

**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV BIOCHEMIE**

# **Bakalářská práce**

**Brno 2017**

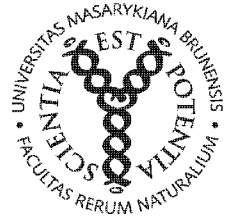
**Kristýna Pernicová**



---

**MASARYKOVA  
UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV BIOCHEMIE**

---



**ASOCIAČNÍ STUDIE  
VZTAHU DNA  
POLYMORFIZMŮ KE  
SCHIZOFRENII**

Bakalářská práce

**Kristýna Pernicová**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

Brno 2017

## Bibliografický záznam

**Autor:** Kristýna P  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav Biochemie

**Název práce:** Asociační studie vztahu DNA polymorfizmů ke schizofrenii

**Studijní program:** Biochemie

**Studijní obor:** Biochemie

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

**Akademický rok:** 2016/2017

**Počet stran:** 48

**Klíčová slova:** Schizofrenie, SNP, CHAT, asociační studie

## Bibliographic Entry

**Author** Kristýna Pernicová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Biochemistry

**Title of Thesis:** Association study of relationship between DNA polymorfism and schizophrenia

**Degree programme:** Biochemistry

**Field of Study:** Biochemistry

**Supervisor:** doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.

**Academic Year:** 2016/2017

**Number of Pages:** 48

**Keywords:** Schizophrenia, SNP, CHAT, association study



## **Abstrakt**

Schizofrenie je multifaktoriální polygenně podmíněná psychická porucha, která je jednou z nejzávažnějších psychických poruch. Její patogeneze není dosud uspokojivě vysvětlena. Tato práce se zaměřila na vztah polymorfismu rs3810950 genu pro CHAT (cholinacetyltransferasu) k patogenezi schizofrenie.

Teoretická část této práce je zaměřena na obecnou charakteristiku schizofrenie, diagnostické postupy a možnosti léčby, rizikové faktory, hypotézy vzniku a patologie vyskytující se u některých pacientů. Větší část je zaměřena na geny, u nichž již byla souvislost se schizofrenií prokázána.

Samotný výzkum byl proveden formou asociační studie, porovnáním výskytu rs3810950 polymorfismu mezi pacienty se schizofrenií a zdravými kontrolami. Zjištění výskytu polymorfismu bylo provedeno izolací DNA z plné krve od 386 pacientů a 379 kontrol. Dále byla využita multiplexová PCR a metoda SNaPshot v kombinaci s kapilární elektroforézou na automatickém genetickém analyzátoru. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Vyhodnocení proběhlo pro obě pohlaví dohromady i separovaně. Nicméně se nám nepodařilo odhalit statisticky významnou asociaci. Ani u mužů ani u žen nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v genotypu polymorfismu rs3810950 genu pro CHAT mezi pacienty a kontrolami.

## **Abstract**

Schizophrenia is multifactorial polyneuropathic psychological disorder and it's one of the gravest psychological disorders, which origins have not been uncovered satisfactorily. This thesis is focused on the relationship between rs3810950 polymorphism for CHAT gen and pathogenesis of schizophrenia.

Schizophrenia general characteristics, diagnostic methods and possibility to cure, risk factors and hypothesis of origin and pathology occurred at some patients are described in theoretical part of this thesis. Bigger part is aimed at genes where association with schizophrenia was already proved.

Research itself was carried out by association study by comparing genotypes of studied polymorphism in group of patients with schizophrenia and control group of healthy individuals. Detection of polymorphism presence was carried out by isolation of DNA from whole blood of 386 patients and 379 healthy persons. In addition the multiplex PCR and SnaPshot method were used in combination with capillary electrophoresis on automatic genetic analyser. Results of this survey were statistically evaluated for both sexes separated and together also but no association was found. However, we failed to detect a statistically significant association. Neither in men nor women was found a statistically significant difference in genotype of rs3810950 polymorphism gene of CHAT gene between patients and controls



Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta  
Ústav biochemie  
Kotlářská 2, 611 37 Brno, CZ

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie

Studentka: **Kristýna Pernicová**

Název tématu:  
***Asociační studie vztahu DNA polymorfizmů ke schizofrenii***

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.


Odborný konzultant:

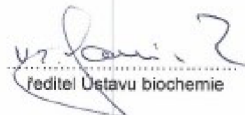
Datum zadání bakalářské práce: 20.10.2016

Datum odevzdání bakalářské práce: květen 2017

*Zpracovatel i vedoucí bakalářské práce berou na vědomí, že práce musí obsahovat i experimentální část.*

  
zpracovatel bakalářské práce

  
vedoucí bakalářské práce

  
ředitel Ústavu biochemie

V Brně, dne 20.10.2016

### **Zásady pro vypracování:**

Cílem práce bude porovnat výskyt genotypů a alel v souborech osob se schizofrenií a kontrolních osob. K tomuto účelu bude provedena asociační studie. Bude použita DNA izolovaná ze vzorků krve. S využitím metody Snapshot na kapilárním sekvenátoru bude provedena genotypizace. Alelické a genotypové frekvence budou porovnány a statisticky vyhodnoceny. V práci bude diskutována možná úloha studovaného genu v patofyziologii schizofrenie.

### **Seznam odborné literatury:**

- Janoutová J, Janáčková P, Serý O, Zeman T, Ambroz P, Kovalová M, Varechová K, Hosák L, Jirík V, Janout V. Epidemiology and risk factors of schizophrenia. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016;37(1):1-8.
- Šerý O, Lochman J, Povová J, Janout V, Plesník J, Balcar VJ. Association between 5q23.2-located polymorphism of CTXN3 gene (Cortixin 3) and schizophrenia in European-Caucasian males; implications for the aetiology of schizophrenia. *Behav Brain Funct.* 2015 Mar 17;11:10.
- Lochman J, Plesník J, Janout V, Povová J, Mišek I, Dvořáková D, Šerý O. Interactive effect of MTHFR and ADRA2A gene polymorphisms on pathogenesis of schizophrenia. *Neuro Endocrinol Lett.* 2013;34(8):792-7.
- Lochman J, Balcar VJ, Sřastný F, Serý O. Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphisms in the regulatory Regions of the ADRA2A, DRD3 and SNAP-25 Genes. *Psychiatry Res.* 2013 Jan 30;205(1-2):7-12.
- Vrařová M, Stastný F, Horáček J, Lochman J, Serý 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 Jul;35(7):994-1002
- Serý O, Prikryl R, Castulik L, Sřastný F. A118G polymorphism of OPRM1 gene is associated with schizophrenia. *J Mol Neurosci.* 2010 May;41(1):219-22.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala panu doc. RNDr. Omarovi Šerému, Ph.D. za odborné vedení a příležitost toto téma zpracovat. Ráda bych také poděkovala paní Mgr. Lauře Ewerlingové za velkou pomoc a trpělivost při laboratorních analýzách a zpracování této závěrečné práce. V neposlední řadě patří mé díky také společnosti Elisabeth Pharmacon za poskytnutí přístrojového vybavení (automat na izolaci DNA, termocyklér, DNA sekvenátor) pro provedení analýz.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou/diplomovou/rigorózní práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 5. měsíce 2017

.....

Jméno Příjmení

# OBSAH

1. Úvod .....	11
2. Teoretická část .....	12
2.1. Etiologie, Incidence, Prevalence .....	12
2.2. Diagnostika .....	13
2.2.1. DSM IV .....	13
2.2.2. MKN 10 .....	14
2.3. Možnosti léčby .....	15
2.4. Hypotézy vzniku .....	16
2.5. Asociační studie .....	17
2.6. Patologie .....	18
2.7. Rizikové Faktory .....	18
2.7.1. Enviromentální .....	18
2.7.2. Genetické .....	20
2.8. Geny asociované se schizofrenií .....	21
2.8.1. Cholin o-acetyl transferasa .....	21
2.8.2. Cortexin 3 .....	22
2.8.3. Disrupted in schizophrenia 1 .....	23
2.8.4. glutamate ionotropic receptor NMDA type .....	24
2.8.5. Methylentetrahydrofolát reduktasa .....	24
2.8.6. Neuregulin 1 .....	25
2.8.7. Opioid receptor Mu-1 .....	26
2.8.8. Synaptosomal-associated protein .....	26
3. Cíle práce .....	27
4. Metodologie .....	28
4.1. Popis souboru osob .....	28
4.2. Izolace DNA .....	28
4.3. Multiplex PCR .....	30
4.4. ExoSAP .....	30
4.5. SnaPshot .....	31
4.6. SAP .....	31
4.7. Denaturace a fragmentační analýza .....	32
5. Výsledky .....	34
6. Diskuse .....	39
7. Shrnutí .....	41
8. Summary .....	42
9. Použitá literatura .....	43
10. Internetové zdroje .....	47

# 1. Úvod

Práce se zabývá vztahem polymorfismu rs3810950 genu pro CHAT (Choline O-Acetyltransferase) ke schizofrenii.

Schizofrenie je jednou z nejznámějších a nejzávažnějších duševních poruch, jejíž diagnostika je náročná a léčba finančně nákladná. 50% pacientů hospitalizovaných v psychiatrických nemocnicích má diagnostikovánu právě tuto poruchu.

V podstatě se jedná o poruchu zpracovávání informací s významnými poruchami myšlení, emočního stavu, projevů a vnímání s dopadem na kognitivní funkce.

Závažnost tohoto onemocnění spočívá nejen ve finanční nákladnosti léčby, ale také ve skutečnosti, že pacient je bez odpovídající léčby obvykle vyřazen z pracovního procesu i běžného sociálního fungování. Celkově má tato porucha výrazný dopad na kvalitu života a vyžaduje velkou spolupráci a podporu ze strany rodiny. Výrazně se naruší vztah jedince k realitě a dochází ke změnám osobnosti. Neléčená schizofrenie také často končí sebevraždou.

## 2. Teoretická část

Schizofrenie je chronickou psychickou poruchou, psychiatry řazenou mezi endogenní psychózy. Vyznačuje se různorodými projevy jako například halucinace či bludy, citová oploštělost nebo nesmyslné chování.

Jedná se o multifaktoriální a polygenně podmíněnou poruchu objevující se mezi 15. až 45. rokem života, nejčastěji propukající kolem 20. až 25. roku života, tedy v období, kdy dochází k dokončení fyziologického vývoje mozku.

### 2.1. Etiologie, incidence, prevalence

Schizofrenie se objevuje nerovnoměrně po celém světě, s tendencí k vyšší prevalenci ve společnosti s nižší socioekonomickou úrovní, stejně tak poslední meta-analýzy prokázaly 1,4x vyšší riziko vzniku schizofrenie u mužů než u žen (*Aleman et al. 2003*).

Incidence označuje výskyt nových případů onemocnění, které nejsou na sobě závislé. Obecně se dá říct, že vyjadřuje poměr počtu pacientů nemocných daným onemocněním vůči všem jedincům ve sledované populaci (*Petráčková et al. 1998; Klimeš 1981*). Celosvětová incidence se pohybuje mezi 7,70 a 43,00 osobami na 100 000 osob (*Saha et al. 2007*). V rámci České republiky byla nejvyšší hodnota incidence zjištěna v Praze (0,79/1000) a nejnižší ve Středočeském kraji (0,24/1000) (*ÚZIS ČR 2014*).

