

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARSTITEADUSKOND

FÜSIOLOOGIA OSAKOND

Ahto Salumets

**Skisofreenia ja *IKBKE* geeni vahelised seosed**

Bakalaureusetöö

Juhendajad vanemteadur Kati Koido

teadur Tiit Nikopensius

TARTU 2014

# SISUKORD

LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Ajalugu .....	6
1.2 Üldine .....	7
1.3 Sümptomid.....	7
1.4 Skisofreenia alatüübid ja teised psühhootilised häired.....	8
1.5 Skisofreenia levinumad hüpoteesid .....	9
1.6 Pärilikkus .....	11
1.7 Skisofreenia ja infektsioonide seosed.....	11
1.8 Geen <i>IKBKE</i> .....	12
1.8.1 IKKε ja PRR-id.....	13
1.8.2 IKKε: avastamine ja interaktsioonid.....	14
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	19
2.1 Töö eesmärk .....	19
2.2 Materjalid ja meetodika.....	19
2.2.1 Katseisikud.....	19
2.2.2 DNA eraldamine ja genotüpeerimine .....	20
2.2.3 Statistiline analüüs .....	22
2.3 Tulemused ja arutelu .....	22
KOKKUVÕTE.....	27
RESÜMEE/SUMMARY .....	28
TÄNUAVALDUSED .....	29
KASUTATUD KIRJANDUS .....	30
LIHTLITSENTS .....	40

## LÜHENDID

T-ARMS-PCR	<i>tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction</i>
BLOC-1	<i>biogenesis of lysosome-related organelles complex 1</i>
CLR	<i>C-type lectin receptor</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, Tenth Revision</i>
IFN	<i>interferon</i>
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	<i>interleukin</i>
IL-1R	<i>IL-1 receptor</i>
LPG2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor-like protein</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MINI	<i>Mini International Neuropsychiatric Interview</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NAP1	<i>NF-<math>\kappa</math>B activating kinase-associated protein 1</i>
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
Poly(I:C)	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene I protein</i>
RLR	<i>retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptor</i>
SINTBAD	<i>similar to NAP1 TBK1 adaptor</i>

TANK	<i>TNF receptor-associated factor (TRAF) family member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-R1	<i>TNF receptor-1</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing interferon-<math>\beta</math></i>

## SISSEJUHATUS

Skisofreenia on tõsine ajuhaigus, mis on vaevanud inimesi läbi ajaloo. Praegune arusaam skisofreeniast tuleneb peamiselt Emil Kraepelini, Eugen Bleuleri ja Kurt Schneideri töödest. Haigust iseloomustavad nii positiivsed sümptomid nagu hallutsinatsioonid ja luulud, kui ka negatiivsed sümptomid nagu apaatsus ja sotsiaalne võõrandumine. Skisofreenia esinemissagedus on üsna kõrge, vahemikus 0,4–0,7% ning selle haiguse mõju majandusele on suur. Skisofreenia on multifaktoriaalne haigus, millel eristatakse mitmeid alatüpe ning mille tekkel on olulised nii geneetilised eelsoodumused kui ka keskkonnast tingitud faktorid. Paraku pole selle haiguse tekkepõhjused veel selged.

Üheks tuntumaks keskkonnast tingitud riskifaktoriks on ema infektsioon raseduse ajal, mida seostatakse lapse suurema tõenäosusega haigestuda skisofreeniasse. Enim tähelepanu on pälvinud ema haigestumine grippi, kuid ka haigestumine teistesse viirus- ja bakteriaalsetesse haigustesse on näidanud olulisi seoseid. Mehhanism, mis põhjustab suurenenud haigestumise riski, on aga veel välja selgitamata.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks on uurida *IKBKE* geeni, mille produkt *IKKε* osaleb viirusvastastes signaaliradades, polümorfismide rs1539243, rs2274902, rs1930437 ja rs1953090 võimalikku seost skisofreeniaga juht-kontroll assotsiatsiooniuuringus Eesti populatsioonis. Varasemalt on leitud seos eelnevalt mainitud polümorfismide ja depressiooni ning paanikahäire vahel. Uurimustöö viidi läbi TÜ arstiteaduskonna füsioloogia osakonnas.

Märksõnad: skisofreenia, *IKBKE*, SNP, juht-kontroll assotsiatsiooniuuring

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Ajalugu

Praegune arusaam skisofreeniast tuleneb peamiselt Emil Kraepelini, Eugen Bleuleri ja Kurt Schneideri töödest. Erinevused nende ideedes haiguse olemuse kohta on viimasel sajandil põhjustanud palju lahkarvamusi haiguse definitsiooni suhtes (Hoenig, 1983). Kuigi esimeste skisofreeniale omaste kirjelduste vanus on mitu tuhat aastat, siis haiguse kui sellise mõiste pärineb 19. sajandi keskpaigast. Ewald Hecker ja Karl Ludwid Kahlbaum kirjeldasid hebefreeniat ja katatooniat kui eraldiseisvaid vaimse mandumise seisundeid. Jean-Pierre Falret oli eelnevalt kirjeldanud *folie circulaire*’i, mis on tänapäeval tuntud kui bipolaarne häire. Kraepelin märkis ära sarnasused katatonia, hebefreenia ja paranoidse dementsusega patsientide vahel. Sarnasused põhinesid haiguse alguses nooruki- või varajases täiskasvanueas, tendentsis halvenemisele ning haiguse tulemis, milleks oli dementsus või vaimne tuhmus. Ta eristas selle grupi, mida ta nimetas *dementia praecox*’iks *folie circulaire*’st, mida ta nimetas maniakaaldepessiivseks hulluseks. Viimast iseloomustas episoodilisus, halvenemise puudumine ning parem tulem (Tandon jt, 2009).

Kraepelin uskus, et skisofreenia on ühese etioloogiaga, kindla patoloogiaga haigus. Tol perioodil saadaval olevad meetodid ei olnud piisavad piiritlemaks etioloogiat või patoloogiat ning ta rõhutas „üldise kliinilise pildi“ olulisust haiguse määratlemisel. Mõjutatuna süüfilise patsientidest, kellel oli tekkinud neurosüüfilis ning kelle puhul haiguse kulg ja tulemus olid seotud haigustekitaja tuvastamisega, tundus talle, et haiguse kulu ja lõpptulemuse kirjeldamine on parim lahendus eristamiseks erinevaid psühhiaatrilisi haiguseid. Seega ta identifitseeris skisofreenia selle alguse (algab nooruki- või varajases täiskasvanueas), kulu (krooniline ning halvenev) ning lõpptulemuse (püsiv ja valdav vaimne kahjustus) läbi (Tandon jt, 2009).

