braff et al., 1978). Hodnocení sensorimotorického „gaitingu“ patří k nejpoužívanějším fyziologickým markérům v laboratořích studujících schizofrenii a to jak u nemocných tak v modelech nemoci.

#### **3.1 MATERIÁL A METODY**

##### **3.1.1 Zvířata**

Pozorování byla prováděna na dospělých potkaních samcích kmene Wistar (BioTest Konárove) o hmotnosti 250-270 g. Zvířata byla ustájena v transparentních chovných nádobách po dvojicích v klimatizovaném zvěřinci 22 ±2 °C s pravidelným dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma. 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 (Vrajová et al., 2008). Dávka aODN/sODN nebo Phys činila: u skupiny A 1x nebo u skupiny B 2x 5 nmol/ 2,5 µL do každého z hipokampů.

### **Skupina A:**

Zvířata jsme rozdělili do čtyř podskupin: naivní (INT, n = 6); kontrolní (Kont, n = 7); s infuzí antisense NR1 (aODN, n = 8) a s infuzí sense NR1 (sODN, n = 8).

### **Skupina B:**

Zvířata jsme rozdělili do sedmi podskupin: kontrolní s infuzí fyziologického roztoku (Kont, n = 10); s infuzí antisense NR1 a fyziologickým roztokem (aNR1/Phys, n = 7); s infuzí antisense NR1 a antisense NR2A (aNR1/aNR2A, n = 7); s infuzí antisense NR1 a antisense NR2B (aNR1/aNR2B, n = 7); s infuzí antisense NR2A a fyziologickým roztokem (aNR2A/Phys, n = 7); s infuzí antisense NR2B a fyziologickým roztokem (aNR2B/Phys, n = 7); s infuzí antisense NR2A a NR2B (aNR2A/aNR2B, n = 7).

Oligodeoxynukleotidy byly z důvodu stabilizace modifikovány na prvních a posledních třech bázích fosforothioátem. Sekvence použitých oligodeoxynukleotidů byla pro aNR1: 5'-CAG CAG GTG CAT GGT GCT-3' pro sODN (NR1) komplementární sekvence bází, aODN pro NR2A: CA GTA GCC CAA TCT GCC CAT; aODN pro NR2B: CTT CAT CTT CAG CTA GTC GG (Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR). Oligodeoxynukleotidy jsme rozpouštěli v destilované vodě. Jednorázová aplikace aODN byla zvolena na základě pilotního pokusu, kde jsme při porovnání akutní a subchronické – 7 denní (Alzetovy pumpy, DURECT Corporation, USA) aplikace aNR1 nezjistili významný rozdíl v poklesu exprese NR1.

Pro odběr mozkové tkáně byli potkani anestetizováni éterovými výpary a dekapitováni. Z rychle vybavených mozků jsme mikrochirurgicky vyřízli oba hipokampy. Kontrola přesnosti aplikačního vpichu byla prováděna mikroskopicky, přičemž hipokampy, kde nebyl vpich nalezen, jsme z dalších hodnocení vyřadili.

Všechny aplikační postupy byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Psychiatrického centra Praha. Pozorování byla provedena na nezbytně nutném počtu zvířat v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve smyslu znění vyhlášky 207/2004 Sb.



### 3.1.2 Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

20 hodin po aplikaci byla zvířata přenesena do místnosti, kde byla po 4hodinové adaptační periodě měřena akustická úleková reakce (ASR) a její prepulzní inhibice (PPI). Reakce potkanů na silné zvukové podněty i na slabší předpodněty 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 Ellenbroeka (Ellenbroek et al., 2002). Po aklimatizační periodě (5 minut) byla zvířata 50krát vystavena akustickým podnětům v pseudonáhodném pořadí, kdy byl prezentován buď samotný silný podnět (PA - 10krát 120 dB, trvání 30 ms), nebo ve spojení s předpodněty o intenzitě 3, 5 nebo 10 dB (PP3, PP5, PP10) nad úroveň 70 dB „bílého šumu“. Předpodněty byly generovány 70 ms před PA. Intenzita předpodnětů byla: 73, 75 nebo 80 dB, přičemž každý z nich byl opakován také 10krát. Intervaly mezi registrací odpovědí byly v rozmezí 10-20 s. Při 10 kontrolních měřeních byl generován pouze „bílý šum“, což umožnilo sledovat, zda potkan reaguje jen na stimulační podněty (Ellenbroek et al., 2002; Tejkalová a Šťastný, 2005). Hodnotu prepulzní inhibice (PPI) jsme pro každé zvíře počítali z průměru odpovědí na všechny generované předpodnětové stimuly  $PP_x = (PP_3 + PP_5 + PP_{10})/3$  a velikosti odpovědi samotné úlekové reakce P120 podle vzorce:  $PPI = 100 - (PP_x/P_{120}) \times 100$ . Soubory datových výstupů jednotlivých měření pro PP3, 5, 10 byly načteny z 11 – 50 cyklu, kdy se prvních 10 měření hodnotilo pouze jako adaptace.

### 3.1.3 Western blot

Hipokampy byly homogenizovány v 1 ml vychlazeného lyzačního pufru (320 mM sacharóza; 10 mM Tris; pH 7,4; 0,2 mM EDTA; 2 mM PMSF; 1 mM 2-merkaptoethanol a koktejl inhibitorů proteáz, SigmaAldrich). Z homogenizovaných hipokampů jsme centrifugací získali hrubou synaptozomální frakci – 1000 g při 4 °C 20 min., následně byl supernatant (S1) centrifugován 13 000 g při 4°C 20 min.,

získaný (P2) pelet byl resuspendován ve vychlazené redestilované vodě. Koncentrace proteinů byla hodnocena pomocí Bredfordovy metody za použití hovězího sérového albumínu (BSA) jakožto standardu (BioRad, USA). P2 frakce byla zředěna v Laemlli pufru (63 mM Tris; 10 % glycerol; 2 % SDS; 5 % 2-merkaptoetanol; 0,01 % bromfenolová modř) a nanášena na 7,5 % polyakrylamidový gel.

Po elektroforetickém rozdělení proteinů (BioRad, USA) byly proteiny elektroblotem přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (BioRad, USA). Nespecifické vazby byly zablokovány pomocí 3 % BSA (pro podjednotky NMDA receptoru), nebo 3 % netučného mléka (pro PSD proteiny) v PBS pufru. Membrány byly následně inkubovány s primárními protilátkami, přes noc s anti-NMDAR1 (1:1000, Millipore, USA), s anti-NR2A/anti-NR2B (1:500, Millipore, USA) a s anti-PSD95/ anti-PSD93 (1:500, SantaCruz, USA). Jako kontrola, ke které byla vztažena exprese studovaných proteinů, byl použit  $\alpha$ -tubulin (inkubace 1 h, 1:1000, Exbio, ČR). Po odmytí přebytečných protilátek v PBS pufru byly membrány inkubovány 1 h v sekundárních protilátkách konjugovaných s křenuvou peroxidázou (1:3000, Dako, Dánsko). Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu (Pierce, USA) a hodnocena na GelDoc analyzačním systému (BioRad, USA).

### **3.1.4 Statistická hodnocení**

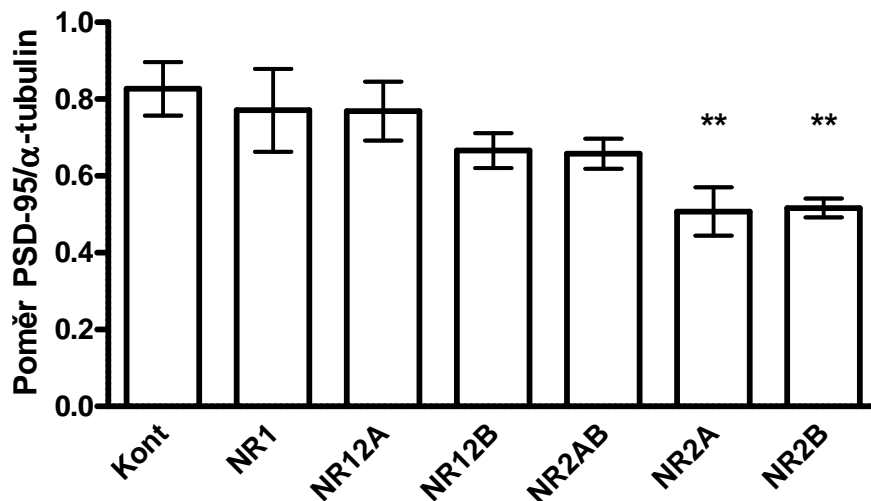
Pro statistická hodnocení dat úlekové reakce a prepulzní inhibice, stejně jako exprese proteinů (A) levých a pravých hipokampů zvlášť), byla použita jednofaktorová analýza variance (ANOVA). Post-hoc analýza byla provedena A) Newman-Kelsovim testem, B) Studentovým t-testem. Jako signifikantní byly brány výsledky na hladině významnosti  $P < 0,05$ ; naznačené významné pak na hladině  $P < 0,1$ .

## 3.2 VÝSLEDKY

A) Při použití samostatných aplikací aODN (aNR1) nebo sODN (sNR1) a KONT se ukázalo snížení reflexní motorické odpovědi na silný akustický signál (120 dB) oproti skupině naivních (INT) zvířat, avšak toto snížení nebylo signifikantní ( $F [3, 25] = 1,15$ ,  $P = 0,35$ ), stejně tak byly nevýznamné změny v PPI (Vrajová et al., 2007). Expres NR1 vykazala statisticky významný pokles v pravém hipokampu potkanů ovlivněných aODN oproti kontrolní skupině (KONT), ( $F [3, 27] = 3,40$ ,  $P = 0,0319$ ; post-test aODN vs. KONT:  $P < 0,05$ ) v levém hipokampu byl pokles nevýznamný (Vrajová et al., 2007). Aplikace komplementárních sODN statisticky významně expresi NR1 neměnila.

B) Velikost reflexní motorické odpovědi na silný akustický signál (120 dB) 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 (Vrajová et al., 2008).

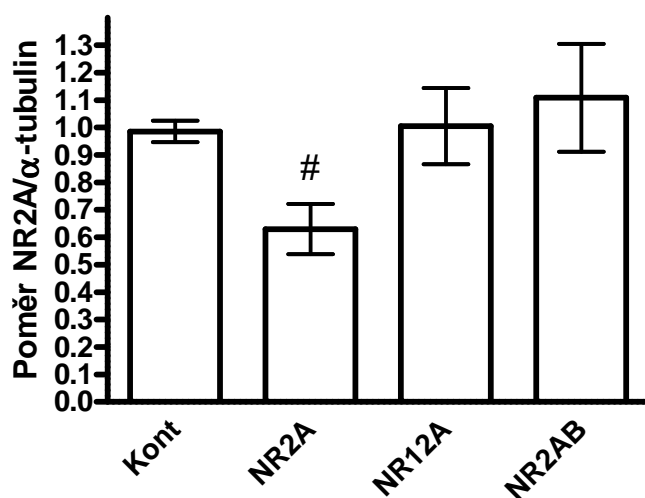
Nejvýraznějším výsledkem je statisticky významná odlišnost exprese PSD-95 mezi jednotlivými aplikačními skupinami ( $F [6, 44] = 3,41$ ;  $P = 0,0075$ ). Post-hoc analýza ukázala významný pokles exprese PSD-95 ve skupině aNR2A/Phys oproti kontrole ( $T [44] = 3,5$ ;  $P = 0,0011$ ) a stejně tak ve skupině aNR2B/Phys ( $T [44] = 3,24$ ;  $P = 0,0022$ ) (Obrázek 4). Změnu jsme nezaznamenali v expresi proteinu PSD-93 (Vrajová et al., 2011). Expres NR1 podjednotky (hodnocená pomocí protilátky proti všem sestřiženým variantám) ukázala v jednofaktorové analýze variance významný rozdíl mezi jednotlivými aplikacemi ( $F [6, 45] = 2,7$ ;  $P = 0,0252$ ). K nejvýraznějšímu poklesu exprese NR1 o 14 % oproti kontrole došlo ve skupině aNR2A/aNR2B. Zatímco samotná aplikace aNR1 vykazala pokles pouze o 7 % (Vrajová et al., 2011). Protein NR2A se v expresi mezi skupinami lišil pouze nevýznamně ( $F [3, 27] = 2,84$ ;  $P = 0,0566$ ). Aplikace aNR2A/Phys byla spojena s poklesem oproti kontrole ( $T [27] = 2,19$ ;  $P = 0,037$ ) (Obrázek 5). Rozdíl exprese NR2B podjednotky taktéž nedosáhl signifikantně významného výsledku ( $F [3, 27] = 2,74$ ;  $P = 0,0626$ ). Ve skupině aNR1/aNR2B byl oproti kontrole pokles v expresi NR2B ( $T [27] = 2,4$ ;  $P = 0,0235$ ) (Obrázek 6).