Prevalence ukazuje počet nemocných na 1000 osob, za určité časové období (*Petráčková et al. 1998; Klimeš 1981*). Celosvětová hodnota prevalence je kolem 1%, Česká republika i středozápadní Evropa, se pohybují zhruba na polovině této hodnoty (*ÚZIS ČR 2014*). Ve střední a západní Evropě se prevalence pohybuje kolem 0,14%-0,46%. Celoživotní prevalence schizofrenie byla na základě literárního výzkumu Szkultecka-Děbek et al. (2015), 0,4-1,4% a ve Finsku na základě diagnostiky DMS-IV tato hodnota dosáhla 0,87% (*Perala et al. 2007*).

Prevalence schizofrenie v České republice, na základě kalkulací z roku 2013, se pohybuje mezi 0,31% - 0,61%. Nejvyšší hodnota byla zjištěna v Praze (0,61), naopak nejnižší hodnota byla zjištěna ve Středočeském kraji (0,31). Z toho vyplývá, že průměrná hodnota prevalence pro Českou republiku je 0,46%.



## 2.2. Diagnostika

Na základě různých projevů i „spouštěcích“ faktorů se ukazuje, že se nejedná o jednotnou poruchu, ale o více poruch s podobnými symptomy, což značně komplikuje nalezení genetické predispozice schizofrenie (Lochman et al. 2013). Základní rozlišení, od kterého se již postupně upouští, hovoří o simplexní, katatonní, hebefrenní a paranoidní schizofrenii.

Diagnostika je velmi složitá, v současné době totiž neexistují spolehlivé testy, které by mohly schizofrenii jednoznačně odhalit. Základem je v podstatě vyloučení jiných příčin, způsobujících stejné projevy jako schizofrenie (mozkové nádory, užívání drog, zneužívání léků, poruchy štítné žlázy, atd.), proto je nutné provést velké množství vyšetření (vyšetření moči, krve, atd.). Po vyloučení jiných příčin schizofrenních příznaků se u pacienta pozoruje a hodnotí chování, na základě rozhovoru nejen s pacientem, ale také s členy jeho rodiny (Mohr 2012).

Kritéria pro diagnostiku schizofrenie se liší na základě diagnostických systémů, které jsou různé, např. Spojené státy americké užívají DSM neboli Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Světová zdravotnická organizace (WHO) užívá International Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) u nás známý jako MKN, tedy Mezinárodní klasifikace nemocí a souvisejících zdravotních problémů.

### 2.2.1. DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition)

Diagnostický a statistický manuál duševních poruch, 4. vydání (DSM-IV) stanovuje tři kritéria, která musí být pro diagnózu splněna:

#### 1. Charakteristické symptomy

Alespoň dva nebo více z následujících symptomů, jejichž trvání musí trvat po dobu minimálně jednoho měsíce.

Pozitivní symptomy: *Bludy* – pokud jsou vyhodnoceny jako bizarní, stačí pouze symptom.

*Halucinace* – jestliže pacient slyší jeden hlas, neustále komentující jeho jednání, či více hlasů, které mezi sebou diskutují, stačí pouze tento symptom.

*Zmatená řeč* - jako projev formální poruchy myšlení – toto

kritérium je splněno pouze pokud je tato porucha dostatečně závažná a podstatně zhoršuje komunikaci.

*Vysoce zmatené nebo katatonní jednání*

Negativní symptomy: Oploštělé emoce

*Alogie* (úbytek či absence řečového projevu)

*Avolice* (úbytek nebo absence motivace)

## 2. Společenská nebo pracovní disfunkce

Jedna či více z oblastí běžného života je výrazně pod úrovní, které pacient dosahoval před vypuknutím schizofrenie, jako práce, rodina, péče o vlastní osobu nebo mezilidské vztahy. Tento pokles musí trvat delší časové období od propuknutí prvních příznaků.

## 3. Delší doba trvání

Příznaky onemocnění musí trvat po dobu minimálně šesti měsíců, přičemž během tohoto času musí být, po dobu minimálně jednoho měsíce, přítomny alespoň dva symptomy či jeden pokud se jedná o bizarní bludy nebo halucinace.

*(American Psychiatric Association 2000)*

### 2.2.2. MKN 10

Dle MKN 10 je schizofrenie řazena do kategorie Poruchy duševní a poruchy chování (F00-F99), konkrétně do podkategorie Schizofrenie, poruchy schizotypální a poruchy s bludy (F20-F29), kam náleží kromě schizofrenie i schizotypální porucha (F21), Poruchy s trvalými bludy (F22), Akutní a přechodné psychotické poruchy (F23), Indukovaná porucha s bludy (F24), Schizoafektivní poruchy (F25), Jiné neorganické psychotické poruchy (F28) a Neurčené neorganické psychózy (F29).

### 2.3. Možnosti léčby

Léčba tradičně probíhá pomocí psychofarmak. Včasné zahájení léčby redukuje nejen akutní rizika spojená s psychotickými symptomy, ale také snižuje riziko chronického průběhu (*Tandon et al. 2010*).

Léčba je dlouhodobá, neomezuje se totiž jen na akutní fázi, stejně důležitá je i udržovací terapie pro prevenci recidivy.

Už během Indočínské války zaznamenali francouzští chirurgové zklidňující vliv lytických směsí chlopromasinu na schizofreniky, po jeho podání došlo k potlačení bludů.

V moderní léčbě se využívají antipsychotika. Ty lze rozdělit do dvou základních skupin: *typická antipsychotika* a *atypická antipsychotika*. V dnešní době se k léčbě využívají především atypická antipsychotika (neboli antipsychotika druhé generace) spolu s psychoterapií. Výhoda antipsychotik druhé generace je v příznivém vlivu na pozitivní i negativní příznaky. Pokud je ovšem nutný rychlý sedativní účinek při akutní agitovanosti, je stále možné využít typická antipsychotika.

Antipsychotika první generace jsou typická blokadou dopaminových D2 a D3 receptorů. Atypická antipsychotika se vyznačují afinitou k širší škále receptorů. Klasicky se vážou na dopaminové D2 receptory, ale jsou zároveň i blokátory serotoninových receptorů, D1 a D2 receptorů v mezolimbické oblasti. Některá antipsychotika také dokáží ovlivnit hustotu myelinizace.

Léky se obvykle podávají perorálně, nicméně je u některých případů možno použít dlouhotrvající injekční antipsychotika. U některých typů schizofrenie se s pozitivními výsledky stále používá elektrokonvulzivní terapie (*Mohr, 2012*).

Příkladem typických antipsychotik mohou být chlorpromazin (Plegomazin), haloperidol (Haloperidol) nebo Sulprid (Dogmatil). Atypická antipsychotika jsou například amisulprid (Solian), který je antagonistou D2/D3 receptorů, dalším typem jsou antagonisté serotoninu a dopaminu (risperidon (Risperidal), paliperidon (Invega). Olanzapin (Zyprexa), clozapin (Leponex) jsou atypická antipsychotika, která jsou multireceptorovými antagonisty, ty mají výraznou afinitu i k dalším neurotransmitterovým systémům, krom dopaminergního i serotoninového, jako jsou adrenergní, histaminové a muskarinové systémy (*Mohr, 2012*).

Nedílnou součástí léčby je psychoterapie. Duševní rehabilitace by měla pomoci člověku alespoň částečně navrátit schopnosti, které byly poruchou narušeny či redukovány. To mohlo mít velmi negativní vliv nebo dokonce znemožnění plnohodnotného zapojení se do běžného života.

Terapie bývá zaměřená na nácvik specifických společenských dovedností, důležitých pro běžné fungování sociálních vztahů a pro postupný návrat do rodinného a sociálního života. Jedním z ústředních motivů psychoterapie by měla být snaha podpořit pacienta ve vědomí, že se příznakům psychózy může aktivně bránit a není jen pasivní obětí, obecně se jedná o kognitivně-behaviorální přístup. K tomuto cíli pomáhají obvykle psychosociální centra, denní kliniky, socioterapeutické skupiny a podobně. Velkou roli také hraje vzdělávání pacienta o povaze poruchy, jejím průběhu, metodách léčby, vedlejších účincích psychofarmak a možných následcích po prodělání akutní fáze schizofrenie. S těmito informacemi je nezbytné seznámit i rodinu, neboť její fungování má velký vliv na rehabilitaci pacienta (*Látalová et al. 2006*).

Obecně platí, že péče o pacienta by měla být vysoce individuální, jelikož správně vedená farmakoterapie i psychoterapie umožňuje pacientovi žít běžný, plnohodnotný život, zatímco terapie, která je špatně vedená může mít vyloženě škodlivé účinky a zhoršit průběh poruchy (*Látalová et al. 2006*).

#### 2.4. Hypotézy vzniku

Ohledně vzniku schizofrenie hovoří mnoho teorií, avšak propuknutí nemoci zatím nebylo uspokojivě popsáno.

Dopaminová hypotéza, hovořící o hyperaktivitě dopaminergního systému, vychází ze skutečnosti, že dopaminový antagonisté blokují symptomy schizofrenie (*Raboch et al 2002*). U pacientů se schizofrenií byla také zjištěna zvýšená koncentrace extracelulárního dopaminu, což vede k aktivaci receptoru D3 na povrchu oligodendrocytů a to vede k potlačení funkce myelinizace. Mimo to se ukazuje, že poškození oligodendrocytů není pouze následkem vyšších dopaminových transmisí, ale i jejich příčinou. Potlačení myelinizace vede k poškození, hyperaktivitě, dopaminového systému (*Fišar 2001*).

Výzkumy zaměřující se na terapeutický efekt medikace antipsychotiky a dopaminové neurotransmise, se často zaměřovaly na striatum, kde byla nalezena významná korelace mezi afinitou dopaminových D2 receptorů a účinkem antipsychotik (*Seeman et al. 1975; Seeman et al. 1976*). Ve striatu se totiž nachází největší koncentrace dopaminergních receptorů v mozku, a právě v této oblasti byly u pacientů se schizofrenií, pomocí neurozobrazovacích metod, nalezeny abnormality, které mohly vzniknout následkem schizofrenie (*Holt et al. 2005*).

K důležitým hypotézám vzniku schizofrenie patří autoimunitní hypotéza, která vznikla před více než 60 lety a zatím nebyla potvrzena ani vyvrácena. Tvrdí, že schizofrenie je autoimunitním onemocněním, charakterizovaným tvorbou protilátek proti mozkovým antigenům, např. IL-6 (interleukin 6) – jeho koncentrace je u schizofreniků až 3x vyšší než u kontrolních osob (IL-6 je polypeptid, ovlivňující imunitní systém přes receptory na leukocytech, ale má i neuromodulační funkci, který bývá obecně zvýšen během chřipky, rýmy atp.), (*Fišar 2001*).

Další z hypotéz je hypotéza o vzniku mlčící léze - ta je tvořena buď traumatem, infekcí či vrozenou anomálií. K aktivaci této léze dochází při dokončování vývoje mozku (tedy období kolem 20. roku života), tedy v období, kdy jedinec potřebuje mobilizaci svých integračních schopností ke zvládnutí životní adaptace. Právě v tuhle chvíli začíná léze překážet a rušit integraci (*Raboch et al. 2002*).

## 2.5. Asociační studie

Asociační studie mají za cíl porovnání genotypů mezi kontrolními osobami a osobami se schizofrenií. Obecně se užívají k odhalování genetické predispozice k multifaktoriálním onemocněním.