Eugen Bleuler defineeris rea sümptomeid, mida ta arvas olevat ainuomased just skisofreeniale ning mis alati esinevad antud haiguse puhul. Ta arvas, et haiguse kulg ja tulem võivad varieeruda. Lisaks arvas ta, et skisofreenia olemus ei peitu väärkujutlustel ja hallutsinatsioonidel, pidades neid kaasnevateks sümptomiteks. Haiguse olemus peitus tema arvates psüühiliste funktsioonide killustumises, mis viis põhिसümptomite tekkele, mis olid esindatud kõikidel patsientidel ning milleks olid taju kadumine, tuimus, ebakindlus ja autism. Ta uskus ka, et eksisteerib ka palju kergemaid vorme ning laiendas seega oluliselt

skisofreenia kui haiguse käsitlusala (Tandon jt, 2009). Bleuler nimetas ka *dementia praecox*’i ümber skisofreeniaks, et väljendada oma mõtteid haiguse tekkepõhjusest (Hunter ja Woodruff, 2005).

Karl Jaspers uskus, et skisofreenia peamine defekt on empaatilise suhtluse kahjustus ning kasutas „mitte mõistmist“ skisofreeniat eristava tunnusena. Kurt Schneider arendas seda käsitlust edasi ning defineeris 11 esimese astme sümptomit, mida ta arvas olevat iseloomulikud just skisofreeniale. Tänapäeval tuntakse neid sümptome positiivsete sümptomite nime all ning need ei ole skisofreeniale ainuomased (Tandon jt, 2009).

Nendes kolmes käsitluses on selged erinevused. Kraepelinil ei olnud kindlaid kriteeriume diagnoosi määramiseks, vaid lähtus „üldisest kliinilisest pildist“ ning rõhutas pikaajalise haiguskulu ning tulemi osatähtsust. Bleuleril ja Schneideril olid kindlad kriteeriumid, aga need olid väga erinevad ning keskendusid kindlatele haiguse aspektidele. Praegune arusaam skisofreeniast hõlmab endas Kraepelini käsitletud kroonilisust, Bleuleri negatiivseid sümptomeid ning Schneideri positiivseid sümptomeid, ehkki kasutab nende elementide erinevaid kombinatsioone ja tõlgendusi (Tandon jt., 2009).

## **1.2 Üldine**

Skisofreenia on tõsine ajuhaigus, mis on oluliseks koormaks nii tervishoiusüsteemile kui majandusele üldiselt. Tavaliselt kulub skisofreeniale 1,5–3% tervishoiu eelarvest (Knapp jt, 2004). Skisofreenia esinemissagedus jääb vahemikku 0,4–0,7% (Saha jt, 2005) ning metaanalüüsi, mis hõlmas 1965. kuni 2001. avaldatud uurimusi, tulemusena saadi skisofreenia esinemuse mediaaniks 15,2 100 000 inimese kohta aastas (McGrath jt, 2004). Üldtuntud arusaam on, et nooremas vanuse astmes on meestel kõrgem risk haigestuda ning vanuses üle 40 on naistel haigestumise risk kõrgem. Lisaks on leitud, et meestel on eluaja jooksul 1,4 korda suurem risk haigestuda skisofreeniasse kui naistel (Aleman jt, 2003). Uurimused on näidanud, et skisofreenia esinemus on linnapiirkondades suurem võrreldes maapiirkondadega ning (im)migrantide hulgas suurem kui kohalike elanike hulgas (McGrath jt, 2004). Skisofreenia algab vanusevahemikus 15–45 eluaastat ning harva esineb ka juhtumeid, kus see on alanud enne puberteedi või peale 50. eluaastat (Tandon jt, 2009).

## **1.3 Sümptomid**

Haigust iseloomustavad väga mitmekesised sümptomid, mida jagatakse positiivseteks ja negatiivseteks. Positiivseteks sümptomiteks nimetatakse sümptomeid, mida tervetel inimestel

ei esine, negatiivseteks aga neid, mis väljenduvad normaalse emotsionaalse vastuse või mõtlemisprotsesside defitsiidis. Positiivsete sümptomite hulka kuuluvad näiteks moonutatud reaalsustaju, hallutsinatsioonid ja luulud. Kuigi skisofreenikutel on täheldatud palju erinevaid luulude tüüpe, loetakse kõige sagedasemateks jälitusega seotud luulusid ning väärarusaamu, et tavalised sündmused, esemed või kellegi käitumine omavad iseäranis just temale tavatut tähendust. Hallutsinatsioonidest on kõige tavalisemad need, mis on seotud kuulmisega. Tavaliselt kuuleb inimene ähvardavat või süüdistavat häält. Negatiivsete sümptomite hulka kuuluvad näiteks apaatsus, sotsiaalne võõrandumine, motivatsiooni langus, lohakas hügieenis ja riietumises ning sõnade vaesus kõnelemisel, mis rasketel juhtudel võib kujuneda n-ö sõnasalatiks (Tandon jt, 2009).

#### **1.4 Skisofreenia alatüübid ja teised psühhootilised häired**

Tuntakse mitmeid erinevaid skisofreenia alatüüpe. ICD-10 (*International Classification of Diseases, Tenth Revision*) kirjeldatud alatüüpide hulka kuuluvad järgnevad:

- Paranoidne skisofreenia (F20.0), mille puhul on valdavaks hallutsinatsioonid ja luulumõtted. Kergemal kujul võivad esineda ka katatoonsed sümptomid, emotsioonide vaesus ja jutu seosetus.
- Hebefeenset skisofreeniat (F20.1) iseloomustavad emotsioonide vaesus ja eesmärgitu ning arusaamatu käitumine. Võivad esineda ka hallutsinatsioonid ja luulud, kuid need ei tohi domineerida üldises kliinilises pildis.
- Katatoonne skisofreenia (F20.2), mida iseloomustavad vähemalt teatud perioodil esinenud katatoonsed sümptomid. Siia kuuluvad stuupor, rigiidsus, ebasobivates või kummalistes asendites püsimine ja eesmärgitud liigutused.
- Diferentseerumata skisofreenia (F20.3) diagnoositakse sellisel juhul, kui esinevad skisofreeniale omased tunnused, kuid nendest ei piisa patsiendi liigitamiseks teiste tüüpide alla või esinevad mitmele alatübile omased sümptomid.
- Skisofreenia järeldepressioon (F20.4) on seisund, mille puhul esinesid skisofreeniale omased sümptomid viimase 12 kuu jooksul, kui antud hetkel on peamiseks depressioonile omased sümptomid.
- Residuaalne skisofreenia (F20.5) tähendab seda, et teatud perioodil esinesid skisofreenia teistele alatüüpidele omased sümptomid, kui antud momendil need puuduvad. Lisaks on esindatud negatiivsed sümptomid, nagu näiteks passiivsus ja initsiatiivi puudus, kõne vaesus, vähenenud sotsiaalne aktiivsus ja enese eest hoolitsemine.



- Lihtne skisofreenia (F20.6) diagnoositakse juhul, kui isikul ei ole eelnevalt diagnoositud ühtegi teist skisofreenia alatüüpi ega mingisugust teist psühhootilist häiret, kuid esineb aeglane aga pidev negatiivsete sümptomite süvenemine.