**Obrázek 4**

**Western blot: Expresa proteinu PSD-95 u skupin s jednotlivými aplikacemi aODN a kontrol.**

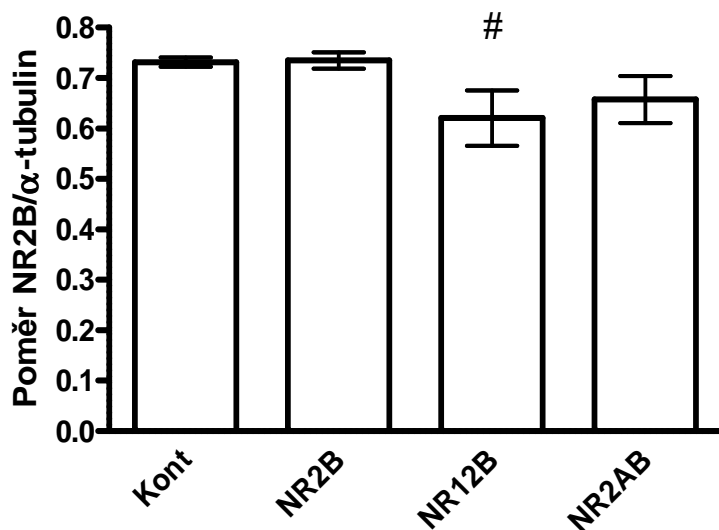
Hodnoty jsou poměrem optických denzit ( $\text{nm}^2$ ) PSD-95/ $\alpha$ -tubulin. Zobrazeny jsou průměry ve skupinách  $\pm$  SEM, \*\*  $P < 0,01$ .



**Obrázek 5**

**Western blot: Expresa proteinu NR2A u skupin s jednotlivými aplikacemi aODN a kontrol.**

Hodnoty jsou poměrem optických denzit ( $\text{nm}^2$ ) NR2A/ $\alpha$ -tubulin. Zobrazeny jsou průměry ve skupinách  $\pm$  SEM, # $P < 0,05$ .



**Obrázek 6**

**Western blot: Expresa proteinu NR2B u skupin s jednotlivými aplikacemi aODN a kontrol.**

Hodnoty jsou poměrem optických denzit ( $\text{nm}^2$ ) NR2B/ $\alpha$ -tubulin. Zobrazeny jsou průměry ve skupinách  $\pm$  SEM, #  $P < 0,05$ .

### 3.3 DISKUZE

Z našich výsledků vyplývá, že krátkodobé ovlivnění exprese jak samostatně podjednotky NR1, tak vzájemných kombinací podjednotky NR1 a podjednotek NR2A/B NMDA receptoru v obou hipokampech, neovlivní významně PPI. Náš výsledek neodpovídá dříve publikované práci (Inada et al., 2003), kde zjistili narušení PPI po jednorázové aplikaci aODN (anti-NR1), avšak provedené do šesti míst v hipokampu. 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. Deficit PPI byl také dokumentován v případě hypofunkce hipokampálních NMDA-R docílené podáním nekompetitivního antagonisty MK-801 (Bakshi a Geyer, 1998). Ani významné snížení exprese podjednotky NR2A následkem aODN (anti-NR2A) neovlivnilo PPI, což odpovídá dříve publikovaným výsledkům myšího modelu (Spooren et al., 2004). Současná inhibice NR2A a NR2B podjednotky nevyvolala očekávaný pokles exprese v obou podjednotkách, a tak nedošlo ke změně PPI. Zdá se tedy, že poškození PPI je spojeno až s masivním zásahem do exprese podjednotek tohoto receptoru.

Data získaná Western blotem ukázala nezměněné exprese proteinu PSD-93 ve všech skupinách. Ukazuje se tedy, že ačkoli exprese NR2A/B podjednotek a PSD-93 spolu díky vazbě těchto molekul souvisí (Roche et al., 2001), významnější změny lze nalézt až při masivním snížení exprese jedné z těchto komponent. Toto bylo popsáno na myších neuronech, kde snížení exprese PSD-93 o 80 % bylo spojeno se snížením exprese obou NR2 podjednotek (Zhang et al., 2010). Ve skupině ovlivněné infuzí aODN-NR2B/NR2A jsme našli pokles exprese PSD-95, avšak exprese NR2B/A zůstala nezměněna. Náš výsledek odpovídá situaci, která byla popsána v oblasti předního cingulárního kortexu u pacientů se schizofrenií, kde byla snížená exprese PSD-95 doprovázena nezměněnou expresí NR2B (Kristiansen et al., 2010). Naše nálezy svědčí pro vznik asociace PSD-95 a NR2A/B podjednotek v časně fázi biosyntézy těchto proteinů. Vazba PSD-95 k nově sestaveným NMDA receptorům se děje již v časně fázi syntézy a to ještě v endoplazmatickém retikulu (Sans et al., 2003). Otázkou tedy zůstává, proč se projevilo snížení exprese PSD-95, a ne exprese NR2A/B, a zdali bychom snížení hladin podjednotek našli po delším časovém intervalu, či v subcelulární frakci bohaté na endoplazmatické retikulum.

Výsledky byly publikovány v časopise *Psychiatrie* (Šťastný et al., 2006; Vrajová et al., 2007; Vrajová et al., 2008; Vrajová et al., 2009; Vrajová et al., 2011) (viz. Seznam publikací).

## **4 STUDIE POST MORTEM-EXPRESI NR1 PODJEDNOTKY**

Hipokampus je oblastí, která je významně zapojena v patofyziologii schizofrenie, byly zde u pacientů nalezeny strukturní, funkční a biochemické změny (Keshavan et al., 2008). Dříve publikované práce studující v lidském hipokampu post mortem expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru našly na úrovni mRNA pokles exprese (Gao et al., 2000), nebo pouze levostranný pokles (Law a Deakin, 2001), popřípadě nenašly změnu v expresi mRNA (McCullumsmith et al., 2006). U exprese NR1 proteinu pak bylo dříve opakovaně popsáno, že není u schizofrenie změněna (Thompson et al., 2003; Toro a Deakin, 2005). V levém hipokampu pak byla in vivo popsána snížená vazba NMDA receptoru u pacientů se schizofrenií, kteří dosud nebyli medikováni antipsychotiky (Pilowski et al., 2006). Dvě zmíněné práce tedy ukazují na potřebu prokázat změny exprese v mozcích pacientů s ohledem na faktor laterality.

Dřívější práce ukázaly na estrogény jakožto na látky, které zprostředkovávají změny v expresi a aktivitě NMDA receptorů u potkanů (Wooley et al., 1997; McEwen 2002). U schizofrenie se hovoří o estrogenové hypotéze, která říká, že estrogény jsou protektivním faktorem oddalujícím nebo dokonce chránícím před nástupem tohoto onemocnění ženy v reprodukčním období. Tuto teorii potvrdila práce, kde se hodnotilo množství estradiolu u žen, které trpěly psychózou, a porovnávalo se s hodnotami u pacientek s jinými psychiatrickými diagnózami a u zdravých kontrol. Ukázalo se, že pacientky s psychózou měly zdaleka nejnižší hodnoty (Huber et al., 2004). 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 jak bylo zmíněno v kapitole 1.5.4., 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 hodnotili expresi NR1 podjednotky a jejích sestřižených variant v lidském hipokampu, 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 laterality a vliv pohlaví.

## 4.1 MATERIÁL A METODY

### 4.1.1 Odběr tkáně

Post mortem tkáň byla získána od jedinců s diagnózou schizofrenie (MKN-10) a od starších zemřelých kontrolních 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 (Tabulka 5). 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 a ani v post mortem intervalu (PMI) (Tabulka 5). Mozkové autopsie získané z levých a pravých hipokampů byly neprodleně zamrazeny při  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Použili jsme protokol rychlého zamražení tak, abychom mohli provést stanovení exprese proteinů a RNA. Délka skladování tkání při  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  před vlastním hodnocením se u skupin nelišila. Taktéž jsme zabránili opakovanému rozmrazování a zamrazování, aby nedocházelo k rozkladu tkáně. Z hipokampu jsme transversálně disekovali centrální část o hmotnosti  $\sim 50\text{ mg}$ . Veškeré experimenty byly prováděny v souladu s Helsinskou deklarací a taktéž se souhlasem etické komise Psychiatrického centra Praha.

**Tabulka 5** Charakteristiky jedinců v souboru

Metoda	n	Pohlaví	Věk (roky)	PMI (h)	Diagnóza	Medikace/non
<i>panNR1</i> RT-qPCR ( $\pm$ SEM)	21	11M/10F	66.9 ( $\pm$ 3.26)	35.62 ( $\pm$ 4.7)	8 CONT/13 SCZ	4med/9non
<i>NR1 izoformy</i> RT-qPCR ( $\pm$ SEM)	31	15M/16F	67.53 ( $\pm$ 2.85)	30.7 ( $\pm$ 4.14)	14 CONT/17 SCZ	6med/11non
<i>panNR1</i> WB ( $\pm$ SEM)	30	15M/15F	66.32 ( $\pm$ 2.93)	29.29 ( $\pm$ 4.01)	13 CONT/17 SCZ	7med/10non
<i>NR1<sup>C2</sup></i> WB ( $\pm$ SEM)	31	16M/15F	67.32 ( $\pm$ 2.67)	29.32 ( $\pm$ 3.78)	14 CONT/ 17 SCZ	7med/10non

Zkratky: RT-qPCR, reverse transcription -quantitative polymerase chain reaction; WB, western blot; F, ženy; M, muži; PMI, post-mortem interval (hodiny); CONT, kontrolní skupina; SCZ, schizofrenie; med, antipsychotická medikace až do smrti; non, bez antipsychotické medikace přibližně 2 měsíce před smrtí.



#### 4.1.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce panNR1 podjednotky

Ze zamražené tkáně byla izolována RNA za pomoci TriZol (Invitrogen, USA); cDNA byla připravena pomocí Reverse-IT Blend kitu (Abgene, UK) dle doporučení výrobce. Na základě našich testování byl vybrán  $\beta 2$  – mikroglobulin jako nejvhodnější referenční gen pro testování v lidském hipokampu, jelikož vykázal největší stabilitu napříč testovanými vzorky (Primery: For GAGGCTATCCAGCGTACTCC; Rev GATAGAAAGACCAGTCCTTGCTC). Pro zabezpečení reprodukovatelnosti kvantifikace byly připraveny plazmidové standardy za použití standardního klonovacího T/A postupu. Jako klonovací vektor byl použit pCR2.1 (Invitrogen, USA). Inerty byly připraveny PCR amplifikační fragmentu  $\beta 2$  – mikroglobulinu a také GRINI genu. Primery pro GRINI gen byly vybrány tak, aby odpovídaly sekvenci vyskytující se u všech osmi sestřihových variant mRNA, a tedy abychom hodnotily expresi panNR1. GRINI primery (For TCTACAATGGCACCC; Rev GGTGCAGATCACCTTCTTGAC). Sekvence TaqMan sond (Promega, USA) byly následující:  $\beta 2$  – mikroglobulin gen AGGTTTACTCACGTCATCCAGCAG; panGRINI gen TGACAGGAAGATCATCT GGCCAGGC. Plazmidy byly purifikovány za použití Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Německo) dle doporučení výrobce.

Ke zhodnocení hladin exprese panGRINI mRNA jsme připravili cDNA z hipokampální tkáně, viz níže. Plazmidy obsahující fragment  $\beta 2$  – mikroglobulinu a také fragment panGRINI genu byly ředěny desítkovou řadou od 1 ng do 1 pg na mikrolitr ( $\mu$ l). Hipokampální cDNA vzorky a také ředěné plazmidy byly v duplikátech podrobeny kvantitativní RT-PCR amplifikaci. Relativní exprese panNR1 transkriptu byla reprezentována poměrem kvantifikace GRINI a kontrolního genu pro  $\beta 2$  – mikroglobulin. Jelikož účinnost reakce GRINI a  $\beta 2$  – mikroglobulinu byla srovnatelná, relativní kvantifikace panNR1:  $\beta 2$  – mikroglobulinu byla získána pomocí Ct metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.1.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce sestřižených variant NR1 podjednotky

Izolace mRNA ze zmražené tkáně byla provedena pomocí mRNA Direct Kitu (Chemagen, Německo) dle instrukcí od výrobce. 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. Tyto primery byly schopné identifikovat čtyři rozdílné N-konce sestřižených variant NR1 podjednotky. Ve všech reverzně transkribčních reakcích byl také zahrnut primer pro  $\beta$ -aktin (GCGCAAGTTAGGTTTGCT). Sekvence primerů byly následující:

STR1 GGTGCTCGTGTCTTTGGA

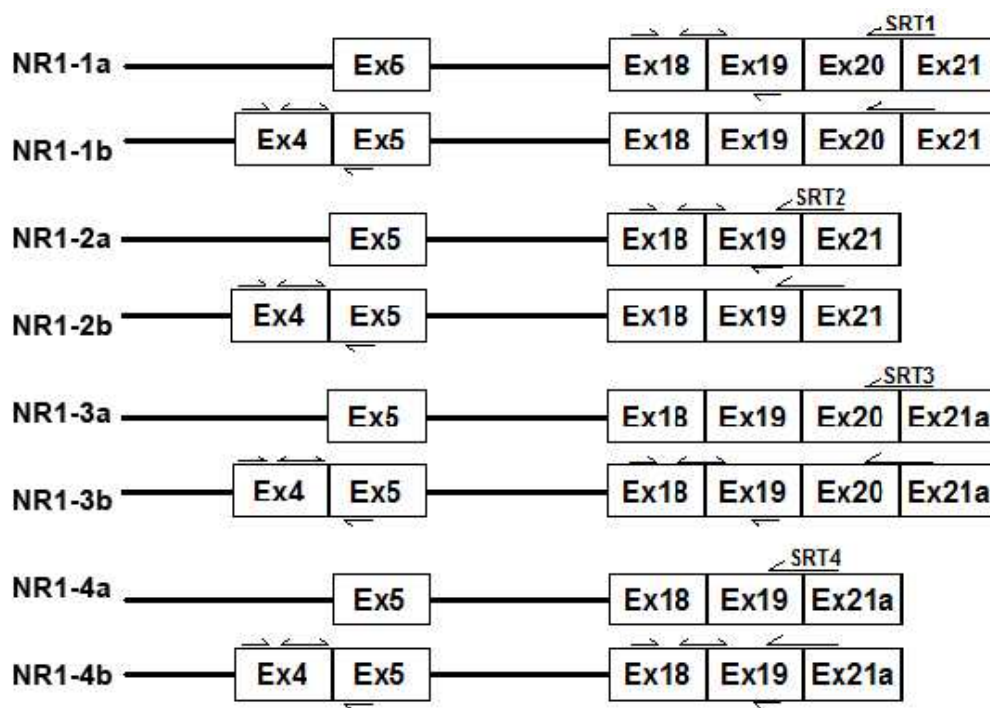
STR2 GGTGCTCTGCAGGTTCTT

STR3 GGATGGTACT GCGTGTCTT

STR4 GATGGTACTGCTGCAGGTT

Všechny reakce byly provedeny v reakční směsi (15  $\mu$ l) s ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, USA). Byly připraveny čtyři rozdílné směsi obsahující 20 pmol jednotlivých primerů STR1-4 pro reverzní transkribci a 20 pmol primerů pro  $\beta$ -aktin. Ke každé směsi bylo přidáno 4,4  $\mu$ l mRNA. Jednotlivé sestřižené varianty NR1 byly kvantifikovány pomocí RT-PCR na ABI7300 (Applied Biosystems) a detekovány TaqMan sondami a reportery FAM (pro NR1) a/nebo VIC (pro  $\beta$ -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. Toto umožnilo separátní kvantifikaci každé ze čtyř N-koncových odlišných variant NR1 podjednotky, rozlišených díky předešlé reverzní transkribci. Druhý set primery-sonda detekoval exon 4 GRINI genu, a tedy odhaloval přítomnost/nepřítomnost tohoto exonu v jednotlivých sestřižených variantách pro přehled (Obrázek 7). Pro kvantifikaci byly použity také reverzní transkripty  $\beta$ -aktinu. Relativní kvantifikace byla vypočtena pomocí komparativní Ct metody, všechny reakce byly provedeny v triplikátech. Hodnoty relativní genové exprese jednotlivých sestřižených variant byly před statistickými hodnoceními převedeny na procenta zastoupení v celkové sumě všech variant.

**Obrázek 7** Schématické znázornění jednotlivých sestřižených variant NR1 a lokalizace použitých primerů a sond. STR1-4 představují čtyři různé primery pro reverzní transkripci. Dále je vyznačena sada primery-sonda pro exon 19 a pro exon 4. Exon 21a vzniká delecí exonu 21, což má za následek nový čtecí rámec, kódující navíc jednu aminokyselinu (č.22) před následujícím stop kodómem.



#### 4.1.4 Western blot panNR1, sestřižené varianty NR1

Hipokampální tkáň byla homogenizována v lyzačním pufru viz. (3.1.3.), a z tohoto homogenátu byla následně získána hrubá synaptosomální frakce (P2) viz (3.1.3.). Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bredfordovy metody viz (3.1.3.). P2 frakce byla zředěna v Laemli pufru a nanesena na 7,5% polyakrylamidový gel a elektroforeticky rozdělena (BioRad, USA), a následně byly proteiny přebíleny na nitrocelulozovou membránu (BioRad, USA). Nespecifické vazby byly zablokovány pomocí 3% roztoku BSA v TBS-T pufru.

Následně byly membrány inkubovány přes noc v primárních protilátkách anti-NR1 (1:100, Chemicon, USA); anti-NR1C2, anti-NR1C2', anti-NR1C1, anti-NR1N (1:100, Chemikon, USA) a v protilátce pro kontrolní protein anti- $\alpha$ -tubulin (1:1,000;

Exbio, ČR) 1 h. Následně byly bloty omyty v TBS-T pufru a inkubovány 1 h v sekundárních protilátkách konjugovaných s křenovou peroxidázou (1:3,000; Dako, Dánsko). Detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního substrátu (Pierce, USA) a vyhodnocení proběhlo na analyzačním systému GelDoc (BioRad, USA).

#### **4.1.5 Statistická hodnocení**

Všechna data jsou vyjádřena jako průměry  $\pm$  SEM, není-li uvedeno jinak. Data z kvantitativní RT-PCR byla hodnocena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) s faktory diagnózy a laterality. RT-PCR sestřižených variant bylo analyzováno následně:

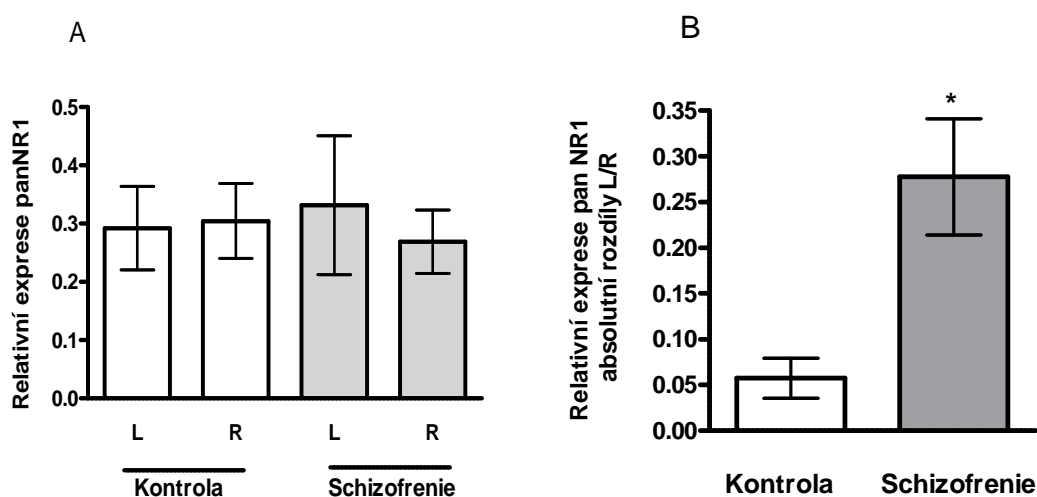
- 1) four-way ANOVA s faktory skupiny – pohlaví a diagnóza, a faktory jedince – laterality a varianta
- 2) three-way ANOVA s vyloučením faktoru pohlaví

Dále byla použita two-way ANOVA s faktorem diagnózy a varianty na podskupiny levých/pravých hipokampů, a také na individuální levo-pravé rozdíly. Expres proteinů byla hodnocena pomocí two-way ANOVA s faktory diagnózy a laterality. Pro post-hoc analýzu byl použit Student t-test. Pro zhodnocení vztahu exprese mRNA panNR1, mRNA sestřižených variant, proteinu panNR1 a NR1C2 sestřižené varianty s PMI a věkem, byl použit Spearmanův korelační koeficient.

## 4.2 VÝSLEDKY

### 4.2.1 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce pan NR1 podjednotky

Hodnotili jsme expresi panNR1 v autoptické hipokampální tkáni 13 pacientů se schizofrenií a 8 nepsychiatrických kontrol. Před statistickým hodnocením vlivu diagnózy jsme provedly korelační analýzu a nenašli jsme signifikantní asociaci mezi expresí panNR1 a věkem nebo PMI. Relativní kvantifikace panNR1 na úrovni mRNA neukázala žádný signifikantní rozdíl v expresi mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů se schizofrenií (Obrázek 8A). Avšak absolutní rozdíl exprese mRNA panNR1 v levém a pravém hipokampu byl u pacientů se schizofrenií signifikantně větší ( $T [19] = 2,67$ ;  $P = 0,0152$ ) (Obrázek 8B).



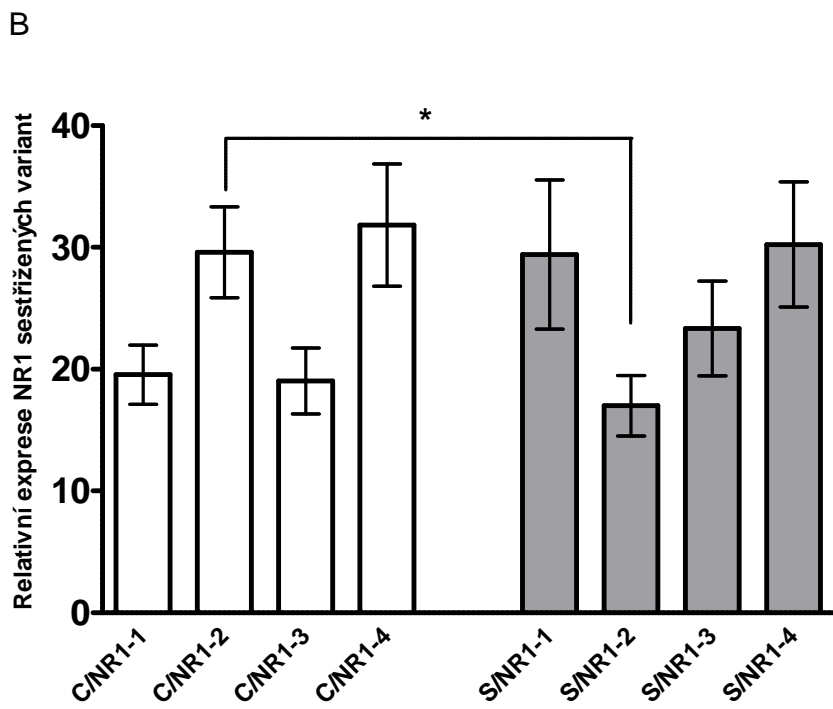
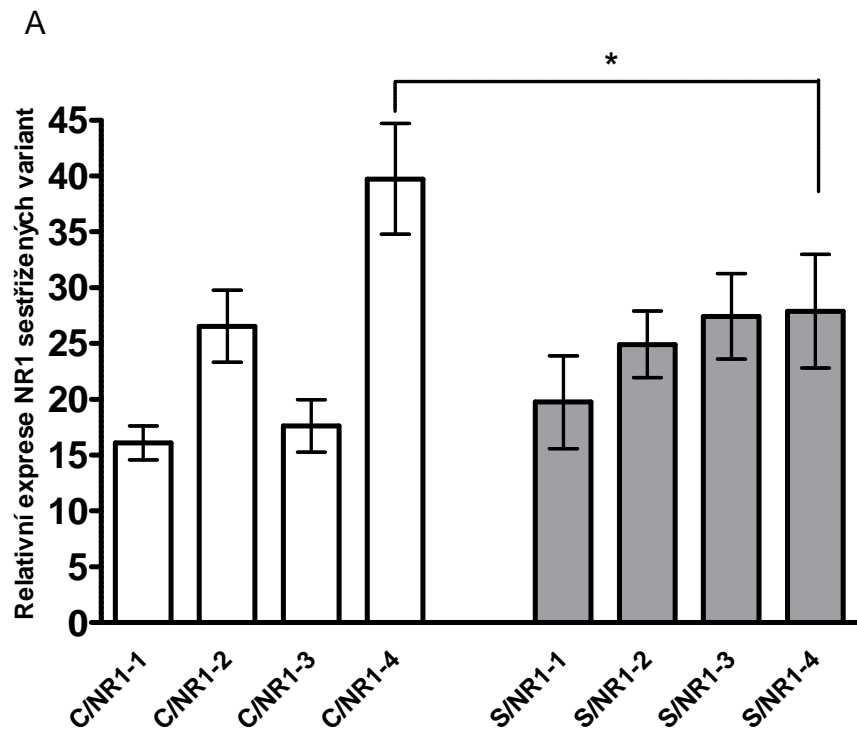
**Obrázek 8** RT-PCR kvantifikace exprese panNR1 podjednotky u pacientů se schizofrenií a kontrol.(A) hodnoty mRNA v levém a pravém hipokampu (B) absolutní rozdíl levá/pravá strana. Hodnoty jsou udány jako průměr ± SEM. \*  $P < 0,05$ .

### 4.2.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce sestřižených variant NR1 podjednotky

N1 kazeta odpovídající sestřiženým variantám NR1-1b, -2b, -3b, -4b byla exprimována ve všech vzorcích mimo tři autopsií od pacientů a jedné kontrolní. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na C koncové domény, zajímaly nás interakce těchto C koncových domén s diagnózou (DG), pohlavím, variantou a lateralitou (four-

way ANOVA). Jelikož faktor pohlaví nebyl významný, a to ani v interakci, z dalších hodnocení jsme jej vyřadili a použili three-way ANOVA. Byl zde trend interakce laterality, sestřižené varianty (NR1 -1, -2, -3, -4) a diagnózy (schizofrenie vs. kontrola), který však nedosáhl statistické významnosti ( $F [3, 60] = 2,74; P = 0,0511$ ). Oddělené analýzy levého a pravého hipokampu ukázaly signifikantní levostrannou interakci mezi faktorem sestřižené varianty a diagnózy ( $F [3, 81] = 3,23; P = 0,0267$ ). Post-hoc analýza ukázala na signifikantní pokles sestřižené varianty NR1-4 v levém hipokampu pacientů se schizofrenií oproti kontrolní skupině ( $T [27] = 2,43; P = 0,0281$ ) (Obrázek 9A). Dále zde bylo naznačeno zvýšení exprese varianty NR1-3 u schizofrenie ( $T [27] = 1,92; P = 0,0659$ ). V pravém hipokampu interakce varianty a diagnózy nedosáhla hladiny signifikantní významnosti ( $F [3, 66] = 2,41; P = 0,0744$ ). T-test ukázal na signifikantní rozdíl exprese NR1-2 varianty u pacientů a kontrol ( $T [22] = 2,99; P = 0,0067$ ) (Obrázek 9B).