Asociační studie se zaměřují na testování vztahu mezi konkrétní alelou, genotypem, nebo haplotypem a onemocněním. Obvykle je prováděna porovnáváním skupiny jedinců, kteří vykazují dané onemocnění a skupinou zdravých kontrol.

Aby bylo možné potvrdit, že se mezi zkoumaným genetickým faktorem a onemocněním jedná o asociaci nebo je daný faktor markerem opravdové kauzální alely, je třeba dodržet zásady správného výběru obou skupin a statisticky odfiltrovat falešně pozitivní asociace (*Šedý et al. 2006*).

## 2.6. Patologie

U některých pacientů se vyskytuje typická patologie, která ovšem není dostatečně specifická, aby bylo možné na jejím základě určit diagnózu.

V mozcích pacientů s 1. epizodou schizofrenie se vyskytují typická zvětšení třetí a laterální mozkové komory, úbytek mozkové hmoty, zmenšený hipokampus, thalamus a bazální ganglia.

U pacientů s déle trvající schizofrenií dochází ke zmenšení objemu amygdaly, parahipokampálního gyru a temporálního laloku.

K dalším typickým patologiím patří snížená hustota oligodendrocytů a neuronů, v entoriálním kortexu ve vnějších vrstvách I a II, snížená hustota neuronů v II. vrstvě a výskyt netypických spojení v hlubokých vrstvách mozkové kůry, hypomyelinizace axonů či snížení metabolismu glukosy ve frontální kůře. Tyto změny se nevyskytují u všech pacientů, navíc jsou do jisté míry individuální a nespecifické, proto nemohou být využity k diagnostice schizofrenie.

## 2.7. Rizikové faktory

### 2.7.1. Enviromentální rizikové faktory

Výrazným faktorem při vzniku schizofrenních poruch je sociální prostředí jedince. Negativně v tomhle pohledu působí špatně fungující vztahy v rodině, nedostatečná komunikace a citová odezva či šikana v období dospívání.

Kromě sociálních podmínek má velký podíl na vzniku i průběh těhotenství. Vyvíjející mozek může poškodit například nitroděložní krvácení, což podporuje multifaktoriální, tedy její neurovývojovou, negenetickou část povahy poruchy. Mimo jiné se ukázalo, že i komplikace během porodu znamenají vyšší riziko vzniku schizofrenie. Jednou z těchto komplikací je hypoxie plodu nebo ischemie mozku či poškození lebky (*Dorrington et al. 2014, Boydell 2001; Cannon et al. 2002*).

Ukázalo se, že vystavení viru chřipky v I. trimestru zvyšuje riziko schizofrenie 7x, v 3. trimestru 2,5x. Virus chřipky infikuje Schwanovy buňky, astrocyty a mikroglie, tím vyvolává produkci IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , které regulují vývoj mozku (*Janoutová et al. 2016*).



Důležitou roli hraje roční doba, kdy se dítě narodí. Vyšší množství schizofreniků se rodí z počátku jara a v zimě (*Martinez-Ortega et al. 2011; Schwartz 2011*), kdy je velké množství akutních dýchacích infekcí a časté epidemie chřipky. Právě virové infekce mohou v průběhu těhotenství způsobit negativní změny ve vyvíjejícím se mozku, které mohou následně vést ke vzniku schizofrenie. V zimě (především v severských zemích) se rodí o 3,00 až 8,00% schizofreniků více než jindy, ale tento jev nebyl zatím dostatečně vysvětlen. Vliv má pravděpodobně kombinace nutričního deficitu s teplotou, počasím a intenzitou slunečního záření (jeho nedostatkem, především v severských zemích, například v izolovaných oblastech na severu Švédska a několika oblastech Finska se setkáváme s neobvykle vysokou prevalencí). Sluneční svit má mimo jiné i vliv na tvorbu až 90% nezbytného množství vitamínu D v lidském těle. Nedostatek vitamínu D během těhotenství může mít negativní vliv na vývoj mozku. U novorozenců je jeho vysoká i nízká koncentrace spojená se zvýšeným rizikem schizofrenie (*McGrath et al. 2010; Janoutová et al. 2016*).

Z rizikových faktorů je nutno zahrnout závislost na drogách či alkoholu, je to totiž jedna z nejčastějších komplikací psychotických stavů. Mezi nejčastěji zneužívané látky patří marihuana, alkohol a tabák (*McLoughlin et al. 2014*). Některé studie naznačují, že užívání marihuany v období adolescence zvyšuje riziko vzniku, jiné studie ovšem tuto spojitost zamítají anebo uvádějí, že užívání této drogy pouze spustí schizofrenii u jedinců s predispozicí vůči této poruše (*Boydell 2001; Semple et al. 2005; Hickman et al. 2007; Tandom et al. 2008*). Závislost nebo nadužívání alkoholu bylo prokázáno u 50% pacientů (*Thoma et al. 2013*). Nicméně je u spousty případů velmi těžké rozlišit počátek drogové závislosti od počátku prodromálních symptomů, jelikož některé charakteristické symptomy často předcházejí drogové závislosti (*Janoutová et al. 2016*).

### 2.7.2. Genetické rizikové faktory

Mimo enviromentálních rizikových faktorů hrají velmi důležitou roli v propuknutí schizofrenie také genetické faktory.

Ukazuje se, že heritabilita schizofrenie může být až 80% (*Hosák 2013*). Pokud jeden z biologických rodičů trpí touto poruchou, pravděpodobnost, že potomek zdědí tento stav, je 13%, pokud poruchou trpí oba rodiče, šance je více než 20%.

Pokud se schizofrenie ukáže u jednoho z jednovaječných dvojčat, šance, že se projeví i u sourozence, je více než 50% (*Thoma et al. 2013*).

Mnohé výzkumy již ukázaly, že schizofrenie je polygenní poruchou, tudíž její propuknutí není závislé na jednom genu, ale na kombinaci několika genů. V poslední době se uvažuje o tom, že zásadní roli v genetice poruchy, by mohly hrát jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms, SNP's) genů majících vliv na syntézu proteinů, které hrají důležitou úlohu ve vývoji mozku a mají vliv na jeho správnou funkci. Příkladem takovýchto genů mohou být: gen pro Cortexin 3, geny DISC, SNAP-25, geny pro neureguliny, atd.



## 2.8. Geny asociované se schizofrenií

### 2.8.1. CHAT (Cholin O-Acetyltransferase)

Cholin-O-acetyltransferasa katalyzuje biosyntézu neurotransmiteru acetylcholinu a polymorfismy objevené v genu CHAT bývají spojovány s Alzheimerovou chorobou a mírnou kognitivní poruchou (NCBI 2017).

Syntéza CHAT probíhá v cytoplasmě cholinergních neuronů, poté je transportována do neuronových synapsí, kde se vyskytuje v rozpustné i membránově vázané formě (Oda 1999). Cholin-O-acetyltransferasa je značně rozšířená skrze celou centrální nervovou soustavu. CHAT reguluje hladinu acetylcholinu a tím ovlivňuje mnoho cholin-dependentních neurofyziologických funkcí jako je spánek, zpracování vizuálních vjemů, zpracování informací a kognitivních funkcí (Whittaker 1988; Selden et al. 1998; Bacciottini Et al.; 2001; Beelke et al. 2002).

Byla nalezena významná souvislost polymorfismu rs1880676 genu pro CHAT se schizofrenií u Baskických jedinců. Podobný trend byl také nalezen pro polymorfismus rs3810950 (Mancama et al. 2007). Polymorfismus rs1880676 se navíc nachází na chromozomu 10 v oblasti 10q11.23, která spadá do blízkosti locusu, který je mnoha genomickými studii spojován se schizofrenií (Fallin et al. 2003; Liu et al. 2003; Faraone et al., 2006).

V rámci polymorfismu rs3810950 dochází k záměně guaninu za adenin, to způsobí změnu alaninového na threoninový zbytek v kanonické sekvenci. Ukazuje se, že by to mohlo mít roli v útlumu translační aktivity mRNA CHAT (Mubumbila et al. 2002). Nicméně vztah rs1880676, ani rs3810950 polymorfismu ke schizofrenii, se u španělské populace nedařilo potvrdit. Tento rozdíl nejspíše spočívá v různé distribuci těchto polymorfismů v rámci různých etnických skupin (Mancama et al. 2007).

V mozcích pacientů se schizofrenií, konkrétně v oblasti striata, byla objevena snížená koncentrace obou typů acetylcholinových receptorů, muskarinových (Dean et al. 1996; Readler et al. 2003) i nikotinových (Breese et al. 2000; Durany et al. 2000). Stejně tak se u některých pacientů objevila redukce cholinergních interneuronů v nonmotorické oblasti striata (Holt et al. 1999). Tato deficiencie se vyskytuje u pacientů jako primární abnormalita nebo sekundární změna v důsledku abnormálních vstupů kortikálních nebo

dopaminových aferentů. Ve ventrální části striata byla také nalezena snížená hodnota cholinergních neuronů pozitivních na mRNA pro CHAT, což může být následkem úbytku buněk nebo snížením jejich schopnosti exprimovat gen CHAT (Holt et al. 2005). Největší redukce těchto neuronů byla objevena u pacientů, kteří byli po dobu alespoň jednoho měsíce před smrtí bez medikace antipsychotiky (Holt et al. 1999).

Také vysoké dávky cholinergních antagonistů mohou způsobovat psychotické symptomy a agonisté cholinergního systému, např. inhibitor acetylcholinesterasy vedou ke zvrácení těchto symptomů a deficiencie cholinergní neurotransmise ve striatu může mít podobný neurofyzilogický a behaviorální efekt, jako přebytek dopaminu (Holt et al. 2005), který je často nacházen právě u pacientů trpících schizofrenií.

Post mortem studie Karson et al. (1993, 1996) neobjevily žádné výrazné abnormality v mozcích pacientů, přesto pozorovaly výraznou korelaci mezi sníženou hladinou CHAT a poškozením kognitivních projevů.

### 2.8.2. Cortexin 3 (CTXN3)

Gen pro kortexin 3 je exprimován především v mozku a ledvinách. Je zapojen do vývoje mozku, hraje roli i ve vývoji GABAergních neurotransmisí, metabolismu amyloidního prekursorového proteinu (APP), který může mít dopad na maturaci neuronů, neuronální migraci a synaptogenezi (Šerý et al. 2010).

Na základě výzkumů byla nalezena významná asociace mezi polymorfismem rs6595788 genu pro cortexin 3 a rizikem vzniku schizofrenie. Přítomnost AG genotypu (konkrétně přítomnost G alely) 1,5x zvyšuje riziko vzniku schizofrenie. Už v dřívějších studiích byla popsána spojitost mezi dvěma CTXN3 polymorfismy a schizofrenií na vzorku thajské populace, která objevila souvislost mezi SNP's CTXN3 a SLC12A2 (Panichareon et al. 2012). Oba dva tyto geny se nacházejí v oblasti 5q23, která bývá označována za „kandidátní oblast“ s ohledem na genetické riziko vzniku schizofrenie (Straub et al.1997; Lewis et al. 2003; Gladwin et al 2012). Také se ukázala významná interakce polymorfismů SNP rs6595788 a rs17817356 SNP, kdy genotyp AGAG byl až dvakrát častěji nacházen u pacientů se schizofrenií oproti kontrolám (Šerý et al. 2010).

### 2.8.3. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC 1)

Exprese genu probíhá celý život, ovšem v prenatalním, perinatálním období i v dospělém věku hraje jinou roli.