Lisaks skisofreeniale kuuluvad psühhootiliste häirete alla veel skisotüüpne häire, püsivad luululised häired, äge ja mööduv psühhootiline episood, indutseeritud luululine häire ja skisoafektiivne häire.

- Skisotüüpne häire (F21) on seisund, millel ei ole kindlat juhtivat sümptomit, kuid haigust iseloomustavad kummaline käitumine, häiritud mõtlemine ning tundeelu tuimenemine. Skisotüüpne häire diagnoositakse juhul, kui pole eelnevalt diagnoositud skisofreeniat.
- Püsivad luululised häired (F22) diagnoositakse siis, kui patsient ei vasta kõigile skisofreenia diagnoosiks vajalikele kriteeriumitele, kuid esinevad luulud, millest tavalisemad on jälitus-, hüpohondrilised, kadedusega seotud, erootilised ja suurusluulud.
- Ägedat ja mööduvat psühhootilist episoodi (F23) iseloomustab kiire psühhootiliste sümptomite nagu näiteks illusioonide, hallutsinatsioonide või seosetu kõne teke.
- Indutseeritud luululisele häirele (F24) on omane, et ühel inimesel arenevad välja samasugused luulud, nagu eelnevalt olid ilmnenud temaga lähedalt seotud inimesel.
- Skisoafektiivne häire (F25) on seisund, mida iseloomustavad nii skisofreeniale kui meeoluhäiretele omased sümptomid. Meeoluhäiretele omasteks sümptomiteks on näiteks depressioon ja mania.

### **1.5 Skisofreenia levinumad hüpoteesid**

Skisofreenia tekke kohta on mitmeid erinevaid neurokeemilisi hüpoteese. Enamlevinumad neist puudutavad dopamiini, glutamaati ja  $\gamma$ -aminovõihapet (*gamma-aminobutyric acid*, GABA).

Dopamiinihüpotees on olnud üks põhjalikumalt uuritud ideid psühhiaatrias. Algselt arvati, et skisofreenia tekkel omab rolli dopamiini liig (Carlsson, 1977). Seda ideed on järgnevalt kompleksemaks muudetud uute teadmiste ilmsikstuleku tõttu. 1991. aastal avaldasid Davis jt artikli, mida nad kutsusid skisofreenia modifitseeritud dopamiini hüpoteesiks. Selle peamiseks ideeks oli, et skisofreenia tekkel on oluline prefrontaalne hüpodopaminergia ning subkortikaalne hüperdopaminergia. Davis jt spekuleerisid, et skisofreenia negatiivsed sümptomid tulenevad frontaalsest hüpodopaminergiast ning positiivsed sümptomid tulenevad mesolimbiliste dopamiinineuronite hüperdopaminergiast. Dopaminergilist mudelit toetab ka suuresti fakt, et kõik hetkel saadaval olevad antipsühhootikumid töötavad läbi

dopaminergiliste retseptorite blokeerimise ning ühtlasi ka uurimused, mis näitavad psühhoosiliste sümptomite ilmnemist peale amfetamiini korduvat manustamist (Keshavan jt, 2011).

Esimese teabe häirunud glutamaadisüsteemist skisofreenikutel saadi uurimusest, mis näitas, et antud patsientidel esines seljaajuvedelikus vähenenud glutamaadi tase (Kim jt, 1980). Seda uurimust ei suudetud järgnevalt korrata (Perry, 1982). Seejärel on pakutud välja hüpotees, et N-metüül-D-aspartaadi (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA) retseptorite hüpofunktsioon võiks seletada skisofreenia sümptomeid. Mehhanism seisneb kas NMDA retseptorite või allavoolu jäävate efektide häiringus, mis põhjustab NMDA retseptorite blokeerimise (Olney jt, 1999). Seda teooriat toetab NMDA retseptorite inhibeerimine NMDA antagonistide fenüülsükliidiini või ketamiiniga, mis põhjustab skisofreeniale sarnaste psühhooside teket tervetel inimestel ning halvendab sümptome skisofreenikutel (Javitt ja Zukin, 1991; Jentsch ja Roth, 1999, Lahti jt, 2001) ning, et ühendid, mis toimivad NMDA retseptori glütsiini modulaatorsele piirkonnale, leevendavad negatiivseid sümptomeid (Goff jt, 1999). Skisofreenia patsientide surmajärgsed uuringud on näidanud glutamaadi retseptorite, eriti just NMDA retseptori subühiku ekspressiooni vähenemist mitmetes ajupiirkondades nagu prefrontaalne ajukoor ja hipokampus (Harrison jt, 2003). Kuna glutamaat on peamine virgatsaine närvisüsteemis, siis on üsna raske seletada selle süsteemi muutustega skisofreenia suhteliselt lokaliseerunud häireid (Crow, 1995).

Mitmed uurimused annavad alust arvata, et peamise inhibitoorse virgatsaine GABA neuroülekanne on skisofreenia puhul häirunud (Lewis ja Hashimoto, 2007; Benes ja Berretta, 2001). Arvatakse, et skisofreenia kognitiivsete häirete patofüsioloogia üheks võtmelemendiks on häiringud pidurdavates kortikaalsetes võrgustikes (Lewis, 2014). Seda väidet toetavad mitmed skisofreenia patsientidel läbiviidud surmajärgsed uuringud, mis on näidanud ajukooses peamise GABA sünteesi eest vastutava ensüümi, glutamaadi dekarboksülaasi 67 kD isovormi mRNA ja valgu taseme langust (Guidotti jt, 2000). Antud andmed toetavad hüpoteesi, et skisofreeniat iseloomustab vähenenud võimekus sünteesida ajukooses GABA-t ning seega on skisofreenikutel kortikaalse GABA tasemed vähenenud (Lewis, 2014).

## 1.6 Pärilikkus

Valdav arusaam skisofreenia geneetilisest poolest on see, et see on heterogeenne, multifaktoriaalne haigus, millele on omased mitmed geneetilised polümorfismid ning millest igauks soodustab vähesel määral haigestumist (Tandon jt, 2008). Skisofreenia pärilikkuse osakaalu ilmestavad hästi erinevate astmete sugulaste haigestumise tõenäosused. Kui keskmine skisofreeniasse haigestumise risk on alla 1%, siis esimese astme sugulastel on see aga 6,5% (Kendler, 1993). Kahemunakaksikutel, kes jagavad 50% ühist geneetilist materjali ning juhul kui üks kaksikutest on haigestunud skisofreeniasse, siis teise kaksiku risk haigestuda on 10–15%. Ühemunakaksikutel, kellel on 100% sama geneetiline materjal, on ühe kaksiku haigestumisel skisofreeniasse teisel kaksikul haigestumise risk ligikaudu 40–50% (Tandon jt, 2008). Kaksikute uuringute põhjal on hinnatud ka skisofreenia päritavust ning on leitud, et see on ligikaudu 80% (Sullivan jt, 2003).