Dvoucestnou ANOVU pro opakovaná měření jsme použili pro zhodnocení rozdílů laterality C-koncových izoforem u pacientů se schizofrenií a kontrolních subjektů. Interakce diagnózy a sestřižené varianty se přiblížila významnosti ( $F [3, 60] = 2,74; P = 0,0511$ ). Levo-pravé rozdíly v expresi NR1-2 varianty byly signifikantně odlišné u schizofrenie a u kontrol ( $T [20] = 2,25; P = 0,0355$ ). Izoformy obsahující kazetu C1 (N1-1; NR1-3), která je asociována s účinností NMDA indukované genové exprese (Bradley et al., 2006) a s fosforylací C konce (Tingley et al., 1993), byly více exprimovány v hipokampech pacientů, než u kontrol. V t-testu byl významný rozdíl v pravém hipokampu ( $T [22] = 2,32; P = 0,0297$ ), v levém byl nárůst u schizofrenie pouze naznačen ( $T [22] = 1,77; P = 0,0876$ ).



**Obrázek 9 RT-PCR kvantifikace exprese C koncových variant NR1 podjednotky (NR1-1, NR1-2, NR1-3, NR1-4) u pacientů se schizofrenií (S) a kontrol (C). (A) v levém hipokampu (B) v pravém hipokampu. Hodnoty jsou udány jako průměr ± SEM.**

\*  $P < 0,05$ .

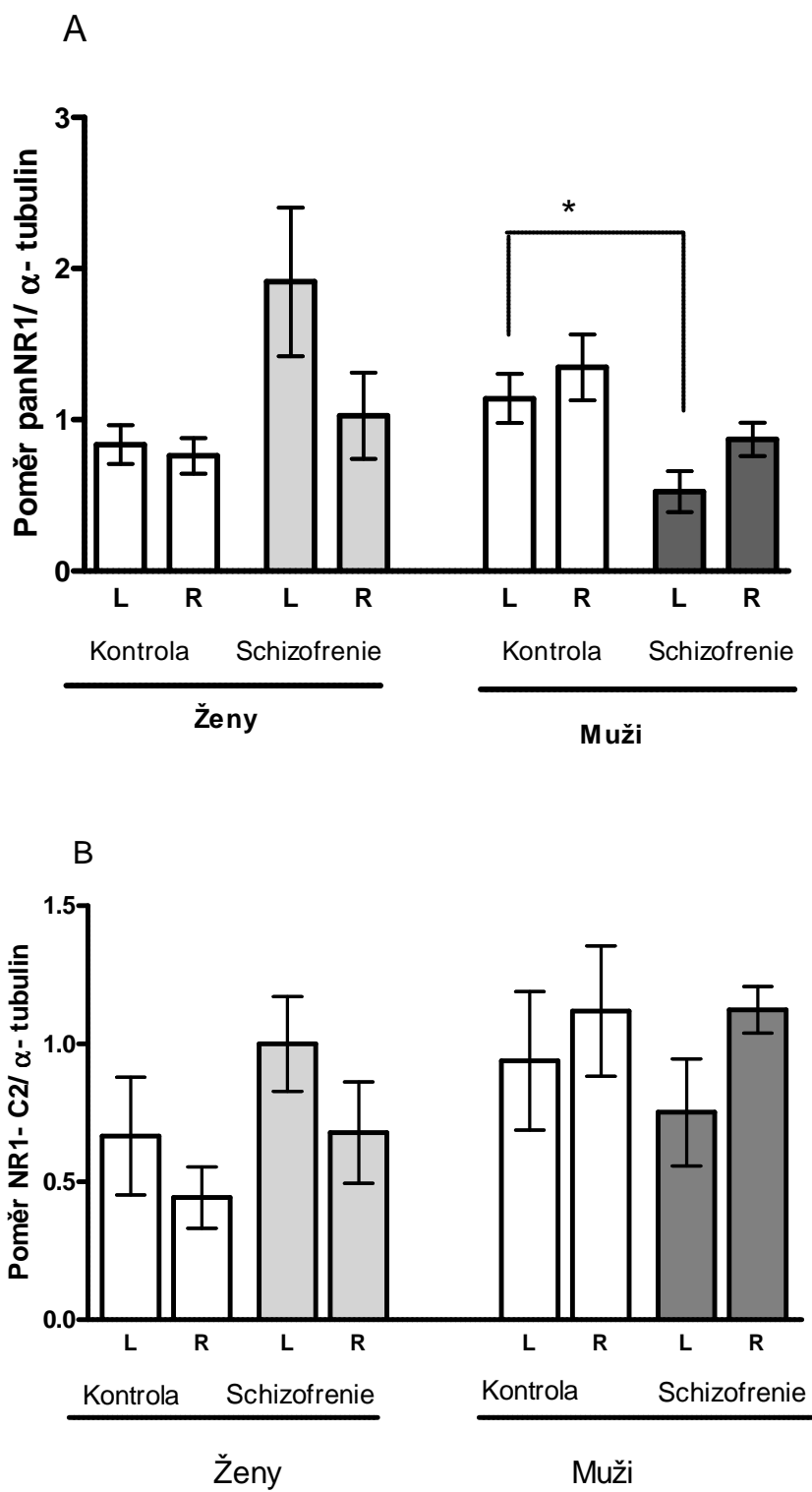
### 4.2.3 Western blot panNR1, sestřižené varianty NR1

Testovali jsme různé protokoly pro hodnocení sestřižených variant pomocí protilátek anti-NR1 C2, C2', C1, N, ale pouze pro variantu NR1<sup>C2</sup> daná protilátka reagovala s použitou lidskou tkání.

Expresi proteinů panNR1, NR1<sup>C2</sup> hodnocená jako poměr studovaných proteinů a kontrolního proteinu ( $\alpha$ -tubulin) ukázala následující výsledky. Kvantifikace panNR1 vykazala významné pohlavní rozdíly – statisticky významnou interakci laterality a pohlaví (F [1, 26] = 11,74; P = 0,0020), taktéž interakce pohlaví a diagnózy byla statisticky signifikantní (F [1, 26] = 5,82; P = 0,0232) a trojitá interakce pohlaví, laterality a diagnóza taktéž (F [1, 26] = 4,63; P = 0,0409). Rozdíly laterality mezi skupinou žen a mužů byly více vyjádřeny ve skupině pacientů se schizofrenií, než u kontrol. Oddělené analýzy ukázaly, že ve skupině mužů (schizofrenie vs. kontrola) je významný rozdíl v lateralitě (F [1, 13] = 4,78; P = 0,0477), a taktéž se projevil rozdíl mezi skupinami pacientů a kontrol (F [1, 13] = 8,91; P = 0,0105). Post-hoc test ukázal na statisticky významný rozdíl v expresi panNR1 v levém hipokampu (T [13] = 2,934; P = 0,0116) (Obrázek 10A).

Protein sestřižené varianty NR1<sup>C2</sup> ukázal statisticky významnou interakci laterality a pohlaví (F [1, 27] = 9,14; P = 0,0054) (Obrázek 10B). Ve skupině mužů vykazala exprese této varianty signifikantní laterality (F [1, 14] = 5,47; P = 0,0346), ve skupině žen tento faktor významný nebyl (F [1, 13] = 3,82; P = 0,0718). Obecně lze říci, že pacientky měly vyšší hladiny exprese panNR1, NR1<sup>C2</sup> v levém hipokampu oproti skupině kontrolních žen a pacienti měly vlevo nižší hladiny než odpovídající mužské kontroly.





**Obrázek 10** Western blot kvantifikace exprese (A) panNR1 podjednotky (B) NR1<sup>C2</sup> izoformy v hipokampech pacientů se schizofrenií a kontrol. Hodnoty jsou udány jako průměr ± SEM. \* P < 0,05.

## 4.3 DISKUZE

### 4.3.1 Hipokampální hladiny panNR1 transkriptu

V expresi mRNA panNR1 jsme u pacientů trpících schizofrenií nenašli změny oproti kontrolní skupině. Naše výsledky jsou ve shodě s dalšími studii, kde se neukázal vliv diagnózy na hladinu transkriptu panNR1, hodnocené pomocí *in situ* hybridizace v hipokampu (Beneyto et al., 2007). Další práce potom našly snížení exprese panNR1 (Gao et al., 2000), popřípadě jednostranné snížení – v levém hipokampu (Law a Deakin, 2001). Obě tyto práce použily ke stanovení hladin mRNA *in situ* hybridizaci. Tyto změny v expresi transkriptu pak neodpovídají poklesům ve vazbě ligandu do glycinového místa NMDA receptoru, které našla následující práce (Beneyto et al., 2007).

V našem souboru jsme našli zvětšený pravo-levý rozdíl v expresi panNR1 v hipokampech pacientů oproti kontrolám. Tento nálezný tedy ukazuje na význam biochemické laterality v patofyziologii schizofrenie. Asymetrické změny hipokampálních glutamátových receptorů byly dříve zmíněny jako možná manifestace odlišného zapojení temporálních laloků ve schizofrenním onemocnění (Harrison et al., 2003). Lateralizaci hipokampu u schizofrenie na úrovni biochemické, a to konkrétně mediátorového systému oxidu dusnatého, popsala práce týmu z našeho pracoviště (Křištofiková et al., 2008).

### 4.3.2 Sestřížené varianty mRNA NR1 podjednotky v hipokampu

Hodnotili jsme pouze varianty lišící se v C (cytoplazmatické) koncové doméně, jelikož N1 (extracelulární) kazeta byla exprimována kromě tří vzorků ve všech autopsiích. Tento nálezný odpovídá v animálním modelu dříve popsané regulaci sestřihu N koncové kazety v dospělém mozku (Nakanishi et al., 1992). Hodnocení jednotlivých variant ukázalo na významné snížení exprese varianty NR1-4 v levém, a varianty NR1-2 v pravém hipokampu (tyto podjednotky postrádají C1 intracelulární kazetu). Varianty obsahující C1 doménu (NR1-1 a NR1-3) byly naopak u pacientů se schizofrenií exprimovány více oproti kontrolám, a tento rozdíl byl v pravém hipokampu významný. C1 doména obsahuje hlavní fosforylační místa NR1

podjednotky (seriny 896 a 897) (Tingley et al., 1993) a fosforylace na C1 kazetě reguluje intracelulární lokalizaci podjednotky (Ehlers et al., 1995). Mutace těchto pozic pak ukazuje, že fosforylace serinových zbytků (896 a 897) je potřebná pro protein kinázou C (PKC) mediované uvolnění z endoplazmatického retikula (ER) (Scott et al., 2001). Serin 890 může být také fosforylován, a tato fosforylace ovlivňuje klastrování NR1 podjednotky (Tingley et al., 1997). Odlišná fosforylace serinů 896 a 890 různými typy PKC modeluje distribuci NMDAR v rámci buněk (Sánchez-Perez a Felipo, 2005). Našli jsme zvýšenou expresi C1 kazety ve skupině pacientů se schizofrenií, z čehož tedy vyplývá možné větší zastoupení serinů 896, 897, 890, a tedy větší příležitost pro fosforylaci. Je tedy otázkou, zdali vyšší expresní hladiny NR1-1 a NR1-3 isoformem hrají roli v regulaci fosforylace NMDAR. U C1 kazety byl nalezen ER retenční signál (RRR) a přítomnost této domény je spojena s nižší expresí variant obsahujících C1 na povrchu membrány (Standley et al., 2000). Naproti tomu C2´ kazeta obsahuje PDZ-interakční doménu, která zvyšuje expresi na povrchu (Standley et al., 2000). Sestřižené varianty s kratším C koncem (NR1-4) jsou exprimovány více na buněčném povrchu než varianty s koncem dlouhým, které zůstávají uvnitř buňky (NR1-1) (Standley et al., 2000).

Všechny změny v expresi, které jsme našli, byly unilaterální, a proto lze spekulovat, že u schizofrenie dochází k odlišným změnám v sestřihu mRNA pro NR1 v levém a pravém hipokampu. C konec také zodpovídá za vazbu NR1/NR2 heterodimerů do postsynaptické density, a to konkrétně za asociaci k proteinu postsynaptické density 95 (PSD-95) (Rutter et al., 2002). Dále pak regulace alternativního sestřihu panNR1 a asociace NMDA receptorů s PSD-95 ovlivňuje schopnost exprese NMDA receptoru na buněčném povrchu, a pravděpodobně tedy molekulární organizaci, a s tím i účinnost excitační postsynaptické membrány (Rutter et al., 2002). Toto jsou tedy mechanismy, které uvažují hypofunkci NMDA receptorů, nicméně nejsou spojené se snížením vlastního počtu receptorů.

### 4.3.3 Exprese proteinu panNR1 a NR1<sup>C2</sup> varianty v hipokampu

Proteinová exprese panNR1 vykazala ve skupině pacientů se schizofrenií (jak žen, tak mužů) významnější lateralitu než v kontrolních souborech, tento nálezn je ve shodě s našimi výsledky v expresi transkriptu panNR1. Dále naše výsledky ukázaly snížení panNR1 v levém hipokampu pacientů mužů, což odpovídá dříve popsanému levostrannému snížení v expresi transkriptu v gyrus dentatus a v oblasti CA3 (Law a Deakin, 2001). Další práce potom našla pokles mRNA panNR1 v gyrus dentatus (Gao et al., 2000). In vivo bylo nalezeno signifikantní snížení vazby NMDA receptoru v levém hipokampu pacientů se schizofrenií, kteří neměli antipsychotickou léčbu, oproti kontrolním subjektům (Pilowsky et al., 2006). Jedním z vysvětlení větší vulnerability mužských mozků může být pozdější lateralizace a nedostatek estrogenové ochrany (Leung a Chue, 2000). Exprese panNR1 i NR1<sup>C2</sup> varianty vykazaly významnou interakci laterality a pohlaví. Izoforma NR1<sup>C2</sup> však nepotvrdila vztah exprese s diagnózou, stejně jako tomu bylo ve dříve publikované práci (Kristiansen et al., 2006), kde hodnotili expresi NR1<sup>C2</sup> v DLPFC a v ACC. Naše výsledky ukazují na význam biochemické laterality a také na významné pohlavní rozdíly v expresi těchto proteinů u schizofrenie. Vztahovat je k estrogenové hypotéze schizofrenie je ovšem díky věku pacientek, které jsme měli v souboru, poněkud diskutabilní.