U proliferujících buněk a nezralých neuronů bývá DISC1 napojená na dyneiny v rámci centrozomu, mikrotubulů a buněčného jádra. Snížená exprese tedy vede k snížení proliferace progenitorových buněk, předčasné neuronální diferenciaci vyvíjejícího se mozku a opoždění neuronální migrace (*Le Strat et al. 2009; Bndon et al. 2009*).

V postnatálním období interaguje s mnoha proteiny a reguluje synaptickou maturaci a plasticitu, ovlivňuje vývoj oligodendrocytů, prodlužování neuritu a migraci, neuronální plasticitu dendritů a neurotransmise. Interaguje s proteiny jako jsou NUDEL, kalirin, PDE4B a citron-kinasou, ATF4 a ATF (*Le Strat et al. 2009*).

Ztráta či redukce funkce DISC1 je spojována s těžkými psychickými poruchami a onemocněními (*St Clair et al. 1990; Blackwood et al. 2001; Millar et al. 2001; Millar et al. 2005; Porteous et al. 2006*).

Ukázalo se, že gen pro DISC1 u myši je hojně exprimován po celou dobu vývoje i v již dospělém mozku (*Schurov et al. 2006; Austin et al. 2004*) a bývá tedy nepřímo spojován s rozvojem mozku, hlavně růstem neuronů, proliferací, diferenciací, formováním synapsí a udržováním kortikálních excitačních neuronů (*Chubb et al. 2008; Thomson PA et al. 2013; Brandon et al. 2011; Hikida et al. 2007; Clapcote et al. 2007; Li et al. 2007; Pletnikov et al. 2008; Niwa et al. 2010*).

Myši, které na exonu 2 genu pro DISC 1 nesly bodovou mutaci, vykazovaly depresivní chování a chování podobné schizofrenii, které bylo možno zvrátit podáním antidepressiv (*Clapcote et al. 2007; Lipina et al. 2010; Lipina et al. 2012; Haque et al. 2012*).

#### 2.8.4. GRINI

Gen GRINI kóduje GluN1 podjednotku N-methyl-D-aspartate receptoru (NMDA-R), o němž již bylo prokázáno, že pokles jeho aktivity je spojen se vznikem schizofrenie (*Vrajova et al. 2010*).

GRINI podléhá alternativnímu sestřihu mRNA a dává tak vznik osmi různým isoformám, které se liší funkcí i distribucí v různých oblastech mozku (*Cull-Candy et al. 2001; Kristiansen et al. 2007*). Distribuce v jednotlivých oblastech je ovšem nevyvážená, se selektivními modifikacemi pro dané lokality (*Kristiansen et al. 2006; Le Corre et al. 2000*).

V post-mortem studii byl objeven velký rozdíl v hodnotách mRNA, pro panGluN1 mezi pravým a levým hippocampem (*Vrajová et al. 2010*).

Semi-kvantifikace panGluN1 proteinu také ukázala výraznou lateralitu mezi pohlavími, která byla mnohonásobně výraznější u pacientů se schizofrenií. U žen byla hladina panGluN1 proteinu, oproti kontrolám, výrazně vyšší v levém hippocampu, u mužských pacientů byla hladina vyšší v pravém hippocampu oproti kontrolní skupině (*Vrajova et al. 2010*), přičemž asymetrický výskyt glutamátových receptorů u schizofreniků bývá mnoha studiemi dáván v souvislost s rozdílným vývojem pravého a levého temporálního laloku (*Harrison et al. 2003*).

#### 2.8.5. MTHFR (Methyltetrahydrofolát reduktasa)

Methyltetrahydrofolát reduktasa je enzym ovlivňující intracelulární a následně také plasmatickou hladinu homocysteinu. Homocystein je síru obsahující aminokyselina chybějící v přirozeně se vyskytujících zdrojích potravy, je tvořen intracelulárně demethylací methioninu skrze dva intermediáty, S-adenosylmethionine a S-adenosylhomocystein (*Castro et al. 2006, Lochman et al. 2013*).

U genu pro MTHFR byl nalezen polymorfismus C677T (rs1801133), který zodpovídá za tvorbu termolabilní formy enzymu MTHFR s nižší enzymovou aktivitou. Toho je dosaženo přeměnou alaninového zbytku na valinový na 222. pozici v aminokyselinové sekvenci (*Frosst et al. 1995*). U homozygotů s alelou T byl výrazný nárůst plasmatické hladiny homocysteinu (*Frosst et al. 1996*), homozygoti s alelou C vykazovali zvýšenou

hodnotu Luteinizačního hormonu (*Šerý et al. 2012*).

C677T polymorfismus bývá v souvislosti se schizofrenií také zmiňován i v kombinaci s Val158Met polymorfismem (rs4680) catechol-o-methyl transferasy (COMT), jelikož se ukazuje, že právě tato kombinace může být riskantní pro vznik schizofrenie (*Muntjewerff et al. 2008; Roffman et al. 2008*), protože právě COMT urychluje přenos methylové skupiny z již zmiňovaného S-adenosylmethioninu na keatecholaminy, což vede k jejich inaktivaci (*Lochman et al. 2013*).

#### 2.8.6. NRG1 (Neuregulin 1)

Neureguliny mají obecně na starosti správnou diferenciaci oligodendrocytů, jejichž úloha je ve vztahu ke schizofrenii čím dál častěji zmiňována. Oligodendrocyty se vyvíjejí v mozku z pluripotentních neuronálních kmenových buněk. Během vývoje CNS putují do oblastí, kde axonům chybí myelinové pochvy a obalují je. Tento obal nebo-li myelinizace je důležitá pro saltatorní přenos signálu na delší vzdálenosti, správnost rychlé axonální vodivosti a přenosu informací v rámci mozku (*Konrádová et al. 2000*).

Neuregulin 1 hraje důležitou roli v plasticitě. Ukázalo se, že snížení jeho vylučování neurony kortikální oblasti vede ke zvýšení inhibičních spojení a ztrátě synaptické plasticity. Stejně tak přemíra exprese neuregulinu 1 vede k narušení excitačně-inhibičních spojení a snížení synaptické plasticity. Jakákoli nerovnováha mezi excitačně-inhibičními spojeními, uvnitř centrální nervové soustavy, se může podílet na narušení synaptické plasticity, což je jeden ze symptomů schizofrenie (*Agarwal et al. 2014*). Důležitým faktorem je také časování exprese N1 podjednotky, to může hrát zásadní roli v patogenezi schizofrenie (*Šerý et al. 2010*).

### 2.8.7. OPRM1 (Opioid receptor Mu-1)

$\mu$ -opioidní receptory se vyskytují na povrchu oligodendrocytů a jejich aktivace vede k posílení syntézy DNA. Jsou spřaženy s G-proteiny. Vážou se na ně především přirozené tělní opioidy jako enkefaliny a endorfiny, ale i přírodní či syntetické opiáty (morfin, kodein, heroin, atd.) (*Cammack et al. 20060*).

U genu pro OPRM1 byl studován polymorfismus A118G, který zapříčiní záměnu asparaginu za kyselinu aspartovou. To ovlivní extracelulární oblast receptoru pro glykosylaci a tím pádem dojde i ke změně odpovědi na endogenní opioidy (*Šťastný et al. 2008*). Polymorfismus A118G ovlivňuje funkci receptoru, kdy alela G snižuje funkci receptoru, u mužů byla spojena s 2,3x vyšším rizikem vzniku schizofrenie, genotyp GG se vyskytoval dokonce 6x častěji u pacientů než u kontrolních osob. Z výsledků studie Šerý et al. (2010) lze vyvodit hypotézu, že nižší exprese receptoru může mít negativní dopad v průběhu vývoje mozku, na myelinizaci kortikálních axonů a podpořit tak vznik hyperaktivity dopaminergního systému, typického pro schizofrenii.

### 2.8.8. SNAP-25 (Synaptosomal-associated protein 25)

Synaptosomal-associated protein 25 je uváděn v souvislosti s exocytosou neurotransmiterů a je nedílnou součástí SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor).

Se schizofrenií je spojován polymorfismus rs1503112, ale také kombinace s polymorfismy jiných genů, konkrétně: 2 kombinace pro polymorfismy rs6280\*rs3746544 a rs6280\*rs3746544 genů DRD3\*SNAP-25, 1 kombinace pro polymorfismy rs1800544\*rs3746544 genů ADRA2A\*SNAP25 a 1 kombinace polymorfismů rs1800544\*rs2519152 genů ADRA2A\*DBH (*Lochman et al. 2013*).

Nedávné objevy ukazují, že fosforylace SNAP-25 proteinu na Ser187 vyvolané proteinkinasou C je kritická pro regulaci transportu NMDA receptoru na povrch buněk (*Lau et al. 2010*).

### **3. Cíle práce**

Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat vztah jednonukleotidového polymorfismu rs3810950 genu pro CHAT (cholin-O-acetyltransferase) ke schizofrenii, pomocí namnožení DNA multiplexovou PCR a využití technologie SNaPshot s výstupem v podobě kapilární elektroforézy na automatickém genetickém analyzátoru. Práce má být přínosnou v ohledu odhalení dalších jednobodových polymorfismů majících vztah ke vzniku schizofrenie. Takle zjištění mohou mít v budoucnu pozitivní vliv na predikci, snížení rizika vzniku poruchy či následné zefektivnění léčby. Mohou mít pozitivní vliv na vznik nových terapeutických možností a postupů, které by mohly spolehlivěji a účinněji podpořit léčbu akutní fáze i snížit riziko relapsu.



## **4. Metodologie**

### **4.1. Popis souboru osob**

Soubor testovaných jedinců čítal 759 osob. Z toho bylo 386 pacientů s diagnostikovanou schizofrenií, hospitalizovaných v psychiatrických léčebnách v České republice. V kontrolním souboru bylo 379 osob, které netrpí žádnou duševní poruchou.

Skupinu kontrol tvořili zdraví jedinci, kteří byli hospitalizováni z jiného důvodu, než je psychická porucha. Obě skupiny vyplnily dotazník, podepsaly informovaný souhlas a poté jim byla odebrána plná krev, pomocí odběrové injekční stříkačky S-Monovette 2.7ml K3E obsahující EDTA, aby se předešlo srážení krve. Odebraná krev byla pak nadále skladována v mrazácích při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2. Izolace DNA**

Prvním krokem k uskutečnění této bakalářské práce byla izolace DNA ze vzorků plné krve. Krev byla nejprve rozmrazena a promíchána, na izolaci bylo použito 200 $\mu\text{l}$ . Ke každému vzorku krve bylo nutno přistupovat jako k potenciálně infekčnímu materiálu.

Izolace DNA byla založena na izolaci magnetickými částicemi. Mix krve s magnetickými částicemi a reakčními reagenty, potřebnými k izolaci, je rozmíchán kovovým hrotem. Ve směsi dojde k navázání volné DNA k magnetickým částicím, ty jsou externím magnetem přitaženy ke stěně magnetizovaného hrotu. Následně je reakční zkumavka promývána jednotlivými reagenčními roztoky. Na závěr je DNA uvolněná z magnetických částic do elučního roztoku. Izolované vzorky DNA jsou následně použity pro multiplex PCR.

Izolace DNA z plné krve byla provedena pomocí izolátoru chemagic Prepito instrument a kitem Prepito BodyFluid Kit (Perkin-Elmer).