Peamised geenid, mida seostatakse skisofreeniaga on *NRG1* (Tan jt, 2007), *DTNBPI* (Duan jt, 2007), *COMT* (Lewandowski, 2007), *DISC1* (*disrupted-in-schizophrenia-1*) (Chubb jt, 2008), *DRD1-4* (Talkowski jt, 2008) ja *GRM3* (Mounce jt, 2014). *NRG1* kodeerib neureguliini, mis on signaalvalk, mis vahendab rakk-rakk interaktsioone ning osaleb närvisüsteemi, südame ja teiste organsüsteemide kasvus (Tan jt, 2007). *DTNBPI* kodeerib düsbindiini, mis kuulub BLOC-1 (*biogenesis of lysosome-related organelles complex 1*) valgukompleksi ning mis võib olla seotud vesikulaarse liikluse reguleerimisega ning dendriitide harunemisega (Prasad jt, 2010). *COMT* kodeerib ensüümi katehhool-O-metüültransferaasi, mis katalüüsib metüülrühma ülekannet S-adenosüülmationiini katehhoolamiinidele ning on seotud dopamiini lagundamisega (NCBI). *DISC1* geen on häirunud translokatsiooniga t(1;11)q42.1;q14.3 (NCBI) ning antud translokatsioon on näidanud erilist seost psühhiaatriliste haigustega (Chubb jt, 2008). Geenid *DRD1-4* kodeerivad dopamiini retseptoreid D1-D4 (NCBI) ning geen *GRM3* kodeerib metabotroopset glutamaadi retseptorit (NCBI).

## 1.7 Skisofreenia ja infektsioonide seosed

Skisofreenia etioloogiaga on seostatud mitmesuguseid keskkonnast tingitud faktoreid. Sinna kuuluvad näiteks D-vitamiini puudus (McGrath, 1999), sünd linnas (Marcelis jt, 1999) ja kõrgem isa vanus (Malaspina jt, 2001). Silmatorkavaid seoseid on saadud ka sünni aastaaja ja skisofreeniasse haigestumise vahel. Põhjapoolkeral läbiviidud uuringutes on näidatud, et talvekuudel sündinutel on umbes 3–15% suurem risk haigestuda skisofreeniasse. (Boyd jt,

1986; Davies jt, 2003; Gallagher jt, 2007; Pallast jt, 1994). Lõunapoolkeral läbiviidud uuringud ei ole selliseid tulemusi saanud (Morgan jt, 2001). Samas on leitud teistsuguseid seoseid, näiteks Kirde-Brasiilias on leitud seos vihmaperioodil sünni ja skisofreenia vahel (de Messias jt, 2001). Arvatakse, et need seosed on tingitud ema infektsioonidest raseduse ajal.

Varajased seroloogilised uurimused näitasid, et ema haigestumine punetistesse tõstab lastel mitteafektiivse psühhoosi (Brown jt, 2000) ja skisofreenia spektri häiretesse (Brown jt, 2001) haigestumise riski. 2004. aastal näitasid Brown jt, et gripiviirusega nakatumine esimesel trimestril tõstis järgmisel põlvkonnal seitse korda skisofreeniasse haigestumise riski. On leitud ka, et mitmesugused bakteriaalsed infektsioonid esimesel trimestril suurendavad järglastel skisofreeniasse haigestumist 2,53 korda (Sorensen jt, 2009). Brown jt (2005) toovad välja ka, et skisofreenia üheks riskifaktoriks võib olla rakusisese parasiidi, toksoplasmoosi põhjustaja *Toxoplasma gondii* infektsioon.

Seega on ema infektsioonid raseduse ajal seotud skisofreeniaga. Kuna enamik viirusi ei ületa platsentabarjääri, siis loote kahjustused võiksid tuleneda emapoolsest viirusvastasest immuunvastusest (Patterson, 2009). Näiteks üks tuntumaid skisofreeniale omaseid neuroanatomilisi hälbeid on ajuvatsakeste suurenemine (Wright jt, 2000). Väidet, et loote kahjustused tulenevad emapoolsest immuunvastusest toetab Ellman jt (2010) poolt läbi viidud uurimus, milles mõõdeti 17 skisofreeniku emade seerumit ning leiti, et suurenenud interleukiin (*interleukin*, IL)-8 tase on seotud ajuvatsakeste suurenemisega.

Tähelepanuväärne on ka Kanduc`i (2010) poolt läbi viidud uurimus, milles ta uuris inimese valkude ja gripiviiruse A H5N1 polüproteiini järjestuse homoloogiat heksameersete aminohappejärjestuste tasemel ning leidis, et mitmed valgud, mis osalevad ajus rakkude jagunemises, arengus ja diferentseerumises, omavad järjestuse homoloogiat H5N1 valkudega. Uurimistulemused näitasid, et skisofreeniaga seotud geenide produktid nagu neureksiin-1  $\alpha$  ja neureksiin-1  $\beta$  (Voineskos jt, 2011), reelin (Fatemi jt, 2000; Eastwood, Harrsion, 2006) ja DISC1 (Chubb jt, 2008) valgud sisaldavad järjestuse homoloogiat H5N1 polüproteiiniga. Kõrge järjestuse homoloogia inimese valkude ja viiruse valkude vahel võib aga esile kutsuda autoimmuunvastuse (Kneeland ja Fatemi, 2013).

### **1.8 Geen *IKBKE***

*IKBKE* geen on 26 647 bp pikk ja selles paikneb 22 eksonit (ENSEMBL) ning see asub esimeses kromosoomis (1q32.1). Selle geeni täielik nimi on *inhibitor of kappa light*

*polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon*. See kodeerib mittekanoonilist IκB (*inhibitor of kappa B*) kinaasi nimega IKK (*IκB kinase*) ε, mis on vajalik viirusvastaste signaaliradade regulatsioonis (NCBI).

### 1.8.1 IKKε ja PRR-id

Kaasasündinud immuunsüsteem on evolutsiooniliselt konserveerunud ning on esmaseks kaitseks patogeenide vastu (Akira jt, 2006). Imetajate puhul kaasasündinud immuunsüsteem aktiveerub, kui PRR-id (*pattern recognition receptors*) tunnevad ära erinevaid patogeeniga seotud molekulaarseid mustreid (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). PRR-ide hulka kuuluvad neli erinevat klassi retseptoreid: CLR-id (*C-type lectin receptors*), NLR-d (*nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors*), TLR-id (*Toll-like receptors*) ja RLR-id (*retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) like receptors*) (Eisenächer ja Kurg, 2012). IKKε kuulub TLR-ide ja RLR-ide vahendatud signaaliradadesse (Kumar jt, 2011).

Algselt oli *Drosophila* Toll retseptor tuntud kui retseptor, mis on vajalik arengus dorso-ventraalse polaarsuse määramiseks. 1996. aastal aga näidati, et see retseptor osaleb ka kaasasündinud immuunvastuses seeninfektsioonide vastu (Lemaitre jt, 1996). Järgnevalt leiti imetajatelt mitmeid antud retseptori homolooge, mis said nimeks *Toll like receptor* (TLR) ning mis tundsid ära erinevaid PAMP-e ning aktiveerisid kaasasündinud immuunsüsteemi, indutseerides näiteks põletikuliste tsütokiinide sünteesi (Akira jt, 2006).