Omezující skutečnosti práce jsou uvedeny v publikaci (Vrajová et al., 2010). Výsledky byly publikovány v časopise s IF Neurochemistry Research (Vrajová et al., 2010) a v časopise Psychiatrie (Vrajová et al., 2010) (viz Seznam publikací).

## **5 BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 „SILENCING“**

Gen pro regulátor G proteinové signalizace 4 (RGS4) byl dříve popsán ve vztahu ke schizofrenii (Mirnics et al., 2001). Snížená exprese tohoto genu byla opakovaně nalezena v různých strukturách mozku post mortem u pacientů se schizofrenií (Bowden et al., 2007). Dále bylo ukázáno, že změny exprese RGS4 jsou specifické, jelikož u dalších RGS významné změny nalezeny nebyly (Mirnics et al., 2001). Ve farmakologickém modelu používajícím antagonistu NMDA receptoru - PCP bylo ukázáno na funkční interakci mezi RGS4, 5-HT1A a NMDA signalizací v neuronech PFC (Gu et al., 2007). Tato práce ukázala, že jednou z funkcí RGS4, která může vysvětlovat jeho roli v patofyziologii schizofrenie, je spojení s 5-HT1A receptory, přičemž vztah serotoninového 5-HT1A receptoru k inhibici funkce NMDA kanálu je znám již déle (Yuen et al., 2005). Při použití amfetaminu v animálním modelu bylo ukázáno, že hladiny mRNA i proteinu RGS4 jsou pod kontrolou dopaminergních receptorů D1 a D2 (Schwendt et al., 2006). 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.

### **5.1 MATERIÁL A METODY**

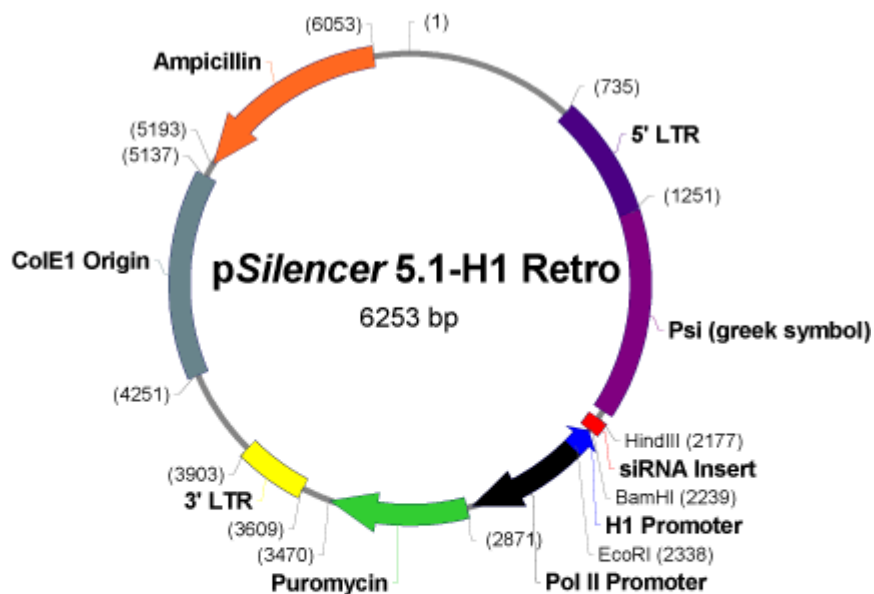
#### **5.1.1 Neuroblastomová buněčná linie**

Byly použity primární neuronální buňky z American Type Culture Collection (ATCC; CRL-10442 a CRL-10742). Jelikož kultivace těchto buněk byla opakovaně neúspěšná (docházelo k předčasné senescenci a tedy k buněčné smrti), zvolili jsme pro naše experimenty 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 (Tabulka 6). Pro stabilní silencing jsme použili retrovirový vektor pSilencer 5.1-H1 Retro (Ambion, UK) (Obrázek 11). Takto připravené

konstrukty jsme pomocí metody teplotního šoku vpravily do buněk E. Coli. K izolaci plazmidu byla použita fenolchloroformová extrakce. Verifikace všech siRNA Retro konstruktů připravených pro transfekci byla provedena pomocí sekvenování. Scrambled siRNA klonovaná taktéž v pSilencer 5.1-H1 Retro vector (Ambion, UK) byla použita jako kontrola pozadí. Transfekce BE(2)-C byla provedena pomocí FuGene Reagent (Roche, Německo) podle doporučení výrobce. Buňky jsme kultivovali při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> v mediu DMEM (Sigma, Německo) doplněný o 10% fetální hovězí sérum (FCS) (Gibco, UK) a glutamin (Sigma, Německo). Dva dny před sklizením buněk pro následující experimenty (microarray) měly buňky densitu 100,000/ml. Po sklizení byly buňky opláchnuty v PBS (Sigma, Německo) a lyzovány v TriZol (Sigma, Německo). Lyzáty byly následně použity pro izolaci RNA, která byla provedena dle doporučení výrobce. Pro microarray byl použit vždy 1 mikrogram celkové RNA, dle protokolu výrobce. 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  $\beta$ 2 mikroglobulín.

**Tabulka 6** Sekvence siRNAs pro silencing lidského RGS4 v buněčné linii BE(2)-C

RGS4 siRNA 1 S: 5'-GATCCACATCGGCTAGGTTTCCTGTTC AAGAGACAGGAAACCTAGCCGATGTTTTTTGGAAA-3'
RGS4 siRNA 1 AS:5'-AGCTTTTCCAAAAAACATCGGCTAGGTTTCCTGTCTCTTGAACAGGAAACCTAGCCGATGTG-3'
RGS4 siRNA 2 S:5'-GATCCGTTCTTCCCACAACAAGAAGTTCAAGAGACTTCTTGTGTGGGAAGAATTTTTGGAAA-3'
RGS4 siRNA 2 AS:5'-AGCTTTTCCAAAAAATCTTCCCACAACAAGAAGTCTCTTGAACCTTGTGTGTGGGAAGAACG-3'
RGS4 siRNA 3 S:5'-GATCCGATTGACTTCTGGATCAGCTTCAAGAGAGCTGATCCAGAAGTCAATATTTTTGGAAA-3'
RGS4 siRNA 3 AS: 5'-AGCTTTTCCAAAAAATATTGACTTCTGGATCAGCTCTCTTGAAGCTGATCCAGAAGTCAATACG-3'
RGS4 siRNA 4 S: 5'-GATCCGTCTCGATTCTATCTTGATTTC AAGAGAATCAAGATAGAATCGAGACTTTTTTGGAAA-3'
RGS4 siRNA 4 AS:5'-AGCTTTTCCAAAAAAGTCTCGATTCTATCTTGATTCTCTTGAATCAAGATAGAATCGAGACG-3'



**H1 Promoter 2247-2346**  
**siRNA Insert 2181-2242**  
**Ampicillin 5193-6053**  
**Pol II Promoter 2351-2856**  
**Puromycin 2871-3470**  
**ColE1 Origin 4251-5137**  
**5' LTR 735-1251**  
**3' LTR 3609-3903**  
**Psi (greek symbol) 1250-2141**

**Obrázek 11** Vektorová mapa pSilencer 5.1-H1 Retro

### 5.1.2 Microarray

Efekt rozdílné exprese RGS4 v modelové buněčné linii 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>). Hrubá data z microarray byla normalizována a sumarizována na transkripční hladinu za použití Expresní Konsole a standardní anotace poskytované Affymetrix. Takto upravená data byla importována do R projekt softvéru. Pomocí počítačového softvéru Biokonductor byla provedena kontrola kvality dat a taktéž identifikace odlišně exprimovaných transkriptů v jednotlivých BE(2)-C liniích s odlišnými hladinami exprese RGS4. Vybrali jsme transkribty, které vykazaly vysokou expresní variabilitu napříč všemi arrays, použité kritérium byl interval 0,5 v log<sub>2</sub> stupnici. Z přefiltrovaných dat jsme pro všechny vzorky vypočítali matici v

Eukleidovském prostoru, dále jsme provedli hierarchické klastrování pro identifikaci outlierů. Stejný hierarchický dendrogram byl použit pro definování podskupin RGS4 mutantních BE(2)-C linií představujících stejné expresní profily. Pouze geny, exprimované minimálně v jedné z těchto skupin, byly použity k dalším analýzám. Ve filtrovaných datech jsme zhodnotili rozdíly v expresi za použití moderovaného t-testu ze sady programů Limma (Bioconductor softvér), použití těchto upravených t-testů bylo zvláště výhodné pro srovnávání skupin, kde byl malý počet replikátů. Mnohonásobné testovací korekce byly provedeny pomocí metody Benjamini a Hochberg.

## 5.2 VÝSLEDKY: BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 SILENCING

Získali jsme jedenáct linií, které vykazovali odlišné hladiny genové exprese RGS4. Exprese RGS4 byla v intervalu od 3,1 % do 123 % vztažena k parentální buněčné linii. Dvě linie, které vykazovaly minimální změnu oproti parentální linii (linie 4; 86,7 %; linie 8; 123 %) byly použity jako pozadí. Celkem jsme tedy získali devět linií se sníženou expresí RGS4: linie 1, 3,1 %; 2, 25,8 %; 3, 8,7 %; 5, 37,9 %; 6, 62,3 %; 7, 41,9 %; 9, 22,3 %; 10, 25,8 %; 11, 69,4 %). Celogenomový profil jsme hodnotili na těchto liniích. V jednom experimentu jsme zaznamenali zvýšení exprese indukované pomocí siRNA, toto je celkem unikátní, nicméně známý fenomén, který je způsoben interakcí siRNA s její cílovou sekvencí.

U buněčných linií se sníženou expresí RGS4 jsme našli 67 odlišně exprimovaných genů, které naplnily kriteria (viz 5.1.2.). Z těchto 67 genů mělo 30 genů zvýšenou expresi a 37 sníženou expresi v porovnání s parentální buněčnou linií (Tabulka 7). Ke klastrování jsme použili databázi DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang et al., 2009). Nalezli jsme dvě funkční skupiny genů, přičemž jednu skupinu tvořily geny pro histony, konkrétně se jednalo o pět genů, všechny vykazovaly zvýšenou expresi oproti parentální linii. V druhé skupině byly geny pro transkripční faktory (TF), sedm genů: čtyři se zvýšenou expresí, tři se sníženou expresí.

Ostatní odlišně exprimované geny tvořily heterogenní skupinu, která zahrnovala geny, jež byly dříve popsány v souvislosti se schizofrenií. Konkrétně se



jednalo o tři geny se zvýšenou expresí: metallothionein (MT2A), ribonukleasu A (RNASE1) a G-protein vázající receptor 50 (GPR-50). Dalším genem spojeným s G-proteiny, který měl změněnou (zde zvýšenou) expresi následkem siRNA, byl gen pro GPR64. Také jsme našli změny v expresi dvou genů, jejichž vztah ke schizofrenii byl již dříve studován, ale nepotvrzen. Jednalo se o gen pro CD99 protein (Ross et al. 2003) a o gen pro abnormal spindle-like microcephaly-associated (ASPM). U ASPM byly ve vztahu ke schizofrenii studovány jednonukleotidové polymorfismy (Rivero et al. 2006). V této heterogenní skupině pak byly geny, jejichž produkty mají funkční potenciál směrem ke schizofrenii: solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), calcium binding 39-like (CABL) a S100 calcium binding protein A4 (S100A4).

**Tabulka 7** Geny se změněnou expresí v buněčných liniích BE (2) –C ovlivněných siRNA pro RGS4. **Legenda:** \*\* Histony; \*\*\* Transkripční faktory; † Popsán vztah ke schizofrenii; ‡ Vztah ke schizofrenii nebyl potvrzen; • Geny, jejichž produkty mají funkční potenciál pro schizofrenii, ale vztah s tímto onemocněním nebyl dříve popsán. Logaritmus změny násobku (logFC), plusové hodnoty znamenají zvýšení exprese, minusové hodnoty snížení exprese, adjustovaná P hodnota (adj.P.Val).