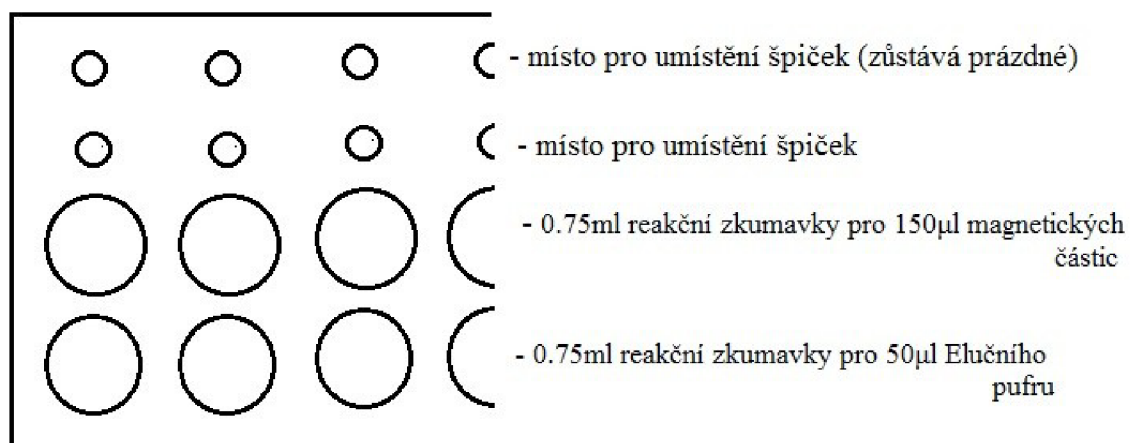




**Zapnutý magnet Vypnutá rotace Vypnutý magnet Zapnutá rotace**

Ilustrace 1: Promíchání vzorku kovovým hrotem (Chemagen)

Nejprve bylo nutno vzorek pro automatický izolátor předpřipravit přichystáním jedné řady špiček do stojánku a 2 řadami 0,75ml plastových zkumavek. Do první řady zkumavek bylo napipetováno 50  $\mu$ l elučního pufru, do druhé řady 150 $\mu$ l magnetických částic. Do destičky bylo do pozice H napipetováno 200 $\mu$ l p krve.



Ilustrace 2: Tip and Tube rack

#### 4.3. Multiplex PCR

Pro multiplexovou PCR jsme použili komerční kit QIAGEN Multiplex PCR Kit. Mastermix pro jednu reakci byl smíchán z 1  $\mu\text{l}$  Q-solution, 3,1  $\mu\text{l}$  PCR vody, 0,4  $\mu\text{l}$  mixu primerů o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{l}$  Qiagen mixu (Tab. 1.).

K 9  $\mu\text{l}$  mastermixu byl přidán 1  $\mu\text{l}$  vy-izolované DNA. Mix všech reagentů byl vložen do termocykléru Veriti (Applied Biosystem, USA) a zapnut na program uvedený v tabulce (tab. 1.1.).

Tabulka 1: Množství použitých reagentů

	1 reakce	100 reakcí
Q-solution	1 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	3,1 $\mu\text{l}$	310 $\mu\text{l}$
Primer mix	0,4 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
Qiagen mix	5 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
celkem	9 $\mu\text{l}$ mix + 1 $\mu\text{l}$ DNA	

Tabulka 1.1: Program termocykléru: *Ngs-Qiagen*

Teplota v Termocykléru	Čas trvání cyklu
95°C	15min
94°C	30s
60°C	90s
72°C	90s

#### 4.4. ExoSAP

Následovalo pročištění pomocí ExoSAP obsahující alkalickou fosfatasa (*SAP - Shrimp Alkaline phosphatase*) a Exonukleasu I. Tohle pročištění zaručí odstranění odpadních produktů PCR. Exonukleasa I odstraní zbylé primery, Alkalická fosfatasa zbaví produkt od zbývajících dNTPs (*Bell et al. 2008*).

Přímo v destičce po proběhlé PCR se k produktům PCR přimíchal 1  $\mu\text{l}$  SAP a 0,25  $\mu\text{l}$  ExoI (tab. 2.). Destička se vložila zpět do termocykléru. Prvních 15 minut probíhala inkubace při 37°C, dalších 15 minut probíhala inaktivace ExoSAP při 80°C.

Tabulka 2: Množství použitých reagentů

SAP ( <i>Shrimp alkaline phosphatase</i> )	1 $\mu\text{l}$
ExoI ( <i>Exonuclease I</i> )	0,25 $\mu\text{l}$

#### 4.5. SnaPshot

Zvýšením teploty v termocykleru na 90°C dojde k denaturaci dsDNA na ssDNA. Při poklesu teploty na 60°C se navážou primery na ssDNA dle platné komplementarity. Primery byly nepárové, různě dlouhé a končily přesně bázi před polymorfismem. Hned za primer se naváže komplementární fluorescenčně značený ddNTP. Každý ddNTP je značen jinou barvou. Díky této fluorescenční značce jsem poté schopni odhalit, jaký nukleotid se navázal.

Pro SNaPshot se použil komerční kit SNaPshot® Multiplex Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Mix pro analýzu, v množství pro jednu reakci, byl namíchan z 1,5 μl PCR produktů pročištěných ExoSAPem, 1,5 μl SnaPshot mixu; 1 μl SnaPshot primerů a 1 μl PCR vody (tab.3.). Následně se mix vložil do termocykleru nastaveného na program uvedený v tabulce 3.1.

Tabulka 3: Množství použitých reagentů

	1 reakce	100 reakcí
SnaPshot MIX	1,5 μl	150 μl
SNAaPshot primer	1 μl	100 μl
Voda	1 μl	100 μl
Celkem	1,5 μl	150 μl

Tabulka 3.1: Program termocykleru

Teplota v Termocykleru	Čas trvání cyklu	
96°C	10s	} 25x
96°C	10s	
60°C	5s	
60°C	30s	
15°C	Hold	

#### 4.6. SAP

Po proběhlém Snapshotu následuje další purifikace pomocí alkalické fosfatasy SAP. Její velká výhoda spočívá ve schopnosti bez problémů pracovat ve většině pufrů a velmi snadné rychlé ireversibilní degradaci, ke které stačí zahřátí na 65°C po dobu 15 min.

Ke každému vzorku DNA byl připipetován 1 μl FastAP. Pročištění probíhalo při 37°C po dobu 60 minut.

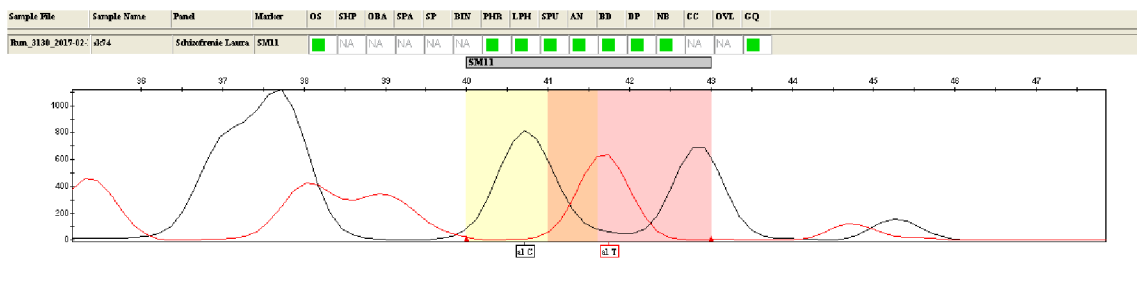
#### 4.7. Denaturace a fragmentační analýza

Během denaturace dojde k rozvolnění ds DNA na ss DNA. Rozdělí se původní vlákno DNA a nově utvořené vlákno tvořené primerem a fluorescenčně značenými ddNTP.

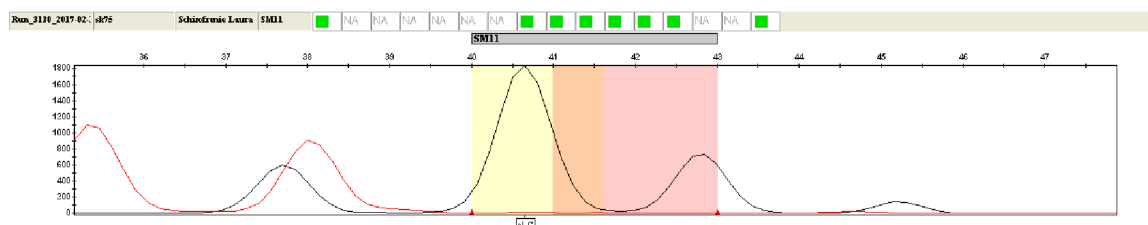
Pro denuraci byl do sekvenační destičky, multikanálovou pipetou, napipetován mix. Mix se skládal z 9 $\mu$ l formamidu a 0,25 $\mu$ l LIZ 120. K němu se multikanálovou pipetou přidala DNA (1 $\mu$ l) po pročištění SAPem (tab.4.). Destička se krátce stočila. Denaturace probíhala při 96°C po dobu 2 minut. Mix se následně nechal zchladit 1 minutu v mrazáku, krátce stočil a vložil do analyzátoru.

Při kapilární elektroforéze vzorky putují skleněnou kapilárou naplněnou pufrem, v níž se jednotlivé úseky DNA rozdělí na základě různé pohyblivosti v elektrickém poli. Velmi malý průměr kapiláry zaručí, že se molekuly DNA seřadí za sebou a nebudou se překrývat. Na výstupu se nachází laser, který excituje fluorescenčně značené ddNTP a jelikož je každý značen jinou barvou, je možné jednotlivé ddNTP na výstupu od sebe rozeznat a díky různé délce primerů rozeznáme jednotlivé polymorfismy daných genů.

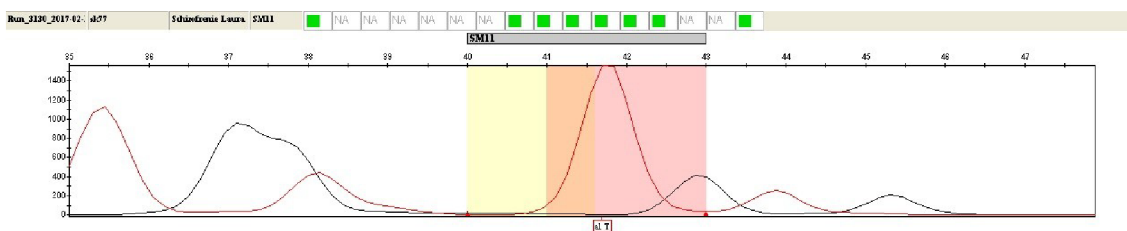
Analýza probíhala na automatickém genetickém analyzátoru 3130 genetic analyzer (Applied Biosystem), s výstupem v podobě kapilární elektroforézy. Analyzátor si sám nabere vzorky, které poté putují tenkou skleněnou kapilárou až k laseru. Jestliže je daný jedinec heterozygot s alelami G a A, na výstupu kapilární elektroforézy se ukáží dva menší píky C a T (il.3), v případě homozygotního jedince ukáže se jeden vysoký pík. Pro jedince s alelou G se ukáže pík pro C (il.4.) a pro jedince s alelou A pík T (il.5.).