TLR-id on ühekordselt membraani läbivad transmembraansed valgud, mis koosnevad N-terminaalsetest rakuvälistest leutsiinirikastest järjetustest (*leucine-rich repeats*, LRR) ja C-terminaalsest tsütoplasmaatilise domeeni, mis sarnaneb IL-1 retseptorile ning mis on tuntud kui Toll/IL-1 retseptor (*Toll/interleukin-1 receptor*, TIR) domeen. LRR-id vastutavad kindlate patogeeni komponentide äratundmise eest ning TIR domeen allavoolu signaaliülekanne eest. (Kawai ja Akira, 2007). TLR-i perekond koosneb vähemalt 13 liikmest (Kawai ja Akira, 2008), millest igauks tunneb ära kindlat PAMP-i viirustest, bakteritest, algloomadest või seentest (Akira jt, 2006). TLR-e ekspresseerivad mitmed erinevad immuunrakud, nagu makrofaagid, dendriitrakud, B-rakud ja neutrofiilid ning mitte-immuunrakud, nagu fibroplastid, epiteelrakud ja keratinotsüüdid. Peale PAMP-ide äratundmist aktiveerivad TLR-id samu signaalkomponente nagu IL-1 retseptor. TLR-id värbavad adaptorvalke TIR-domeeni abil. Need interaktsioonid viivad signaalikaskaadideni, mis on vajalikud transkriptsioonifaktori NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aktivatsiooniks. NF-κB kontrollib eelpõletikuliste tsütokiinide ja

kemokiinide indutseerimist ning on vajalik ka dendriitrakkudel kostimuleerivate molekulide arvu suurendamiseks. Viimane on oluline T-raku aktivatsioonis (Kawai ja Akira, 2007).

IKK $\epsilon$  kuulub TLR3 ja TLR4 vahendatud signaaliradadesse (Takeda ja Akira, 2004). TLR3 ekspresseeritakse ainult rakusisestes vesiikulites (Kawai ja Akira, 2010) ning see tunneb ära ssRNA viirusi, dsRNA viirusi, sünteetilist dsRNA analoogi poly(I:C) (*polyinosinic:polycytidylic acid*)-d (Alexopoulou jt, 2001), respiratoorset süntsütiaalset viirust ja hiire tsütomegaloviirust. TLR4 on ekspresseeritud peamiselt raku pinnal (Kawai ja Akira, 2010) ning tunneb ära lipopolüsahhariide (*lipopolysaccharide*, LPS), mannaani, glükoinositoolfosfolipiide, imetaja kasvaja viiruse membraani valke, respiratoorse süntsütiaalse viiruse fusioonvalke, *Streptococcus pneumoniae* pneumolüsiini ning lisaks endogeenseid oksüdeeritud fosfolipiide, mis on toodetud pärast linnugripi H5N1 infektsiooni (Kumar jt, 2011).

RLR-id on tsütosoolis paiknevad PRR-id, mis tunnevad ära viraalset RNA-d. RLR-i perekonda kuuluvad kolm liiget: RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1 protein*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) ja LPG2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). Kaks esimest, mille signaliseerimine toimub läbi mitokondriaalse viirusvastase signaliseerimise adaptori MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*), aktiveerivad RNA viiruste infektsiooni korral IKK $\epsilon$  ja TBK1 (*TANK-binding kinase 1*). Mõlema retseptori aktivatsiooni poolt tingitud signaalirada viib NF- $\kappa$ B, IRF (*interferon regulatory factor*)-3 ja IRF-7 sõltuvale geeniekspressioonile. RIG-I retseptori ligandideks on näiteks lühike kaheaahelaline RNA, mille 5`otsas on mono- või trifosfaat ja gripiviirus A. MDA5-e ligandiks on näiteks pikaahelaline poly(I:C) (Kumar jt, 2011).

### **1.8.2 IKK $\epsilon$ : avastamine ja interaktsioonid**

NF- $\kappa$ B transkriptsioonifaktorid moodustavad homo- ja heterodimeere (Gilmore, 2006) ning on põletikulistes ja immuunomodulatoorsetes vastustes osalevate geenide ning rakujagunemises ja raku ellujäämises kaasatud geenide peamised regulaatorid (Ghosh jt, 1998). Imetajate puhul on kindlaks tehtud viis antud perekonna liiget: p50/p105, p52/p100, p65 (RelA), cRel ja Rel B. Kõigile neile on omane Rel homologiline domeen N-terminuses, kuhu kuuluvad tuuma lokaliseerimise signaal, dimeriseerumise domeen ja DNA-d seondav domeen, mis võimaldab seondumist kindlale DNA regioonile, mis on tuntud kui  $\kappa$ B sait (Harris jt, 2006; Kawai ja Akira, 2007). C-terminuses on RelA-le, Rel B-le ja cRel-ile omane

transkriptsiooni aktivatsiooni domeen, p50-1 ja p52-1 on C-terminuses ankürin kordused (Kawai ja Akira, 2007).

Stimuleerimata rakkudes on tsütoplasmaatilised NF- $\kappa$ B subühikud seondunud inhibeerivate I $\kappa$ B molekulidega. I $\kappa$ B perekond koosneb seitsmest liikmest: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  ja I $\kappa$ BNS. Neli esimest maskeerivad NF- $\kappa$ B tuumalokalisatsioonisignaali tsütoplasmas, et takistada NF- $\kappa$ B translokatsiooni tuuma. Viimased kolm on olemas tuumas ning reguleerivad transkriptsiooni interaktsioonide kaudu NF- $\kappa$ B-ga (Kawai ja Akira, 2007). Pärast stimuleerimist eelpõletikuliste tsütokiinidega nagu IL-1 $\beta$  või TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$  toimub I $\kappa$ B fosforüleerimine multimeerse I $\kappa$ B kinaaside kompleksi poolt. See reaktsioon viib I $\kappa$ B polüubikvitineerimisele ning proteasoomsele lagundamisele. Vabanenud NF- $\kappa$ B dimeerid translokeeruvad tuuma ning toimub NF- $\kappa$ B sihtmärkgeenide transkriptsioon. IKK kompleks koosneb katalüütilistest kinaasi subühikutest IKK $\alpha$ -st ja IKK $\beta$ -st ning regulaatorsest subühikust NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*). Seda rada nimetatakse kanooniliseks rajaks (Harris jt, 2006).