Gene.Symbol	Chromosomal		logFC	adj.P.Val
	region	Annotation		
LRP1	12q13-q14	Low density lipoprotein-related protein 1	-2.14	0.001
LGR5	12q22-q23	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	-2.44	0.026
VEGFA	6p12	Vascular endothelial growth factor A	-2.44	0.001
CCPG1	15q21.1	Cell cycle progression 1	-2.57	0.001
LTB4DH	9q31.3	(PTGR1) Prostaglandin reductase 1	-2.60	0.001
EGR1***	5q31.1	Early growth response 1	-2.70	0.001
CRH	8q13	Corticotropin releasing hormone	-2.72	0.001
TAGLN2	1q21-q25	Transgelin 2	-2.74	0.001
LUM	12q21.3-q22	Lumican	-2.74	0.001
ATF5***	19q13.3	Activating transcription factor 5	-2.79	0.001
INHBE	12q13.3	Inhibin, beta E	-2.85	0.001
TRIB3	20p13-p12.2	Tribbles homolog 3	-2.89	0.001
KCNG1	20q13	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	-2.95	0.001
P4HA2	5q31	Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	-2.96	0.002

### Chromosomal

Gene.Symbol	region	Annotation	logFC	adj.P.Val
ARHGEF2	1q21-q22	Rho/rac guanine nucleotide exchange factor	-2.97	0.001
DDIT3 ***	12q13.1-q13.2	DNA-damage-inducible transcript 3	-3.01	0.001
CRABP2	1q21.3	Cellular retinoic acid binding protein 2	-3.03	0.001
TRPA1	8q13	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1	-3.14	0.001
SLC7A11•	4q28-q32	Cationic amino acid transporter, member 11	-3.16	0.001
ASS1	9q34.1	Argininosuccinate synthetase 1	-3.18	0.001
CD99‡	Xp22.32	CD99 protein	-3.19	0.002
CD99	Yp11.3	CD99 protein	-3.19	0.002
GDF15	19p13.11	Growth differentiation factor 15	-3.23	0.001
ARG2	14q24.1-q24.3	Arginase, type II	-3.24	0.001
DDIT4	10pter-q26.12	DNA-damage-inducible transcript 4	-3.29	0.007
LOC340274	7		-3.38	0.008
STC2	5q35.1	Stanniocalcin 2	-3.40	0.001
C1orf51	1q21.2	Chromosome 1 open reading frame 51	-3.65	0.999
SERPINE2	2q33-q35	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2	-3.67	0.001
GPR64 †	Xp22.13	G protein-coupled receptor 64	-3.83	0.001
CHAC1	15q15.1	ChaC, cation transport regulator homolog 1	-3.83	0.001
TM6SF1	15q24-q26	Transmembrane 6 superfamily member 1	-4.00	0.001
CENPI	Xq22.1	Centromere protein I	1.95	0.001
HIST1H2BH **	6p21.3	Histone cluster 1, H2bh	1.96	0.003
GINS2	16q24.1	GINS complex subunit 2	1.96	0.001
GPR50 †	Xq28	G protein-coupled receptor 50	1.97	0.207
ABCA12	2q34	ATP-binding cassette, sub-family A, member 12	1.97	0.001
SPAG5	17q11.2	Sperm associated antigen 5	1.98	0.001
SNAI2 ***	8q11	Snail homolog 2	1.99	0.001
DLG7	14q22.3	Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	1.99	0.001
HIST2H2AB **	1q21	Histone cluster 2, H2ab	2.01	0.002
POLE2	14q21-q22	Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	2.01	0.001
KIF18A	1q14.1	Kinesin family member 18A	2.03	0.001
ASPM ‡	1q31	Abnormal Spindle-like, microcephaly-associated	2.03	0.002
HIST1H2BF **	6p21.3	Histone cluster 1, H2bf	2.04	0.001
NMU	4q12	Neuromedin U	2.06	0.038
PARVA	11p15.3	Parvin alpha	2.07	0.001
RNASE1†	14q11.2	Ribonuclease, RNase A family, 1	2.10	0.999
PAC1	7p14	Adenylate cyclase-activating polypeptide 1 Receptor typ 1	2.11	0.006
SHCBP1	16q11.2	SHC SH2-domain binding protein 1	2.11	0.001
FAM111B	11q12.1	Family with sequence similarity 111, member B	2.15	0.001
TYMS	18p11.32	Thymidylate synthetase	2.17	0.001
S100A4 •	1q21	S100 calcium binding protein A4	2.19	0.001
C15orf42	15q26.1	Chromosome 15 open reading frame 42	2.24	0.001
MAGEC2	Xq27	Melanoma antigen family C, 2	2.27	0.329
CAB39L •	13q14.2	Calcium binding protein 39-like	2.28	0.032

<b>Chromosomal</b>				
<b>Gene.Symbol</b>	<b>region</b>	<b>Annotation</b>	<b>logFC</b>	<b>adj.P.Val</b>
MT2A †	16q13	Methallothionein	2.28	0.001
ID2 ***	2p25	Inhibitor of DNA binding 2	2.45	0.002
SCGN	6p22.3-p22.1	Secretagogin, EF-hand calcium binding protein	2.53	0.001
GCA	2q24.2	Grancalcin, EF-hand calcium binding protein	2.54	0.001
HIST1H2BM **	6p22-p21.3	Histone cluster 1, H2bm	2.56	0.001
HIST1H2AB **	6p21.3	Histone cluster 1, H2ab	2.59	0.001
ID1 ***	20q11	Inhibitor of DNA binding 1	2.83	0.002
TMSL8	Xq21.33-q22.3	Thymosin beta 15a	2.95	0.001
GNG11	7q21	Guanine nucleotide binding protein, gamma 11	3.03	0.012
ID3 ***	1p36.13-p36.12	Inhibitor of DNA binding 3	3.08	0.001
DGKK	Xp11.22	Diacylglycerol kinase, kappa	3.52	0.001
MSN	Xq11.2-q12	Moesin	4.70	0.001

### 5.3 DISKUZE: BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 SILENCING

Umlčení exprese RGS4 v neuroblastomové buněčné linii pomocí siRNA vyvolalo významné změny v expresích 67 genů, tuto skupinu lze rozdělit na dvě funkční podskupiny: histony, transkripční faktory a třetí heterogenní skupinu genů. Nepotvrdili jsme vztah snížené exprese RGS4 s expresní změnou genů přímo spojených s neurotransmitterovými systémy (dopaminovým, glutamatergním, serotonergním, atd.), které jsou nedílnou součástí patofyziologie schizofrenie.

Zvýšená exprese genů pro histonové klastry H2A/B v naší práci odkazuje k histonovým modifikacím, jež reprezentují epigenetický mechanismus spojený s patologií prefrontálního kortexu u schizofrenie (Akbarian et al., 2005). O posttranslačních modifikacích (PTMs) spojených s histony H2A/B, jako je acetylace, fosforylace, sumoylace a ubiquitinace je známo, že ovlivňují genovou transkripci (Berger et al., 2007). Lze tedy spekulovat, zda zvýšená exprese H2A/B v našich neuroblastomových buňkách nemůže zesilovat tyto PTMs.

Další funkční skupina genů, jejichž exprese byla ovlivněna umlčením RGS4, jsou geny pro transkripční faktory (TF), které jsou obecně spojovány s rakovinnými onemocněními (Janoueix-Lerosey et al., 2010). A proto může být nález změněné exprese genů pro TF v naší práci vedlejším jevem použití neuroblastomové buněčné

linie. Jeden z genů, který byl následkem RGS4 silencingu v buněčné linii utlumen, je gen pro early growth response 1 (ERG1), patřící do rodiny immediate early gene (IEG), které mohou hrát důležitou roli v učení se a v paměti (Bozon et al., 2003). Dále pak bylo u myši s delecí brain derived neurotrophic factor (BDNF) nalezeno snížení exprese RGS4 a EGR1 (Glorioso et al., 2006). Na základě těchto informací předpokládáme, že mezi expresí RGS4 a IEG může být interakce. Další gen ze skupiny TF, jehož exprese byla změněna (zde snížena), byl gen pro Activating Transcription Factor 5 (ATF5), jehož proteinový produkt se váže na disrupted in schizophrenia 1 (DISC1), což jej tedy spojuje s patofyziologií schizofrenie.

Třetí, heterogenní skupina, obsahuje některé geny, které byly dříve asociovány se schizofrenií. V liniích se sníženou expresí RGS4 jsme našli nadexprimovaný gen pro metallothionein (MT2A). Vzhledem k tomu, že k fyziologickým funkcím tohoto proteinu v CNS patří regenerace a neuroprotektce (West et al., 2008), může být zvýšená exprese genu pro tento protein kompenzací nedostatku RGS4. Zvýšení exprese genu pro MT2A bylo u schizofrenie popsáno v prefrontálním a temporálním kortexu post mortem (Arion et al., 2007; Aston et al., 2004). Gen pro RNASE1 byl po RGS4 silencingu nadexprimován, zatímco v předešlých studiích bylo nalezeno naopak snížení post mortem v temporálním kortexu pacientů se schizofrenií (Aston et al., 2004) a v DLPFC starších pacientů s chronickou schizofrenií (Hakak et al., 2001). Dále byla námi nalezená zvýšená exprese genu pro GPR50 popsána ve vztahu ke schizofrenii a bipolární poruše (Kato, 2007), taktéž byla nalezena asociace se SNPs tohoto genu. Vztah RGS4 a dalších G-proteiny vázajících receptorů, které jsou hlavními participanty neuromodulace membránové excitability, byl již dříve popsán (Jaén a Doupnik, 2006). GPR50 je receptor spojený s melatoninem, nicméně melatonin neváže a endogenní ligand receptoru není znám, receptor se chová jako antagonist melatoninového receptoru MT1 (Levoye et al., 2006). Inhibice MT1 receptoru je zprostředkována díky heterodimerizaci MT1 a GPR50, s tím, že tendence k formování těchto heterodimerů závisí na expresi obou receptorů. Jestliže je MT1 vázán do heterodimeru MT1/GPR50, ztrácí svoji schopnost vázat specifické agonisty (Levoye et al., 2006). V buněčných liniích se sníženou expresí RGS4 byl nadexprimován ještě další receptor, a to adenylate cyclase-activating polypeptide 1 receptor 1 (ADCPYAP1R1; PAC1). PAC1 je G-protein vázající receptor, a jeho ligand je neuropeptid s aktivitou modulátoru neurotransmise. Jak tento receptor, tak jeho

ligand, byly dříve popsány jako kandidátní geny pro schizofrenii (Hashimoto et al., 2007). Další dva geny (S100A4, CAB39L), které byly následkem siRNA proti RGS4 nadexprimovány, kódují vápník vázající proteiny, které ovlivňují různé reakce v rámci drah transdukovaných vápníkovým signálem. Příbuzný protein S100B byl dříve popsán jako marker systémového zánětu (Sen a Belli, 2009), a taktéž bylo popsáno zvýšení tohoto proteinu v séru pacientů se schizofrenií (Schroeter et al., 2009). Gen pro SLC7A11, jehož exprese byla v siRNA ovlivněných buněčných liniích snížena, má proteinový produkt, který patří k aminokyselinovému transportnímu systému specifickému pro cystein a glutamát. SLC7A11 může být tedy součástí poškození glutamatergní dráhy, která jsou spojována s patofyziologií schizofrenie.

Přesto, že jsme tuto studii provedli na neuroblastomové buněčné linii, a ne na primární neuronální linii, která by jistě lépe kopírovala situaci in vivo, naše výsledky mohou vnést trochu světla do objasnění významu RGS4 v patogenezi schizofrenie.

Výsledky byly publikovány v časopise s IF *Neuroendocrinology letters* (Vrajová et al., 2011) (viz Seznam publikací).

## **6 ZÁVĚR: Vymezení úlohy NR1 podjednotky NMDA receptoru v patofyziologii schizofrenie**

### **6.1 ANIMÁLNÍ MODEL – BLOKACE NMDA RECEPTORU**

V animálním modelu jsme nepotvrdili vliv krátkodobého nebo dlouhodobého hipokampálního ovlivnění podjednotek NMDA receptoru (NR1, NR2A, NR2B) na somatosensorický gaiting (PPI). Důvodem negativních výsledků mohla být malá účinnost blokace podjednotek receptoru, která byla nižší, než popisovala starší práce používající aODN (Inada et al., 2003). 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. Je tedy možné, že exprese PSD-95 reaguje na potlačení exprese NR2 rychleji než samotné podjednotky. U exprese podjednotek mohou existovat daleko robustnější kompenzační mechanismy, které jsou schopné krátkodobé poškození exprese potlačit, a tudíž se množství NR2 podjednotek v membránové frakci významně nemění. Když se podíváme do našich výsledků, všimneme si, že ač se mezi skupinami exprese NR2A podjednotky významně nelišila, v post-hoc analýze byl ve skupině s aplikací aNR2A pokles tohoto proteinu oproti kontrole u skupiny aNR2B a u exprese NR2B se změna neprojevila. Náš výsledek odpovídá tomu, co bylo publikováno (Bard et al., 2010). Zmíněná práce popsala *in vitro*, že přemísťování NR2A ze synaptické membrány vyvolá kompenzační zvýšení NR2B podjednotky v membráně.

Hipokampální exprese PSD-95 a podjednotek NMDA receptorů se během postnatálního vývoje potkává mění (Ling et al., 2012). Je tedy možné, že vztahy mezi expresí PSD-95 a podjednotkami NMDA receptoru měnící se v rámci vývoje mohou být zapojeny do patofyziologie schizofrenie.

## 6.2 STUDIE POST MORTEM – EXPRESE NR1 PODJEDNOTKY

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 byl významný nález poklesu exprese proteinu panNR1 v levém hipokampu pacientů mužů, což je ve shodě s publikovanými daty (Law a Deakin, 2001), kde ovšem měli smíšenou skupinu, v níž převažovali muži. Navíc hipokampy nebyly v párech, tedy levý a pravý od téhož pacienta. Opřít tento výsledek o estrogenovou hypotézu je díky věku pacientek problematické. Práce, která hodnotila pohlavní rozdíly v expresi NR1 podjednotky v míše po aplikaci NMDA antagonisty u mláďat po odstavení od matek, ukázala na větší množství NR1 pozitivních buněk u samic než u samců (Schlenker a Hansen, 2007). Na základě této práce bychom mohli spekulovat, že muži jsou na poškození NMDA receptorů (NR1 podjednotky) citlivější, a že tato citlivost se uplatňuje již velice brzo během vývoje, a tudíž nutně nemusí souviset s hormonální odlišností obou 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 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. Zdá se, že dochází k odlišným změnám sestřihu panNR1v levém a pravém hipokampu pacientů. 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. Nedávno publikovaná práce (Segnitz et al., 2011), která se zabývá vlivem chronického podání aripiprazolu na expresi podjednotek NMDA receptoru v animálním modelu, ukázala na zvýšení exprese mRNA NR1 NR2A, NR2D podjednotek po 4 týdenním podání v hipokampálních oblastech, a tedy na změnu v podjednotkovém uspořádání NMDA receptorů.