*Ilustrace 3: Výsledek z genetického analyzátoru po kapilární elektroforéze: Heterozygot s alelami GA*



*Ilustrace 4: Výsledek z genetického analyzátoru po kapilární elektroforéze: Homozygot s alelou G*



*Ilustrace 5: Výsledek z genetického analyzátoru po kapilární elektroforéze: Homozygot s alelou A*

**Tabulka 4: Množství použitých reagentů**

	1 reakce	100 reakcí
Formamid	9 µl	990 µl
LIZ 120	0,25 µl	27,5 µl
Celkem	9 µl + 1 µl DNA	

## 5. Výsledky

Gen: CHAT (Cholin-O-acetyltransferase)

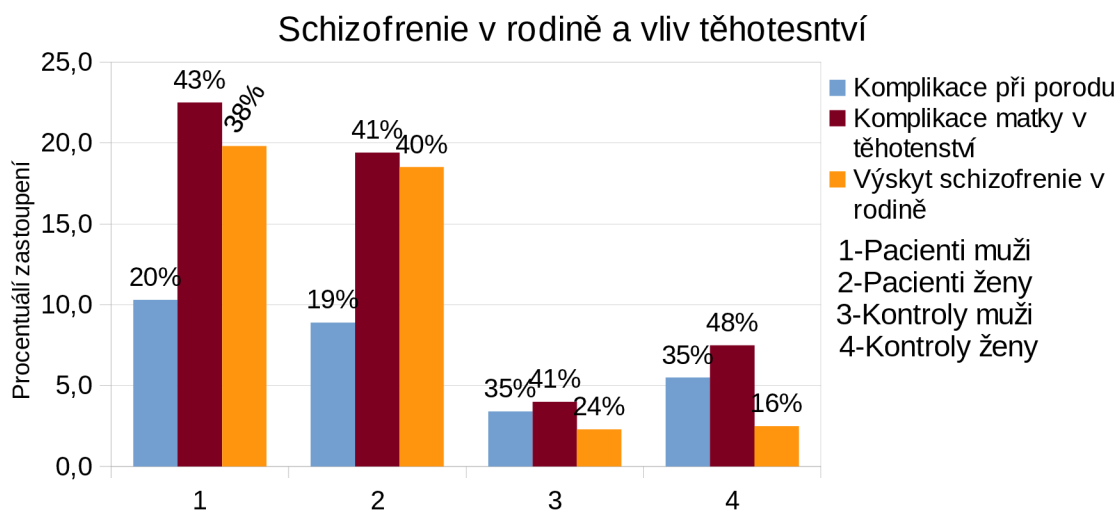
Polymorfismus: rs3810950

Výsledky z analyzátoru byly podrobeny statistickému vyhodnocení. Testování proběhlo pro obě pohlaví dohromady i pro každé zvlášť.

Z deskriptivní statistiky vyplývá, že u pacientů (P), muži (m), ženy (ž), se schizofrenií byla výrazně častější nezaměstnanost (m = 32,4%; ž = 27,4%), než u kontrol (K) (m = 5,7%; ž = 4,0%). Častěji byli také oběťmi útoku, násilí, či vloupání (P: m = 21,0%, ž = 22,6%; K: m = 3,4%, ž = 8,0%), či měli poranění mozku (P: m = 32,8%, ž = 32,3%; K: m = 14,9%, ž = 17,1%).

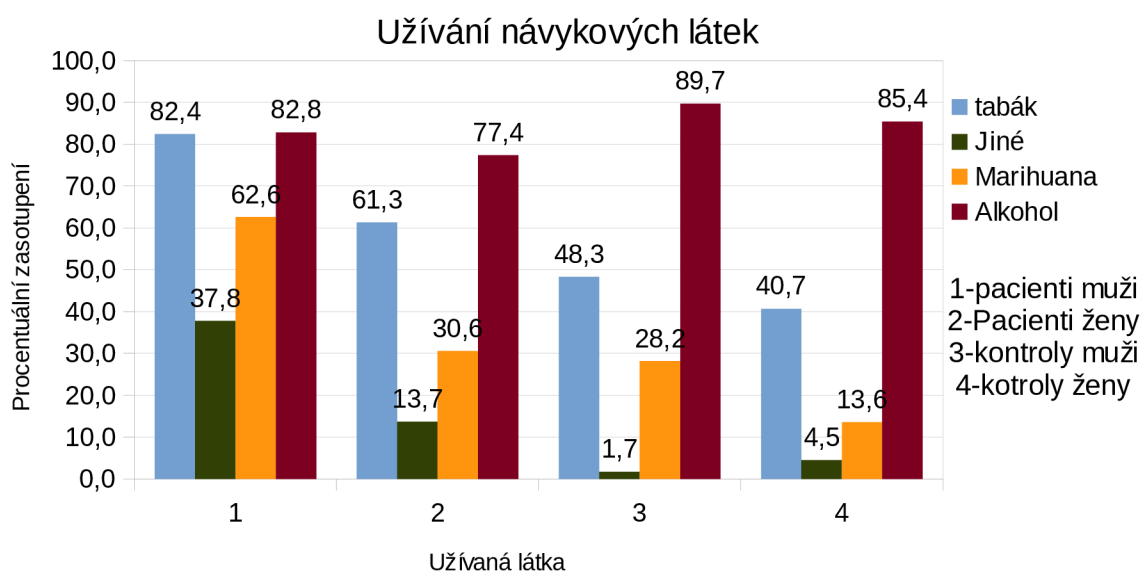
U pacientů byl častější výskyt schizofrenie v rodině (P: m = 19,8%, ž = 18,5%; K: m = 2,3%, ž = 2,5%), stejně tak i komplikace během těhotenství (P: m = 22,5%, ž = 19,4%; K: m = 4,0%; ž = 7,5%) a při porodu (P: m = 10,3%, ž = 8,9%; K: m = 34%, ž = 5,5%) (graf 2.).

Graf. 1: Schizofrenie v rodině a vliv těhotenství



Oproti kontrolám bylo u pacientů také častější kouření (P: m = 82,4%, ž = 61,3%; K: m = 48,3%, ž = 40,7%), užívání marihuany (P: m = 62,6%, ž = 30,6%; K: m = 28,2%, ž = 13,6%), či jiných návykových látek (P: m = 37,8%, ž = 13,7%, K: m = 1,7%, ž = 4,5%), oproti tomu bylo užívání alkoholu přibližně stejné jak u pacientů (m = 82,8%; ž = 77,4%), tak u kontrol (m = 89,7%; ž = 85,4%), (graf 3.), (viz tab. 5.).

Graf 2: Užívání návykových látek



Tabulka 5: Deskriptivní statistika popisu osob

Group	Pacienti		Kontroly	
	muži	ženy	muži	ženy
	(n = 262)	(n = 124)	(n = 174)	(n = 199)
<b>Věk (let)</b>	36.8 ± 11.3	45.1 ± 14.1	41.6 ± 15.9	41.5 ± 15.1
<b>Počet let studia (od ZŠ)</b>	11.9 ± 2.7	11.8 ± 2.2	14.7 ± 3.2	13.5 ± 2.6
<b>Nezaměstnaní</b>	85 (32.4%)	34 (27.4%)	10 (5.7%)	8 (4.0%)
<b>Náboženské vyznání</b>	113 (43.1%)	62 (50.0%)	48 (27.6%)	50 (25.1%)
<b>Vážná nemoc nebo zranění</b>	53 (20.2%)	22 (17.7%)	33 (19.0%)	34 (17.1%)
<b>Finanční potíže/dluhy</b>	50 (19.1%)	22 (17.7%)	41 (23.6%)	76 (38.2%)
<b>Oběti útoku/násilí/vloupání</b>	55 (21.0%)	28 (22.6%)	6 (3.4%)	16 (8.0%)
<b>Výskyt schizofrenie v rodině</b>	52 (19.8%)	23 (18.5%)	4 (2.3%)	5 (2.5%)
<b>Komplikace matky v těhotenství</b>	59 (22.5%)	24 (19.4%)	7 (4.0%)	15 (7.5%)
<b>Komplikace při porodu</b>	27 (10.3%)	11 (8.9%)	6 (3.4%)	11 (5.5%)
<b>Kouření</b>	216 (82.4%)	76 (61.3%)	84 (48.3%)	81 (40.7%)
<b>Alkohol</b>	217 (82.8%)	96 (77.4%)	156 (89.7%)	170 (85.4%)
<b>Užívání marihuany</b>	164 (62.6%)	38 (30.6%)	49 (28.2%)	27 (13.6%)
<b>Jiné návykové látky</b>	99 (37.8%)	17 (13.7%)	3 (1.7%)	9 (4.5%)
<b>Poranění mozku</b>	86 (32.8%)	40 (32.3%)	26 (14.9%)	34 (17.1%)



Tab 6: Deskriptivní statistika

Kategorie	Pacienti		Kontroly	
	muži	ženy	muži	ženy
	(n = 262)	(n = 124)	(n = 174)	(n = 199)
Věk (let)	36.8 ± 11.3	45.1 ± 14.1	41.6 ± 15.9	41.5 ± 15.1

Pro pacienty s heterozygotním zastoupením alel GA byla hodnota testu odds ratio „OR“ 1,05. Riziko výskytu genetické varianty GA je tedy prakticky stejné jak u pacientů, tak u kontrol. Toto potvrzuje i výpočet relativního rizika „RR“, jehož hodnota je rovna 1. Při této genetické variantě vyšla hodnota pravděpodobnosti „p“ 0,94 a je tedy vyšší než míra významnosti (0,05), tudíž je rozdíl v zastoupení GA alel mezi pacienty a kontrolami statisticky nevýznamný (tab. 7.).

Pro pacienty s homozygotním zastoupením alel AA byla hodnota testu RR 1,02 a RR 1,05 a tedy riziko výskytu genotypu AA je téměř stejné jak u pacientů, tak u kontrol. Hodnota pravděpodobnosti (1,00) byla vyšší než míra významnosti (0,05), nelze tedy mluvit o statisticky významném rozdílu v zastoupení mezi pacienty a kontrolami.

Celkové zastoupení alely G (odd 1,03) i alely A (odd 1,05) bylo zhruba stejné u pacientů i kontrol (tab. 7.).

Výsledky hodnoty p u Chi-square testu (p = 0,99) jsou vyšší než míra významnosti (0,05) (tab. 7.1.) a tudíž rozdíl výskytu polymorfismu rs3810950 mezi pacienty a kontrolami nelze považovat za statisticky významný.

Tabulka 7: Testování asociace schizofrenie a rs3810950 pomocí F-testu obou pohlaví

Genotyp/alely	N		Risk	RR	Odd	OR (95% CI)	F-test
	Pacienti	Kontroly					p-value
GG	241	235	0,51	-	1,03	-	-
GA	123	117	0,51	1	1,05	1.03 (0.74-1.42)	0,94
AA	22	21	0,51	1	1,05	1.02 (0.52-2.01)	1,00
G	605	587	0,51	-	1,03	-	-
A	167	159	0,51	1	1,05	1.02 (0.79-1.31)	0,90

Tabulka 7.1: Testování Chi-square testem u obou pohlaví

Polymorfismus	Chi-square test p-value
rs3810950	0,99



Pro muže rozdíl v zastoupení genotypu GA mezi pacienty a kontrolami taktéž nevykazoval statistickou významnost ( $p = 0,94 > 0,05$ ). Výsledky RR i OR testu ukazují, že výskyt genotypu GA je prakticky stejný jak u pacientů, tak u kontrol (RR = 1,03; OR = 1,09) (tab. 8.).