Järjestuste sarnasuste põhjal IKK $\alpha$  ja IKK $\beta$  on leitud kaks kinaasi: TBK1 ja IKK $\epsilon$ , mis on tuntud kui mittekanoonilised IKK-d (Peters jt, 2000; Tojima jt, 2000). IKK $\epsilon$  ja TBK1 omavad nii nagu kanoonilised IKK-d kinaasi, heeliks-ling-heeliksi, leutsiini luku ja ubikvitiinisarnast domeeni, kuid neil on puudub NEMO-t seondav domeen, mistõttu ei saa need valgud interakteeruda NEMO-ga. Võrreldes teistega on IKK $\epsilon$  ekspressioon aga oluliselt piiratum. Kui IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ja TBK1 on pidevalt ekspresseeritud enamikus rakutüüpides, siis IKK $\epsilon$  basaalne ekspressioon on tuvastatav ainult kindlates kudedes (pankreas, tüümus ja põrn) ning T-rakkudes ja perifeersetes vere leukotsüütides (Verhelst jt, 2013). Teistes rakutüüpides, nagu näiteks fibroplastides suureneb IKK $\epsilon$  ekspressioonitase kiirelt vastusena tsütokiinidele (nt TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN (*interferon*)- $\gamma$ ), mikroobsetele produktidele (nt LPS ja viraalne RNA) ning on seetõttu tuntud ka kui indutseeritav IKK ehk IKK-i (Clement jt, 2008; Shimada jt, 1999).

IKK $\epsilon$ /TBK1 käsitlemine I $\kappa$ B $\alpha$  kinaasina põhineb suuresti uurimisel, et IKK $\epsilon$  või TBK1 üleekspressioon rakukultuuris viib I $\kappa$ B $\alpha$  fosforüleerimisele (Shimada jt, 1999). Aga kuna katsed hiirte embrüonaalsete fibroplastidega, millel on IKK $\epsilon$ /TBK1 puudu, ei ole näidanud I $\kappa$ B $\alpha$  degradatsiooni kahjustumist, kuid NF- $\kappa$ B sõltuv geeniekspressioon on siiski häirunud (Bonnard jt, 2000, Kravchenko jt, 2003), siis arvatakse, et IKK $\epsilon$  mõjutab NF- $\kappa$ B signaliseerimist ja sellega kaasnevat geeniekspressiooni I $\kappa$ B $\alpha$  allavoolu (Clement jt, 2008).

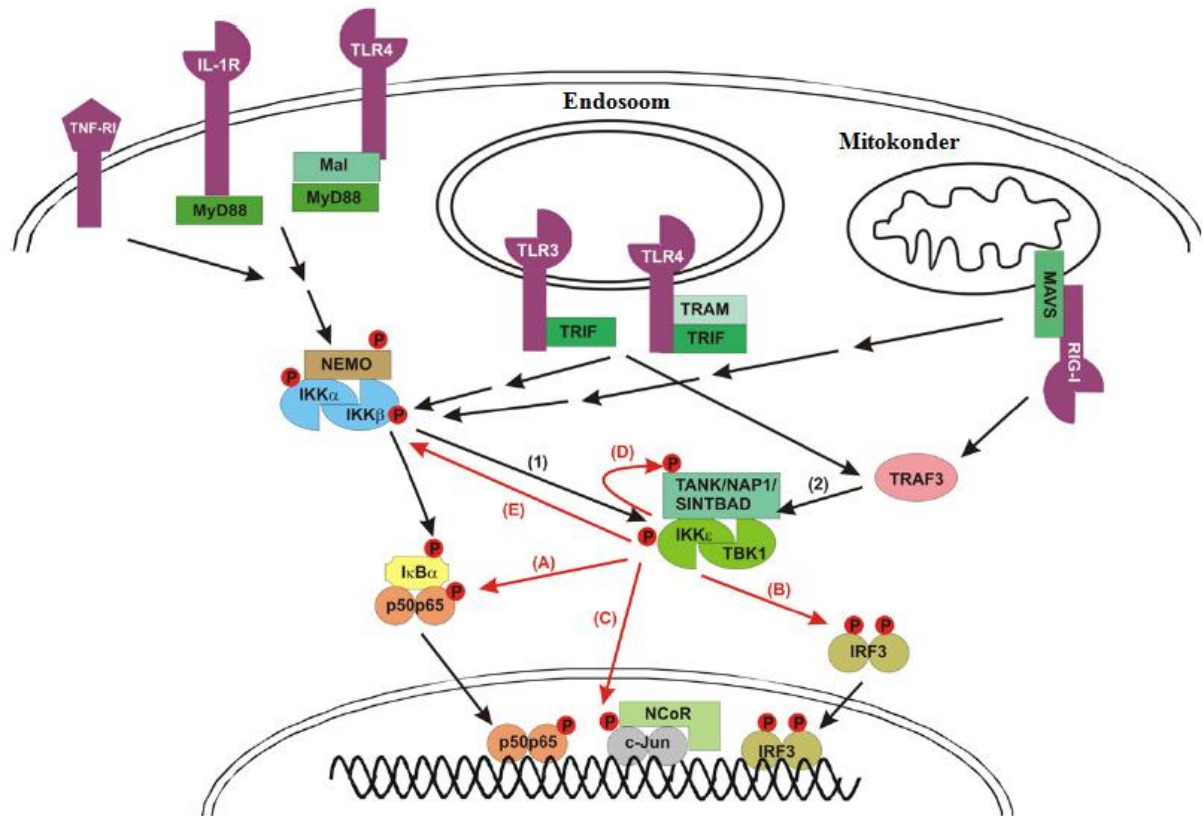
Seda toetab ka leid, et IKK $\epsilon$  vahendatud p65 NF- $\kappa$ B subühiku fosforüleerimine on oluline NF- $\kappa$ B sihtmärkgeenide ekspressioonis vastusena eelpõletikulistele signaalidele ja viirusinfektisoonile (Moreno jt, 2010; Bao jt, 2010). On ka näidatud, et fosforüleeritud p65 võimaldab viia IKK $\epsilon$   $\kappa$ B-d sisaldavate põletikus osalevate geenide promootorite juurde ning võimaldab IKK $\epsilon$ -l fosforüleerida c-Jun-i ning indutseerida NcoR (*nuclear receptor corepressor*)-i vabanemist (Huang jt, 2009). Lisaks aktiveerib IKK $\epsilon$  NF- $\kappa$ B raja läbi cRel-i C-terminaalse transaktivatsiooni domeeni fosforüleerimise, mis viib cRel-I $\kappa$ B $\alpha$  kompleksi lagunemisele tsütoplasmas ning cRel-i kuhjumisele tuumas (Harris jt, 2006).

IKK $\epsilon$  ja TBK1 aktiivsust valgutasandil reguleeritakse kindla saidi fosforüleerimise abil (Kishore jt, 2002). Clark jt (2011) näitasid, et kanoonilised IKK-d fosforüleerivad ning seeläbi aktiveerivad IKK $\epsilon$  ja TBK1 ning IKK $\epsilon$ /TBK1 omakorda fosforüleerivad kanooniliste IKK-de katalüütilisi subühikuid ja nende regulaatorset subühikut NEMO-t, millega kaasneb viimaste aktiivsuse vähenemine.

TBK1 ja IKK $\epsilon$  on peamised komponendid IFN-vahendatud viirusevastases vastuses. TBK1 ja IKK $\epsilon$  fosforüleerivad IRF-3 ja IRF-7 C-terminaalses regulaatoorses domeenis kindlad seriini jäägid, mis viib nende faktorite dimeriseerumisele, translokatsioonile tuuma, DNA seondumisele ning tüüp I interferooni geenide aktivatsioonile (Sharma jt, 2003, Clement jt, 2008).