### 6.3 BUNĚČNÁ LINIE – RGS4 „SILENCING“

Vliv snížené exprese genu pro RGS4 na expresi genů neurotransmitterových drah, jejichž dysfunkce jsou podkladem patofyziologie schizofrenie, jsme nepotvrdili. V neuroblastomové línii se sníženou expresí RGS4 jsme našli 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 potom patří k transkripčním faktorům. Tato skupina je diskutabilní vzhledem k použité buněčné línii, 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 neuroprotektce. 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 ukazují na úrovní genů na možné vztahy snížené exprese RGS4 s dalšími drahami, jejichž význam v patofyziologii schizofrenie však není znám.

U pacientů se schizofrenií bylo post mortem v prefrontálním kortexu nalezeno zvýšení exprese metabotropního glutamatergního receptoru skupiny I (mGluR1) a zároveň snížení exprese RGS4 (Volk et al., 2010). Je tedy možné, že nižší expresní hladina RGS4 a vyšší hladina mGluR1 může podporovat signalizaci přes mGluR1 receptory. Vyšší aktivita mGluR1 pak může fungovat jako kompenzační mechanismus NMDA hypofunkce u schizofrenie (Volk et al., 2010). Z našich výsledků však vyplývá, že snížení exprese RGS4 pravděpodobně není příčinou změny exprese mGluR1 receptorů. Sníženou expresí RGS4 lze na základě našich výsledků považovat spíše za následek předcházejících biochemických změn spojených s průběhem nemoci.



## 7 LITERATURA

1. Addington J, Leriger E, Addington D. Symptom outcome 1 year after admission to an early psychosis program. *Can J Psychiatry* 2003; 48: 204–207.
2. Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A., Trinh D, Hetric WP, Potkin SG, Sandman CD, Bunney WJ, Jones EG. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 1996;16: 19-30.
3. Akbarian S, Ruehl MG, Bliven E, Luiz LA, Peranelli AC, Baker SP, et al. Chromatin alterations associated with down-regulated metabolic gene expression in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62(8): 829–40.
4. Akbarian S. The molecular pathology of schizophrenia – Focus on histone and NMDA modification. *Brain Res Bulletin* 2010; 83: 103 – 107.
5. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 2008; 40: 827–834.
6. Andersen NC, Paradiso S, O’Leary DS. „Cognitive dysmetria“ as an integrative theory of schizophre: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry? *Schizophr Bull* 1998; 24(5): 203-218.
7. Arion D, Unger T, Lewis DA, Levitt P, Mirnics K. Molecular evidence for Increased Expression of Genes Related to immune and Chaperone Function in the Prefrontal cortex in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 711–21.
8. Aston C, Jiang L, Sokolov PB. Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J Neurosci Res* 2004; 77: 858–866.
9. Bakshi VP, Geyer MA. Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the noncompetitive NMDA antagonist, dizocilpine. *J Neurosci* 1998;18: 8394-8401.
10. 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.

11. Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447: 407–412.
12. Behrens MM, Ali SS, Dao DN, Lucero J, Shekhtman G, Quick KL, Dugan LL. Ketamine-induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. *Science* 2007; 318: 1645–1647.
13. Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A et al. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1888–1902.
14. Bleuer E. *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Leipzig und Wien: Deuticke F. 1911.
15. Bondi C, Matthews M, Moghaddam B. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Curr Pharm Design* 2012; 18: 1593-1604.
16. 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.
17. Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S, Laroche S. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Phil Trans R Soc B.* 2003; 358: 805–814.
18. Bradley J, Carter SR, Rao VR, Wang J, Finkbeiner S. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci.* 2006; 26: 1065–1076.
19. Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* 1998; 20: 70–73.
20. Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology.* 1978; 15: 339-343.
21. Bubeníková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T, Dockery C. The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801- disrupted sensorimotor gating. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 80: 591-596.

22. 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.
23. Buckholtz JW, Meyer-Lindenberg A, Honea RA, Straub RE, Pezawas L, Egan M F, et al. Allelic variation in RGS4 impacts functional and structural connectivity in the human brain. *J Neurosci* 2007; 27(7): 1584–1593.
24. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry* 2002; 159 (7): 1080–1092.
25. Carter CL, Chung CS. Segregation analysis of schizophrenia under a mixed genetic model. *Hum Heredity* 1980; 30 (6): 350–356.
26. Cheli V, Adrover M, Blanco C, Ferrari C, Cornea A, Pitossi F, Epstein AL, Jerusalinsky D. Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning. *J Neurochem* 2006; 97: 68-73.
27. Cherlyn SYT, Woon PS, Liu JJ, Ong WY, Tsai GCh, Sim K. Genetic association studies of glutamate, GABA and related genes in schizophrenia and bipolar disorder: A decade of advance. *Neurosci Behav Rev* 2010; 34: 958-977.
28. Chowdari KV, Bamne M, Joel W, Talkowski ME, Mirnics K, Levitt, et al. PLinkage Disequilibrium Patterns and Functional Analysis of RGS4 Polymorphisms in Relation to Schizophrenia. *Schizophr Bull* 2008; 34: 118– 26.
29. Clair DSt, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 1990; 336 (8706): 13–16.
30. Clinton SM, Meador-Woodruff JH. Abnormalities of the NMDA receptor and associated intracellular molecules in the thalamus in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1353-1362.
31. Clinton SM, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Up-regulation of NMDA receptor subunit and post-synaptic density protein expression in the thalamus of elderly patients with schizophrenia. *J Neurochem* 2006; 98: 1114- 1125.
32. Cochran SM, Kennedy M, McKerchar CE, Steward LJ, Pratt JA, Morris BJ. Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 265–275.

33. Conti F, Barbaresi P, Melone M, Ducati A. Neuronal and glial localization of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in the human cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1999; 9: 110-120.
34. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* 8th Edition. Oxford: Oxford University Press. 2003.
35. Cryan JF, Kelly PH, Neijt HC, Sansig G, Flor PJ, van Der Putten H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur J Neurosci* 2003;17: 2409-17.
36. Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re16.
37. Davidson M, Reichenberg A, Rabinowitz J, Weiser M, Kaplan Z, Mark M. Behavioral and intellectual markers for schizophrenia in apparently healthy male adolescents. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1328–1335.
38. DeLisi LE, Shaw SH, Crow TJ, et al. A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 803–812.
39. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61.
40. Dracheva S, Marras SA, Elhakem SL, Kramer FR, Davis KL, Haroutunian V. N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2001;158: 1400-1410.
41. Drago A, Ronchi DD, Seretti A. 5-HT1A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008; 11: 701-721.
42. du Bois TM, Newell KA, Huang XF. Perinatal phencyclidine treatment alters neuregulin 1/erbB4 expression and activation in later life. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012; 22: 356-363.
43. Dumas TC. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of molecular switch turns on associative learning. *Prog Neurobiol* 2005; 76: 189-211.

44. Duncan GE, Moy SS, Perez A, Eddy DM, Zinzow WM, Lieberman JA, Snouwaret JN, Koller BH. Deficits in sensorimotor gaiting and tests of social behavior in genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behav Brain Res* 2004; 153: 507-519.
45. Durand GM, Bennett MVL, Kin RS. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6731-6735.
46. Ehlers MD, Tingley WG, Huganir RL. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 1995; 269: 1734-7.
47. Elias GM, Nicoll RA. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 343–352.
48. Ellenbroek BA, Cools A. Early maternal deprivations and prepulse inhibition: the role of postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 177-184.
49. Erdley HA, Lahti RA, Lopez MB, Myers CS, Roberts RC, Tamminga CA., et al. Regional expression of RGS4 mRNA in human brain. *Eur J Neurosci* 2004;19: 3125–3128.
50. Foldes RL, Rampersad V, Kamboj RK. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding human hippocampal N-methyl-D-aspartate receptor subunits: evidence for alternative RNA splicing. *Gene* 1993; 131: 293–298.
51. Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor J, and Curran T. Targeted disruption of NMDA receptor1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 1994; 13: 325–338.
52. 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.
53. Geddes JR, Lawrie SM. Obstetric complications and schizophrenia: a meta-analysis. *Br J Psychiat* 1995; 167: 786-793.
54. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gaiting deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl.)* 2001; 156: 117-154.

55. Girard SL, Xiong L, Dion PA, Rouleau GA. Where are the missing pieces of the schizophrenia genetics puzzle? *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21(3): 310-316.
56. Glorioso C, Sabatini M, Unger T, Hashimoto T, Monteggia LM, Lewis DA et al. Specificity and timing of neocortical transcriptome changes in response to BDNF gene ablation during embryogenesis or adulthood. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 633–648.
57. Gottesman I, *Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness*, WH Freeman, New York, 1991.
58. Greer PL, Greenberg ME. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 2008; 59: 846–860.
59. 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.
60. Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, et al. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4746–4751.
61. Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL. Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1003: 94–101.
62. Hashimoto R, Hashimoto H, Shintani N, Chiba S, Hattori S, Okada T, et al. Pituitary adenyle cyclase-activating polypeptide is associated with schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 2007; 12: 10026–32.
63. Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jarskog LF, Philpot BD. Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2008; 18(11): 2560-73.
64. Hollister M, Laing P, Mednick SA. Rhesus incompatibility as a risk factor for schizophrenia in male adults. *Arch Gen Psychiat* 1996; 53: 19-24.
65. Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklický L Jr. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnelone sulfate. *Neuroscience* 2006; 137: 93-102.

66. 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.
67. Huber TJ, Borsutzky M, Schneider U et al. Psychotic gonadal function: evidence supporting the oestrogen hypothesis. *Acta Psychiatr Scand* 2004; 109: 269–274.
68. Humphries C, Mortimer A, Hirsch S, de Belloche J. NMDA receptor mRNA correlation with antemortem cognitive impairment in schizophrenia. *Neuroreport* 1996; 7: 2051-2055.
69. Hurlemann R, Boy C, Meyer PT, et al. Decreased prefrontal 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in subjects at enhanced risk for schizophrenia. *Anat Embryol (Berl)* 2005; 210:519-523.
70. Ibrahim HM, Hogg AJ, Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 1811-1823.
71. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M., Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 70-74.
72. 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.
73. Itil T, Keskiner A, Kiremitci N, Holden JMC. Effect of phenylcyclidine in chronic schizophrenics. *Can Psychiatr Assoc J* 1967; 12(2): 209-212.
74. Jaén C, Doupnik CA. RGS3 and RGS4 Differentially Associate with G Protein-coupled Receptor-Kir3 Channel Signaling Complexes Revealing Two Modes of RGS Modulation. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 34549–560.
75. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O. Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 2010; 29(11): 1566–79.
76. Javitt DC. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J Clin Psychiatry* 1987; 9: 12-35.

77. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 1301–1308.
78. Jones PB a Buckley PF. *Schizophrenia*. Elsevier 2006.
79. Kantrowitz JT, Javitt DC. Thinking glutamatergically: Changing concepts of schizophrenia based upon changing neurochemical models. *Clin Schizophr Relat Psychoses* 2010; 4: 189-200.
80. Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression. *Psych and Clin Neurosciences* 2007; 61: 3–19.
81. Kegeles LS, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Rodenhiser-Hill J, Mann JJ, Van Heertum RL, Cooper TB, Carlsson A, Laruelle M. Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 627–640.
82. Kennedy MB, Manzerra P. Telling tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:12323–12324.
83. 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.
84. Kew JN, Koester A, Moreau JL, et al. Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. *J Neurosci* 2000; 20(11): 4037-49.
85. Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: Postmortem findings from Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 2004; 9(544): 609-620.
86. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 1980; 20: 379-382.
87. Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 771– 781.
88. Klei L, Bacanu SA, Myles-Worsley M, Galke B, Xie W, et al. Linkage analysis of a completely ascertained sample of familial schizophrenics and bipolars from Palau, Micronesia. *Hum Genet* 2005; 117: 349–356.



89. Kristiansen LV, Beneyoto M, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 737-747.
90. Kristiansen LV, Huerta I, Beneyoto M, Meador-Woodruff JH. NMDA receptors and schizophrenia. *Current Opinion in Pharmacology* 2007; 7: 48-55.
91. Kristiansen LV, Patel SA, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Expression of the NR2B-NMDA receptor subunit and its Tbr-1/CINAP regulatory proteins in postmortem brain suggest altered receptor processing in schizophrenia. *Synapse* 2010; 64: 495–502.
92. Křištofiková Z, Kozmiková I, Hovorková P et al Lateralization of hippocampal nitric oxide mediator system in people with Alzheimer disease, multi-infarct dementia and schizophrenia. *Neurochem Int* 2008; 53:118–125.
93. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers Jr MB, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51: 199–214.
94. Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M et al. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 1992; 358: 36-41.
95. Labrie V, Lipina T, Roder JC. Mice with reduced NMDA receptor glycine affinity model some of the negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2008; 200(2): 217-30.
96. Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 455–467.
97. Lane HY, Liu YC, Huang CL, et al. RGS4 polymorphisms predict clinical manifestations and responses to risperidone treatment in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2008; 28: 64–68.
98. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Struz-Seebohm N, Galliant J. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 687-702.