Rozdíl ve výskytu genotypu AA se také neukázal statisticky významným, jelikož hodnota pravděpodobnosti byla 0,69, takže větší než míra významnosti (0,05). Hodnoty testů RR a OR ukázaly, že výskyt genotypu AA je prakticky stejný jak u pacientů, tak kontrol.

Testování pro pomoci Chi-square testu prokázalo, že mezi pacienty a kontrolami není žádný statisticky významný rozdíl ve výskytu rs3810950 polymorfismu ( $p = 0,81$ ) (tab. 8.1.).

Tabulka 8: Testování asociace schizofrenie a rs3810950 pomocí F-testu u mužů

Genotyp/alely	N		Risk	RR	Odd	OR (95% CI)	F-test
	Pacienti	Kontroly					p-value
GG	155	105	0,6	-	1,48	-	-
GA	92	57	0,62	1,03	1,61	1.09 (0.71-1.69)	0,75
AA	15	12	0,56	0,93	1,25	0.85 (0.35-2.07)	0,69
G	402	267	0,6	-	1,51	-	-

Tabulka 8.1: Testování asociace pomocí Chi-square testu u mužů

Polymorfismus	Chi-square test p-value
rs3810950	0,81

Statistické vyhodnocení pro ženy neukázalo žádnou statisticky významnou spojitost pro genotyp GA. Hodnota pravděpodobnosti ( $p = 0,75$ ) byla větší než míra pravděpodobnosti ( $\alpha = 0,05$ ). OR a RR testy prokázaly, že výskyt GA je téměř stejný jak u pacientek tak kontrol (OR = 0,78; RR = 0,85) (tab. 9.).

Rozdíl ve výskytu genotypu AA u pacientů oproti kontrolám u žen se také neukázal být statisticky významným, hodnota pravděpodobnosti ( $p = 1,00$ ) byla vyšší než míra významnosti ( $\alpha = 0,05$ ). Dle OR a RR testu je výskyt varianty AA prakticky stejný jak u pacientek, tak kontrol.

Dle Chi-square testu ( $p = 0,58$ ) také nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v přítomnosti polymorfismu rs3810950 mezi pacienty a kontrolami (tab. 9.1.).

Tabulka 9: Testování asociace schizofrenie a rs3810950 pomocí F-testu u žen

Genotyp/alely	N		Risk	RR	Odd	OR (95% CI)	F-test
	Pacienti	Kontroly					p-value
GG	86	130	0,4	-	0,66	-	-
GA	31	60	0,34	0,85	0,52	0.78 (0.45-1.34)	0,37
AA	7	9	0,44	1,1	0,78	1.17 (0.36-3.7)	0,80
G	203	320	0,39	-	0,63	-	-

Tabulka 9.1: Testování pomocí Chi-square testu u žen

Polymorfismus	Chi-square test p-value
rs3810950	0,58

## **6. Diskuse**

Tato bakalářská práce se zabývala vztahem polymorfismu rs3810950 genu pro CHAT, který byl zkoumán na základě možnosti vztahu ke schizofrenii. CHAT katalyzuje biosyntézu acetylcholinu, neurotransmiteru, který má za úkol přenos signálu mezi sympatickým a parasympatickým nervovým systémem a řídí sekreci dalších neurotransmiterů.

CHAT reguluje hladinu acetylcholinu a tím ovlivňuje mnoho cholin-dependentních neurofyziologických funkcí jako spánek, zpracování vizuálních vjemů, zpracování informací a kognitivních funkcí (*Whittaker 1988; Selden et al. 1998; Bacciottini Et al.; 2001; Beelke et al. 2002*).

Polymorfismy v genu pro CHAT jsou již spojovány s Alzheimerovou chorobou. Mnoho studií také prokázalo spojitost abnormalit v cholinergní aktivitě se schizofrenií (*Holt et al. 2005; Holt et al. 1999*). Další studie také popsaly abnormality v oblasti striata a změny v zastoupení cholinergních neuronů či receptorů v mozcích pacientů se schizofrenií (*Dean et al. 1996; Readler et al. 2003; Breese et al. 2000; Durany et al. 2000; Holt et al. 1999*). Také vysoké dávky anticholinergních aferentů či redukce cholinergních neuronů v oblasti striata se ukázaly mít podobný efekt, jako přemíra dopaminové transmise.

Ve studii Mancana et al. (2007) byla nalezena spojitost schizofrenií přímo s polymorfismem 3810950 na Baskické populaci spolu s polymorfismem rs1880676. Tato spojitost se však poté nepodařila prokázat u španělské populace.

V této asociační studii se spojitost polymorfismu rs3810950 se schizofrenií prokázat nedokázala. Studie byla vedena pro muže i ženy. Statistický výzkum byl proveden pro obě pohlaví dohromady i separovaně, nicméně nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu polymorfismu mezi pacienty a kontrolami.

Rozdílný výsledek může mít na svědomí rozdílné etnické skupiny a různá velikost populací, na nichž byly studie prováděny. Naše studie byla provedena na 759 osobách, z toho bylo 386 pacientů a 379 kontrol. Studie Mancana et al. (2007) byla provedena na 252 osobách z Navarre a přilehlého okolí. 168 jedinců bylo Baskické národnosti a 84 Španělské. Z toho vyplývá, že studie Mancana et al. (2007) byla prováděna na menší

skupině obyvatel a také na vzorku epidemiologicky izolované populace. To zajistilo vysokou homogenitu vzorku v rámci této etnické skupiny, čímž by mělo dojít k maximalizaci pravděpodobnosti, že budou odhaleny důležité genetické znaky.

Přestože byl výsledek studie negativní, nelze opomenout její přínos. Dochází tak k pozvolnému odhalování profilu poruchy a poskytnutí dalších informací pro volbu oblasti zaměření výzkumu týkající se genetické podstaty schizofrenie.

## **7. Shrnutí**

Schizofrenie je závažná duševní, multifaktoriální, polygenní porucha postihující asi 1% populace. Její závažnost spočívá nejen v problematické diagnostice a finanční nákladnosti léčby, ale i ve skutečnosti, že dochází k významnému narušení kognitivních schopností, mezilidských vztahů atd. Neléčená schizofrenie navíc velmi často končí sebevraždou.

Cílem této práce bylo prozkoumat možnost nalezení nové asociace mezi schizofrenií a jednonukleotidovým polymorfismem rs3810950 genu pro CHAT, kódující cholin-O-acetyltransferasu.

Práce byla prováděna formou asociační studie. Ta má za cíl porovnávání genotypů mezi kontrolami a pacienty. Obecně se užívá k odhalování genetických predispozic k multifaktoriálním onemocněním.

Praktická část práce probíhala v několika krocích. Prvně bylo třeba odebrat vzorky krve pacientů z různých psychiatrických léčeben v České republice a kontrol. Z plné krve byla izolována DNA, ta byla poté namnožena pomocí multiplexovou PCR. Genotypizace byla provedena metodou SnaPshot s fetekcí na kapilárním sekvenátoru ABI3130.

Výsledky z analyzátoru byly statisticky vyhodnoceny. Testování asociace pro schizofrenii bylo prováděno pro obě pohlaví dohromady i zvlášť. V této práci na souboru osob kontrolních a osob se schizofrenií nebyl prokázán statisticky významný vztah mezi polymorfismem rs3810950 genu pro CHAT a schizofrenií.

## **8. Summary**

Schizophrenia is a serious mental, multifactorial, polygenic disorder which is affecting about 1% of the population. The severity of schizophrenia is not only a problematic diagnosis and financial demands but there is also a disruption of cognitive skills, interpersonal relationships etc. Untreated schizophrenia can end up by suicide in many cases.

The aim of this research was the possibility of finding a new association between single nucleotide polymorphism rs3810950 of CHAT gene encoding Cholin O-Acetyltransferase and schizophrenia.

Research has been implemented in a form of associative study. The goal of this method is to compare a genotype between patients and control samples. Generally, it is used to detect genetic predispositions of multifactorial disorders.

The practical part of the research was divided into several steps. At first it was necessary to draw the patients' blood from various asylums in the Czech Republic. From the whole blood it was needed to isolate DNA, after that DNA was multiplied by multiplex PCR. Genotyping was done by the SnaPshot method with detection on the capillary sequencer ABI3130.

Results from the analyzer were sent to be evaluated. Testing of association for schizophrenia has been realised for both genders together and separated as well. In this work, a statistically significant relationship between the polymorphism of rs3810950 gene for CHAT and schizophrenia.

## **9. Použitá Literatura**

1. Aleman A, Kahn RS, Selten JP. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60: 565–571.
2. Agarwal A, Zhang M, Trembak-Duff I, Unterbarnscheidt T, Radyushkin K, Dibaj P, Martins de Souza D, Boretius S, Brzózka MM, Steffens H, Berning S, Teng Z, Gummert MN, Tantra M, Guest PC, Willig KI, Frahm J, Hell SW, Bahn S, Rossner MJ, Nave KA, Ehrenreich H, Zhang W, Schwab MH. Dysregulated expression of neuregulin-1 by cortical pyramidal neurons disrupts synaptic plasticity. *Cell Reports*. 2014; 8: 1130–45.
3. American Psychiatric Association. "Schizophrenia", *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc. 2000.
4. Austin CP, Ky B, Ma L, Morris JA, Shughrue PJ. Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience*. 2004; 124: 3–10.
5. Bacciottini L, Passani MB, Mannaioni PF, Blandina P. Interactions between histaminergic and cholinergic system in learning and memory. *Behavioural Brain research*. 2001; 124: 183-194.
6. Beelke M, Sannita WG. Cholinergic function and dysfunction in the visual system. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2002; 24: 113-117.
7. Bell JR. A simple way to Treat PCR Products Prior Sequencing Using ExoSAP-IT®. *Biotechniques*. 2008; 44: 834.
8. Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders—cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 428–433.
9. Boydell J. Risk factors for schizophrenia. *Expert Rev Neurother*. 2001; 1: 183–191.
10. Brandon NJ, Millar JK, Korth C, Sive H, Singh KK, Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *The Journal of Neuroscience*. 2009; 29 (41): 12768–75.
11. Brandon NJ, Sawa A. Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12: 707–722.
12. Breese CR, Lee MJ, Adams CE, Sullivan B, Logel J, Gillen KM, et al. Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23:351–364.
13. Cammack R et al. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition*. New York: Oxford university press, 2006.
14. Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002; 159: 1080–1092.
15. Castro R, Rivera I, Blom HJ, et al. Homocysteine metabolism,