Täpsema ülevaate IKK $\epsilon$  signaaliradadest NF- $\kappa$ B p50-p65 näitel annab joonis 1.





**Joonis 1.** IKK $\epsilon$  vahendatud signaliseerimine.

Mittekanoonilisi IKK-sid (IKK $\epsilon$  ja TBK1) saab aktiveerida läbi kahe signaaliraja:

1. IKK $\alpha$ / $\beta$  vahendatud aktivatsioon.

Ligandi seondumine retseptoritele (TNF-R1 (*TNF receptor-1*), IL-1R (*IL-1 receptor*), TLR4, RIG-I) tingib spetsiifiliste adaptorvalkude (Mal (*MyD88 adaptor-like protein*), MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$* ), MAVS), E3 ubikvitiin ligaaside ja kinaaside (mitte näidatud) värbamise retseptori juurde, mis viib kanooniliste IKK-de (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ /NEMO) kompleksi aktivatsioonini. Sellele järgneb IKK $\beta$  vahendatud fosforüleerimine ning I $\kappa$ B $\alpha$  Lys48 seotud ubikvitineerimine, mis tagab selle valgu proteasoomse lagundamise ja p50-p65 NF- $\kappa$ B heterodimeeri vabanemise ning translokatsiooni tuuma. Lisaks võivad kanoonilised IKK-d fosforüleerida IKK $\epsilon$ /TBK1, mis viib viimaste aktivatsioonini.

2. IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  sõltumatu ja TRAF3 sõltuv IKK $\epsilon$ /TBK1 autoaktivatsioon.

TRIF sõltuv TLR3 ja TLR4 signaliseerimine ja MAVS-sõltuv RIG-I signaliseerimine indutseerivad IKK $\epsilon$ /TBK1 autoaktivatsiooni läbi TRAF3-e. See eeldab IKK $\epsilon$ /TBK1 seondumist erinevatele tugivalkudele (TANK (*TNF receptor-associated factor (TRAF) family member-associated NF- $\kappa$ B activator*), NAP1 (*NF- $\kappa$ B activating kinase-associated protein 1*), SINTBAD (*similar to NAP1 TBK1 adaptor*). Seejärel vahendavad IKK $\epsilon$ /TBK1 erinevaid reaktsioone:

A: IKK $\epsilon$ /TBK1 fosforüleerivad NF- $\kappa$ B (p65), aidates kaasa NF- $\kappa$ B sõltuvale geeniekspressioonile.

B: IKK $\epsilon$ /TBK1 fosforüleerivad IRF3 (ja IRF7; pole näidatud), mis viib nende homodimeriseerumisele ja translokatsioonile tuuma.

C: IKK $\epsilon$ /TBK1 fosforüleerivad c-Jun-i, mis viib tuuma repressor kompleksi (*nuclear repressor complex*, NCoR) vabanemisele.

D: IKK $\epsilon$ /TBK1 fosforüleerivad oma tugivalke (TANK, NAP1, SINTBAD), selle funktsioon pole veel teada.

E: IKK $\epsilon$ /TBK1 fosforüleerivad kanoonilisi IKK-sid, mis viib viimaste inaktivatsioonile.

(Verhelst jt, 2013; modifitseeritud)

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärk

Antud uurimustöö eesmärgiks on uurida *IKBKE* geeni polümorfismide rs1539243, rs2274902, rs1930437 ja rs1953090 võimalikku seost skisofreeniaga. Varasemalt on leitud eelmainitud polümorfismide seos depressiooni ja paanikahäirega (Koido jt, 2010; Traks jt, käsikiri väljasaatmisel).

### 2.2 Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1 Katseisikud

Uurimuses osales 127 skisofreenia patsienti ja 170 tervet kontrollisikut. Patsientide grupis olid nii ambulatoorsed kui haiglaravil viibivad isikud Tartu Ülikooli Kliinikumi psühhiaatrikliinikumist. Patsientide diagnoos määrati psühhiaatri poolt läbi viidud intervjuu ja saadaval oleva haigusloo alusel. Ülevaate patsientidel diagnoositud skisofreenia alatüüpidest annab tabel 1. Terved kontrollgrupi isikud värvati Tartust ajalehekuulutuse abil. Nendel hinnati psüühikahäirete puudumist *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI 5.0.0) (Sheehan et al., 1998) intervjuu ja vestluse alusel psühhiaatriga. Välistati isikud, kellel vestluse käigus perekonna ajalugu uurides selgus psüühikahäirete esinemist temal endal ja esimese astme sugulaste hulgas. Patsientide grupi ja kontrollgrupi vahel ei esinenud märkimisväärseid erinevusi ei vanuse ega soo osas, sellest annab ülevaate tabel 2. Kõik katses osalenud on europiidse rassi esindajad ning elavad Eestis. Samuti on nad kinnitanud oma nõusolekut uurimuses osaleda kirjalikult ning Tartu Ülikooli inimuuringu eetika komitee on antud uurimustöö heaks kiitnud.

**Tabel 1.** Patsientidel diagnoositud skisofreenia alatüübid.

Alatüüp	Arv	Osakaal (%)
Paranoidne	88	69,29
Hebefreenne	10	7,87
Katatoonne	9	7,09
Diferentseerumata	1	0,79
Residuaalne	2	1,57
Lihtne	6	4,72
Skisoafektiivne	10	7,87
Skisotüüpne häire	1	0,79

**Tabel 2.** Katseisikute sooline ja vanuseline koosseis.

Tunnus	Kontroll	Patsient
Arv	170	127
Sugu (M/N)	74/96	59/68
Vanus (a.), $\bar{x} \pm \sigma$	50,0 $\pm$ 8,5	51,5 $\pm$ 11,6
Vanuse vahemik	24-71	23-74

$\bar{x}$  - keskmine

$\sigma$  - standardhälve

### 2.2.2 DNA eraldamine ja genotüpeerimine

Genoomne DNA oli eelnevalt eraldatud 9 ml venoossest verest kasutades standardset soolapuhvritega eraldamismeetodit. Varasemalt oli kontrollgrupi isikute DNA-del uuritavad SNP-d genotüpeeritud kasutades SNPlex<sup>TM</sup> genotüpeerimismeetodit (De la Vega, Lazaruk, Rhodes, & Wenz, 2005). See süsteem põhineb oligonukleotiidide ligeerimisel/PCR-i analüüsil, millele järgnevalt hübridiseeritakse universaalsed ZipChute<sup>TM</sup> fluorestsentsmärgised produktiga seotud komplementaarsete ZipCode<sup>TM</sup> järjestustega. Peale seda elueeritakse ZipChute<sup>TM</sup> fluorestsentsmärgised ning lahutatakse elektroforeetiliselt Applied Biosystems 3730 DNA analüsaatoriga. Genotüübid määrati kasutades tarkvara GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

Skisofreenia patsientide DNA-del kasutati nelja SNP alleelse variatsiooni kindlaks tegemisel T-ARMS-PCR-i (Ye et al., 2001). See meetod kasutab kahte praimerite paari, et ühe PCR-i reaktsiooni käigus paljundada üles SNP kahte erinevat alleeli. Alleelspetsiifilised amplikonid saadakse kasutades nii üht vastavat sisemist alleelspetsiifilist praimerit kui ka ühte mittealleelspetsiifilist välimist praimerit. Välimised praimerid on vajalikud ka kontrollprodukti sünteesiks. Neli praimerikomplekti, mis on spetsiifilised igale SNP-le, disainiti veebileheküljel: [http://cedar.genetics.soton.ac.uk/\\_public\\_html/primer1.html](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/_public_html/primer1.html) saadaval oleva programmiga. Tabelis 3 on toodud katses kasutatud PCR praimerid.