99. Law AJ, Deakin JFW. Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *NeuroReport* 2001; 12: 2971-2974.
100. Le Corre S, Harper CG, Lopez P, Ward P, Catts S. Increased levels of expression of an NMDAR1 splice variant in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *Neuroreport* 2000;11: 983-986.
101. Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of evidence. *Acta Psychiatr Scand* 2000; 101: 3–38.
102. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Gulliaume JL, Coturier C, Delagrangre P et al. The ophram GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 2006; 25: 3012–3023.
103. Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 409-32.
104. Lewis DA, Volk DW, Hashimoto T. Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the tretment of working memory dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 174(1): 143-150.
105. Lewis DA, Moghaddam B. Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gemma-aminobutyric acid and glutamate alterations. *Arch Neurol* 2006; 63(10): 1372-1376.
106. Lieberman JA. Is schizophrenia a neurodegenerative disorder? A clinical and neurobiological perspective. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 729–739.
107. Ling W, Chang L, Song Y, Lu T, Jiang Y, Li Y, Wu Y. Immunolocalization of NR1, NR2A and PSD-95 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Acta Histochemica* 2012; 114: 285-295.
108. Lipska BK, Mitkus S, Caruso M, Hyde TM, Chen J, Vakkalanka R, et al. RGS4 mRNA expression in postmortem human cortex is associated with COMT val158met genotype and COMT enzyme activity. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2804–2812.
109. Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S and Grace AA. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 2008; 31: 234–242.
110. Lodge D, Johnson KM. Noncompetitive excitatory amino acid antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11(2): 81-86.

111. 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.
112. Lynch DR, Guttman RP. NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2001; 2: 215–231.
113. Masellis M, Basile V, Metzler HY, et al. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 123-132.
114. 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.
115. McEwen B. Estrogen activations through the brain. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 357–384.
116. McBain CJ, Mayer ML. *N*-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 1994; 74: 723–760.
117. Meador-Woodruff JH, Hogg AJ, Smith RE. Striatal ionotropic glutamate receptor expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Brain Res Bull* 2001; 55: 631-640.
118. Meltzer HY. Treatment of suicidality in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 932: 44-58.
119. Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 1159-1172.
120. Merikangas KR, Risch N. Will genomics revolution revolutionize psychiatry? *Am J Psychiatry* 2003; 160: 625-635.
121. Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 1998; 396: 433-439.
122. Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 2000; 28: 53-67.

123. 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.
124. Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999; 98: 427-436.
125. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994;12(3): 529-540.
126. Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TRE, Jones PB, Burke M, Lewis G. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 2007; 370 (9584): 319–328.
127. <sub>1</sub>Mueller HT, Meador-Woodruff JH. NR3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2004; 71: 361-370.
128. <sub>2</sub>Mueller HT, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Expression of the ionotropic glutamate receptor subunits and NMDA receptor-associated intracellular proteins in the substantia nigra in schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;121: 60-69.
129. Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velocardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56: 940–945.
130. Myhrman A, Rantakallio P, Isohanni M. et al. Does unwantedness of a pregnancy predict schizophrenia? *Br J Psychiat* 1996; 169: 637-740.
131. Nakanishi N, Axel R, Shneider NA. Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8552-8556.
132. Nudmamud-Thanoi S, Reynolds GP. The NR1 subunit of the glutamate/NMDA receptor in the superior temporal cortex in schizophrenia and affective disorders. *Neurosci Lett* 2004; 372: 173-177.
133. Onley JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanisms and prevention. *Science* 1991; 254: 1515-1518.

134. Páleníček T, Fujáková M, Brunovský M, Balíková M, Horáček J, Gorman I, Tylš F, Tišlerová B, Šoš P, Bubeníková-Valešová V, Höschl C, Krajča V. Electroencephalographic Spectral and Coherence Analysis of Ketamine in Rats: Correlation with Behavioral Effects and Pharmacokinetics. *Neuropsychobiology* 2011; 63: 202-218.
135. Popken GJ, Leggio MG, Bunney WE, Jones EG. Expression of mRNAs related to the GABAergic and glutamatergic neurotransmitter systems in the human thalamus: normal and schizophrenic. *Thalamus and Related Systems* 2002;1: 349-369.
136. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J Neurochem* 1996; 66: 692–700.
137. 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.
138. Prasad KM, Talkowski ME, Chowandri KV, McClain L, Yolken RH, Nimgaonkar VL. Candidate genes and their interactions with other genetic/enviromental risk factors in the etiology of schizophrenia. *Brain Res Bull* 2010; 83: 86-92.
139. Rang HP, Dale MM and Ritter JM. Amino acid transmitters. In: *Pharmacology*, 3<sup>rd</sup> edition. Edinburgh, UK: Harcourt Publishers Ltd, 2001: 470–482.
140. 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.
141. Rivero O, Sanjuán J, Maltó MD, Aquilar EJ, Gonzalez JC, deFrutos R, et al. The microencephaly ASPM gene and schizophrenia: A preliminary study. *Schizophr Res* 2006; 84: 427-429.
142. Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune LC, Ehlers MD, Wenthold RJ. Molecular determinations of NMDA receptor internalization. *Nature Neurosci* 2001; 4:794-802.
143. Robinson R. RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon? *PLoS Biology* 2004; 2: 18-20.

144. Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, Nestler EJ. The molecular and Genetic basis of Neurologic and Psychiatric Disease. Elsevier Science, 3. Vydání, 2003.
145. Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 795–827.
146. Ross NLJ, Mavrogiannis LA, Sargent CA, Knight SJL, Wadekar R, DeLisi LE, et al. Quantification of X-Y homologous genes in patients with schizophrenia by multiplex polymerase chain reaction. *Psychiatr Genet* 2003; 13:115-119.
147. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 2006; 52: 139-153.
148. Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 795–827.
149. Rutter AR, Freman FM, Stephenson FA. Further characterization of the molecular interaction between PSD-95 and NMDA receptor: the effect of the NR1 splice variant and evidence of modulation of channel gating. *J Neurochem* 2002; 81:1298–1307.
150. Sánchez-Pérez AM, Felipe V. Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochem Int* 2005; 47: 84–91.
151. Sans N, Prybylowski K, Petralia RS, Chang K, Wang YX, Racca C, Vicini S, Wenthold RJ: NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 520-530.
152. Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT et al. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 2001; 21: 3063–3072.
153. Segnitz N, Ferbert T, Schmitt A, Gass P, Gebicke-Haerter PJ, Zink M. Effect of chronic treatment with aripiprazole on the expression of NMDA receptor subunits and binding sites in rat brain. *Psychopharmacology* 2011; 217: 127-142.

154. Seillier A, Giuffrida A: Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of subchronic PCP and MK-801. *Behav Brain Res* 2009; 204: 410–415.
155. Selemon LD, Goldman-Rakic PS. The induced neurophil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 17-25.
156. Sen A, Belli A. S100B in neuropathologic states: The CRP of the Brain? *J Neurosci Res* 2009; 85: 1373–1380.
157. Sham PC, O’Callaghan E, Takei N, et al. Increased risk of schizophrenia following prenatal exposure to influenza. *Br J Psychiat* 1992; 160: 461-466.
158. Sheng M, Kim MJ. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 2002; 298: 776-780.
159. 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.
160. Schmitt A, Koschel J, Zink M, Bauer M, Sommer C, Frank J, Treutlein J, Schulze T, Schneider-Axmann T, Parlapain E, Rietechel M, Falkai P, Henn FA. Gene expression of NMDA receptor subunits in the cerebellum of elderly patients with schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2010; 260: 101-111.
161. Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Krebs M, Diefenbacher A, Blasig IE. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia – Original research and meta-analysis. *Psy Res* 2009; 167: 66–72.
162. Schwab SG, Hallmayer J, Albus M, et al. Further evidence for a susceptibility locus on chromosome 10p14-p11 in 72 families with schizophrenia by nonparametric linkage analysis. *Am J Med Genet* 1998; 81:302–307.
163. Schwab SG, Wildenauer DB. Update on key previously proposed candidate genes for schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 2009; 22: 147-153.
164. 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.
165. Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, et al. Drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Science* 1974; 184: 1243–53.

166. Sokolov BP. Expressin of NMDAR1, GluR1, GluR7 and KA1 glutamate receptor mRNA is decreased in frontal cortex of neuroleptic free schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *J Neurochem* 1998; 71: 2454-2464.
167. Spooeren W, Mombereau C, Marco M, Gill R, Kemp JA, Ozmen L, Nakanishi S, Higgins GA. Pharmacological and genetic evidence indicates that combined inhibition of NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors is required to disrupt prepulse inhibition. *Psychopharmacology* 2004; 175: 99-105.
168. Stahl SM. The genetics of schizophrenia converge upon the NMDA glutamate receptor. *CNS Spectr* 2007; 12: 583–588.
169. Standley S, Roche KW, McCallum J et al. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 2000; 28: 887–898.
170. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 877–892.
171. Straub RE, MacLean CJ, O’Neill FA, et al. A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: evidence for genetic heterogeneity. *Nat Genet* 1995; 11: 287–293.
172. Straub RE, Lipska BK, Egan MF, Goldberg TE, Callicott JH, Mayhew MB, et al. Allelic variation in GAD1 (GAD67) is associated with schizophrenia and influences cortical function and gene expression. *Mol Psychiatry* 2007; 12 (9): 854–869.
173. Stuart GA, Scarr E, McOmish CE, Hannan AJ, Thomas EA, Dean B. Regulator of G-protein signalling 4 expression is not altered in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry* 2008; 42: 740-750.
174. Sumiyoshi T, Park S, Jayathilake K, Roy A, Ertugrul A, Meltzer HY. Effect of buspirone, a serotonin1A partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Schizophr Res* 2007; 95: 158-168.
175. Sumiyoshi T, Bubeníková-Valešová V, Horáček J, Bert B. Serotonin 1A receptors in the pathophysiology of schizophrenia: development of novel cognition-enhancing therapeutics. *Adv Ther* 2008; 25(10): 1037-1056.



176. Susser E, Lin P. Schizophrenia after prenatal exposure to the Dutch hunger winter of 1944-1945. *Arch Gen Psychiat* 1992; 49: 983-988.
177. Tan HY, Chen Q, Sust S, Buckholtz JW, Meyers JD, Egan MF, et al. Epistasis between catechol-O-methyltransferase and type II metabotropic glutamate receptor 3 genes on working memory brain function, *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 12536–12541.
178. Tan HY, Nicodemus KK, Chen Q, et al. Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans. *J Clin Invest* 2008;118: 2200–2208.
179. Tejkalová H, Šťastný F. Neurovývojová a neuroinfekční hypotéza schizofrenie v animálném modelu. *Psychiatrie* 2005; 9(Suppl. 3): 21-24.
180. Tesmer JJG, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. Structure of RGS4 bound to AlF<sub>4</sub> activated G<sub>βγ</sub>: Stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 1997; 89: 251-261.
181. Thompson PM, Egbufoama S, Vawter MP. SNAP-25 reduction in the hippocampus of patients with schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 411-417.
182. Thompson M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. Decreased glutamic acid decarboxylase (67) mRNA expression in multiple brain areas of patients with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatr Res* 2009; 43: 970-977.
183. Tingley WG, Roche KW, Thompson AK et al. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 1993; 364: 70–73.
184. Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K et al. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 1997; 272:5157–5166.
185. 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.
186. Trimble MR, George MS. *Biological Psychiatry*, 3. vydání, John Wiley & Sons, Ltd 2010.

187. Tureček R, Vlachová V, Vyklický L Jr. Spontaneous openings of NMDA receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1999-2008.
188. Umbricht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, Javitt DC. Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57: 1139–1147.
189. van Haren NE, Bakker SC, Kahn RS. Genes and structural brain imaging in schizophrenia, *Current Opinion in Psychiatry* 2008; 21: 161–167.
190. Volk DW, Eggen SM, Lewis DA. Alterations in metabotropic glutamate receptor 1 $\alpha$  and regulator of G protein signaling 4 in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2010; 167: 1489-1498.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. Vrajová M, Klaschka J, Tejkalová H, Bubeníková-Valešová V. Vliv hipokampální aplikace NR1/NR2 antisense oligodeoxynukleotidů na expresi proteinů postsynaptické denzity a na prepulzní inhibici. *Psychiatrie* 2011; suppl. 2: 11-14.
195. Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva A, Soderling TR. Calmodulinkinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 2008; 59: 914–931.
196. Weinberger DR. On the plausibility of “the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia.” *Neuropsychopharmacology* 1996; 14: 1S-11S.
197. Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 335–358.

198. West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology* 2008; 29: 489–503.
199. 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.
200. 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.
201. Zhang M, Xu JT, Zhu X, Wang Z, Zhao X, Hua Z, Tao YX, Xu Y. PSD-93 deficiency protects cultured cortical neurons from NMDA receptor-triggered neurotoxicity. *Neuroscience* 2010; 166: 1083-1090.
202. Zheng X. et al. Mutagenesis rescues spermine and Zn<sup>2+</sup> potentiation of recombinant NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 811-818.
203. Zimmer M, Fink TM, Franke Y et al. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR1). *Gene* 1995; 159: 219–223.
204. Zukin RS, Bennett MVL. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 1995; 18(7): 306-13.

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ

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

**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)**

Počet citací: 1

**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)**

Počet citací: 4

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)**

Počet citací: 59

**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. Expresse GluN1<sup>C2</sup> podjednotky NMDA receptoru v hipokampu pacientů trpících schizofrenií – studie post mortem. *Psychiatrie* 2010 suppl. 2: 10-11.

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

Páleníček T, Bubeníková-Valešová V, Horáček J, **Vrajová M**, Novák T. Účinky selektivního antagonisty serotoninového 5-HT<sub>2C</sub> receptoru SB242084 na lokomoci potkana v animálních modelech psychóz. *Psychiatrie* 2006; suppl. 3: 16-20.