- hyperhomocysteinaemia and vascular disease: An overview. *J Inherit Metab Dis.* 2006; 29: 3–20.
16. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry.* 2008; 13: 36–64.
  17. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F et al. Behavioral phenotypes of *Disc1* missense mutations in mice. *Neuron.* 2007; 54: 387–402.
  18. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:327–335.
  19. Dean B, Crook JM, Opeskin K, Hill C, Keks N, Copolov DL. The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate- putamen of subjects with schizophrenia 1996; *Mol Psychiatry* 1:54 –58.
  20. Durany N, Zochling R, Boissl KW, Paulus W, Ransmayr G, Tatschner T, et al. Human post-mortem striatal alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor density in schizophrenia and Parkinson's syndrome. *Neurosci Lett.* 2000; 287:109 –112.
  21. Fallin MD, Lasseter VK, Wolyniec PS, McGrath JA, Nestadt G, Valle D, Liang KY, Pulver AE. Genomewide linkage scan for schizophrenia susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families shows evidence of linkage on chromosome 10q22. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(3):601– 611.
  22. Faraone SV, Hwu HG, Liu CM, Chen WJ, Tsuang MM, Liu SK, et al. Genome scan of han chinese schizophrenia families from taiwan: Confirmation of linkage to 10q22.3. *Am J Psychiatry.* 2006; 163(10):1760–1766.
  23. Frosst P, Blom HJ, Milos R, *et al.* A Candidate Genetic Risk Factor for Vascular-Disease - a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Nat Genet.* 1995; 10: 111–113.
  24. Gladwin TE, Derks EM, Genetic Risk and Outcome of Psychosis (GROUP), Rietschel M, Mattheisen M, Breuer R, et al. Segment-wise genome-wide association analysis identifies a candidate region associated with schizophrenia in three independent samples. *PLoS ONE* 2. 2012; 7:e38828.
  25. Haque FN, Lipina TV, Roder JC, Wong AHC. Social defeat interacts with *Disc1* mutations in the mouse to affect behavior. *Behav Brain Res.* 2012; 233: 337–344.
  26. Harrison PJ, Law AJ, Eastwood SL. Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1003:94–101
  27. Hickman M, Vickerman P, Macleod J, Kirkbride J, Jones PB. Cannabis and schizophrenia: model projections of the impact of the rise in cannabis use on historical and future trends in schizophrenia in England and Wales. *Addiction.* 2007; 102: 597–606.
  28. Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S et al. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 14501–14506.
  29. Holt JD, Bachus ES, Hyde MT, Wittie M, M Herman MM, Vangel M, Saper BC,



- Kleinman JE. Reduced Density of Cholinergic Interneurons in the Ventral Striatum in Schizophrenia: An In Situ Hybridization Study. *BIOL PSYCHIATRY* 2005; 58:408–416.
30. Holt DJ, Herman MM, Hyde TM, Kleinman JE, Sinton CM, German DC, et al. Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience*. 1999; 94:21–31.
  31. Hosak L. New findings in the genetics of schizophrenia. *World J Psychiatry*. 2013; 3: 57–61
  32. Janoutová J, Janáčková P, Šerý O, Zeman T, Ambroz P, Kovalová M, Vařechová K, Hosák L, Jiřík V, Janout V. Epidemiology and risk factors of schizophrenia. *Neuroendocrinol Lett* 2016; 37(1):1–8
  33. Karson CN, Casanova MF, Kleinman JE, Griffin WS. Choline acetyltransferase in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1993; 150: 454–459.
  34. Karson CN, Mrak RE, Husain MM, Griffin WS. Decreased mesopontine choline acetyltransferase levels in schizophrenia. Correlations with cognitive functions. *Mol Chem Neuropathol*. 1996; 29: 181–191.
  35. Klimeš L. *Slovník cizích slov*. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 1981.
  36. Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vydání. Jinončany: H&H, 2000.
  37. Kristiansen LV, Beneyto M, Haroutunian V et al. 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.
  38. Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M et al. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7:48–55.
  39. Látalová K, Pidrman V, Dlouhoobá terapie shizofrenie, *Psychiat. pro praxi*;2006; 4:158-160.
  40. Lau, C. G., Takayasu, Y., Rodenas-Ruano, A., Paternain, A.V., Lerma, J., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S. SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30: 242–254.
  41. Li W, Zhou Y, Jentsch JD, Brown RAM, Tian X et al. Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U SA*. 2007; 104: 18280–18285.
  42. Lipina TV, Haque FN, McGirr A, Boutros PC, Berger T, Mak TW et al. Prophylactic valproic acid treatment prevents schizophrenia-related behaviour in Disc1-L100P mutant mice. *PLoS One*. 2012; 7: e51562.
  43. Lipina TV, Niwa M, Jaaro-Peled H, Fletcher PJ, Seeman P, Sawa A et al. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 2010; 9: 777–789.
  44. Liu J, Juo SH, Dewan A, Grunn A, Tong X, et al. Evidence for a putative bipolar disorder locus on 2p13-16 and other potential loci on 4q31, 7q34, 8q13, 9q31, 10q21-24, 13q32, 14q21 and 17q11-12. *Mol Psychiatry*. 2003; 8(3):333–342.

45. Le Corre S, Harper CG, Lopez P et al. Increased levels of expression of an NMDAR1 splice variant in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *NeuroReport*. 2000; 11:983–986.
46. Lewis CM, Levinson DL, Wise LH, DeLisi LE, Strau RE, Hovatta I, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, Part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2003; 73:34-48.
47. Lochman J, Balcar VJ, Šťastný F, Šerý O. Preliminary evidence for association between schizophrenia and polymorphisms in the regulatory Regions of the ADRA2A, DRD3 and SNAP-25 Genes. *Psychiatry Res*. 2013;205:7–12.
48. Lochman J, Plesník J, Janout V, Povová J, Mišek I, Dvořáková D, et al. Interactive effect of MTHFR and ADRA2A gene polymorphisms on pathogenesis of schizophrenia. *Neuroendocrinol Lett*. 2013;34:792–7.
49. Mancamad, Mata I, Kerwin RW, Arraz MJ. Choline acetyltransferase variants and their influence in schizophrenia and olanzapine response. *American Journal of Medical Genetics*. 2007; 144B: 849-853.
50. McGrath JJ, Eyles DW, Pedersen CB, Anderson C, Ko P, Burne TH, *et al*. Neonatal vitamin D status and risk of schizophrenia: a population-based case-control study. *Arch Gen Psychiatry*. 2010; 67: 889–894.
51. Millar JK, Christie S, Semple CA, Porteous DJ. Chromosomal location and genomic structure of the human translin-associated factor X gene (TRAX; TSNAX) revealed by intergenic splicing to DISC1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Genomics*. 2000; 67: 69–77.
52. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR et al. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science*. 2005; 310: 1187–1191.
53. Mohr P. Psychózy. Herman E, a kol. Konziliární psychiatrie. *Medical Tribune* 2007: 74–78.
54. Mohr P, Schizofrenie: diagnostika a současné terapeutické možnosti, *Med. Praxi* 2012; 9 : 342–346.
55. Mubumbila V, Sutter A, Ptok U, Heun R, Quirin-Stricker C. 2002. Identification of a single nucleotide polymorphism in the choline acetyltransferase gene associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 333:9–12
56. Niwa M, Kamiya A, Murai R, Kubo K, Gruber AJ, Tomita K et al. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron*. 2010; 65: 480–489.
57. Oda Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous systém. *Pathology interantional*. 1999; 49: 921-937.
58. Panichareonn B, Nakayama K, Iwamoto S, Thurakitwannakarn W, Sukhumsirichart W. Association of CTXN-SLC12A2 polymorphisms and schizophrenia in a Thai population. *Behav brain Funtions*. 2012; 8:27
59. Pletnikov MV, Ayhan Y, Nikolskaia O, Xu Y, Ovanesov MV, Huang H et al. Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral

- abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2008; 13: 173–186, 115.
60. Petráčková V, Krasu J et al. *Akademický slovník cizích slov*. ACADEMIA. Praha 1998.
  61. Perälä J, Suvisaari J, Saarni SI, Kuoppasalmi K, Isometsa E, Pirkola S, et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64: 19–28.
  62. Porteous DJ, Millar JK. Disrupted in schizophrenia 1: building brains and memories. *Trends Mol Med*. 2006; 12: 255–261.
  63. Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Gorey JG, Lee KS, et al. In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003; 160:118–127.
  64. Saha S, Chant D, McGrath J. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch Gen Psychiatry*. 2007; 64: 1123–1131.
  65. Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: Direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72:4376–4380.
  66. Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*. 1976; 261:717–719.
  67. Selden NR, Gitelman DR, Salamon-Murayama N, Parrish TB, Mesulam MM. Trajectories of cholinergic pathways within the cerebral hemispheres of the human brain. *Brain a journal of neurology*. 1998; 121:2249-2257.
  68. Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol*. 2005; 19: 187–194.
  69. Schurov IL, Handford EJ, Brandon NJ, Whiting PJ. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry*. 2004; 9: 1100–1110.
  70. Le Strat Y, Ramoz N, Gorwood P. The role of genes involved in neuroplasticity and neurogenesis in the observation of a gene-environment interaction (GxE) in schizophrenia. *Current Molecular Medicine*. 2009; 9 (4): 506–18.
  71. Straub RE, MacLean CJ, O'Neil FA, Walsh D, Kendler KS. Support for a possible schizophrenia vulnerability locus in region 5q22-31 in Irish families. *Mol Psychiatry*. 1997;148-55.
  72. St Clair D, 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: 13–16.
  73. Szkulcka-Dębek M, Walczak J, Augustyńska J, Miernik K, Stelmachowski J, Pieniżek I, et al. Epidemiology and Treatment Guidelines of Negative Symptoms in Schizophrenia in Central and Eastern Europe: A Literature Review. *Clin Pract Epidemiol Ment Health*. 2015; 11: 158-65.
  74. Šeda O, Liška F, Šedová L. *Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a*

genomiky. Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN. 2005-2006.

75. Šerý O, Lochman J, Povová J, Plesník J, Balcar VJ. Association between 5q23.2-located polymorphism of CTXN3 gene (Cortexin 3) and schizophrenia in European-Caucasian males; implications for the aethiology of schizophrenia. *Behav and Brain Functions* 2015; 11:10.
76. Šerý O, Prikryl R, Častulík L, Št'astný F. A118G polymorphism of OPRM1 gene is associated with schizophrenia. *J Mol Neurosci*. 2010; 41:219–22.
77. Šerý O, Šramkova T, Klempova J, Štastny F, Lochman J, Khan NA. The relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and serum levels of luteinizing hormone in males with erectile dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012; 33: 499–504.
78. Št'astný F, Baleár JV. Schizofrenie jako genetická porucha synaptického spojení. *Psychiatrie* 2008; 12 (suppl. 2): 29-38.
79. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia „just the facts“ 5. treatment and prevention. Past,present and future. *Schizophr Res* 2010; 122: 1-23.
80. Tandom R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, “Just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res*. 2008; 102: 1–18.
81. Thoma P, Daum I. Comorbid substance use disorder in schizophrenia: a selective overview of neurobiological and cognitive underpinnings. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2013; 67: 367–383.
82. Thomson PA, Malavasi EL V, Grünewald E, Soares DC, Borkowska M, Millar JK. DISC1 genetics, biology and psychiatric illness. *Front Biol (Beijing)*. 2013; 8: 1–31.
83. ÚZIS ČR (2014). *Czech Health Statistics Yearbook 2013*. Prague:ÚZIS ČR.
84. Vrajova, M., Stastny, F., Horacek, J., Lochman, J., Sery, O., Pekova, S., Klaschka, J., Hoschl, C., 2010. Expression of the hippocampal NMDA receptor GluN1 subunit and its splicing isoforms in schizophrenia: postmortem study. *Neurochemical Research*. 2010; 35: 994–1002.
85. *Whittaker VP. The cholinergic synapse. Handbook of Experimental Pharmacology. 1988; 86*

## **10. Internetové zdroje**

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genecmd=Retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=1103](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genecmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=1103)  
– 20.4.2017; NCBI; Gene ID: 1103

<http://www.chemagen.com/chemagic-prepito/> - 9.5. 2017; Chemagen; Perkin Elmer