**Tabel 3.** T-ARMS-PCR-i reaktsioonides kasutatud praimerid.

Polümorfism	Praimeri järjestus (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Amplikoni pikkus
rs2274902 A/G			
	<i>Forward inner primer</i> (G-alleel): CCCACTGAGCCCTCAGCCCACAGACG	77	185 bp G-alleel
	<i>Reverse inner primer</i> (A-alleel): CCAGGACAGGCAGCAGGTGGAACAGGTTCT	77	154 bp A-alleel

<i>Forward outer primer:</i> TCCATGTGGCCATTCCACAAGCAAGGGA	77	283 bp kontroll
<i>Reverse outer primer:</i> CCTGGGACAATCTCAAGCCTGGATGCCA	77	
rs1930437 G/T		
<i>Forward inner primer (G-alleel):</i> AAGGCTACCCTAAGAAGGGCTCCATGCGG	75	217 bp G-alleel
<i>Reverse inner primer (T-alleel):</i> CCCCCGCTCCCTTGCTTGTGGAATAGA	75	280 bp T-alleel
<i>Forward outer primer:</i> GCCTGGCCAGGGTTGCTTCCTACCTTGT	75	441 bp kontroll
<i>Reverse outer primer:</i> GAATGACCTGCCTCAGGAGGGGCTTCAA	75	
rs1539243 C/T		
<i>Forward inner primer (C-alleel):</i> CCTGCGGAAGCTGAACCACCAGAACCTC	76	204 bp C-alleel
<i>Reverse inner primer (T-alleel):</i> GTCTCCTCCACCGCAAAGAGCTTGCCA	76	290 bp T-alleel
<i>Forward outer primer:</i> ATGGGAGCCCCCATCCAACCAGGCTAAT	76	439 bp kontroll
<i>Reverse outer primer:</i> TGCCCCCTTTGCTCCCTTCTGCAATTTG	76	
rs1953090 A/C		
<i>Forward inner primer (C-alleel):</i> GGCACCTTCTCCTCCCCACCCACCAGAAC	76	238 bp C-alleel
<i>Reverse inner primer (A-alleel):</i> CTCTGGGCTCCAGGCTGAGCCACTCCT	76	289 bp A-alleel
<i>Forward outer primer:</i> TGAGTCCTGTGTCAGCATCTGTCCCAGGCC	76	472 bp kontroll
<i>Reverse outer primer:</i> ATTGCAGAAGGGAGCAAAGGGGGCAAGG	76	

---

Iga PCR-i reaktsioon viidi läbi mahus 20 µl, sisaldades ligikaudu 50 ng genoomset DNA-d, 20 pmol mõlemat sisemist praimerit, 2 pmol kumbagi välimist praimerit, 0,2 mM dNTP-d, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x reaktsioonipuhvrit (10x stock: 750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween-20; Naxo, Tartu, Eesti) ja 0.025 U/µl Smart-Taq DNA polümeraasi (Naxo, Tartu, Eesti).

DNA-fragmentide amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi:

Algne denaturatsioon	95,0°C	5 min	
Denaturatsioon	95,0°C	1 min	} 9 tsüklit
Praimerite seondumine	78,0°C	1 min	
Ekstensioon	72,0°C	1 min	

Denaturatsioon	95,0°C	1 min	} 24 tsükli
Praimerite seondumine	68,0°C	1 min	
Ekstensioon	72,0°C	1 min	
Lõppekstensioon	72,0°C	5 min	

PCR-i produktid lahutati geelelektroforeesil 2% agarosgeelis 0,5X TBE puhvril 40 minuti jooksul pingel 150 V. DNA visualiseerimiseks kasutati etiidumbromiidi (Naxo, Tartu, Eesti). Pikkusmarkeriteks olid pUC Mix Marker 8 (Fermentas) ja pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker 5 (Fermentas).

### 2.2.3 Statistiline analüüs

Alleelne assotsiatsioonitest (patsientid vs kontrollgrupp), ahelduse tasakaalustamatuse (*linkage disequilibrium*) testimine, Hardy-Weinbergi tasakaalu testimine kontrollgrupis, *Cochran-Armitage trend test*, *Fisher's exact test* ning mitmene testimine teostati kasutades tarkvara Haploview version 4.2 (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005) ning gPLINK /PLINK 1.07-t (Purcell jt, 2007). Kõigi statistiliste testide olulisusnivooks oli valitud  $p_{väärtus} < 0,05$ .

### 2.3 Tulemused ja arutelu

Eksperimentaalse töö käigus genotüpeeriti 127 skisofreeniahaige *IKBKE* geeni 4 SNP-d. Kontrollgrupp oli kõikide SNP-de puhul Hardy-Weinbergi tasakaalus. Parimat seost näidanud SNP-l oli kontrollgrupp Hardy-Weinbergi tasakaalus ( $p_{väärtus}=0,17$ ) ja patsientidel ei olnud tasakaalus. Alleelsete seoste analüüsi tulemused on toodud tabelis 4 ning ahelduse tasakaalustamatust erinevate SNP-de vahel iseloomustab joonis 2. Töö tulemusena leiti üks statistiliselt oluline seos *IKBKE* geeni SNP-ga (rs1930437), mille p-väärtuse olulisus säilis ka peale mitmest testimist Bonferroni meetodil ( $p_{väärtus}=0,0248$ ). Täiendavalt viidi läbi ka *Fisher's exact test*, mille puhul antud SNP oli statistiliselt oluline ( $p_{väärtus}=0,0076$ ) ning selle olulisus säilis ka peale mitmese testimise korrektsiooni Bonferroni meetodil ( $p_{väärtus}=0,0303$ ). Lisaks viidi läbi *Cochran-Armitage trend test*, mille tulemused on toodud tabelis 5 ning mille puhul antud SNP statistiline olulisus säilis ( $p_{väärtus}=0,0019$ ). Katse tulemuste analüüs viitab antud SNP T-alleeli protektiivsele efektile (OR=0,631; 95% CI: 0,454....0,878).

**Tabel 4.** Alleelsete seoste analüüsi tulemused kasutades gPLINK/PLINK 1.07-t (hii-ruut assotsiatsioonitest).

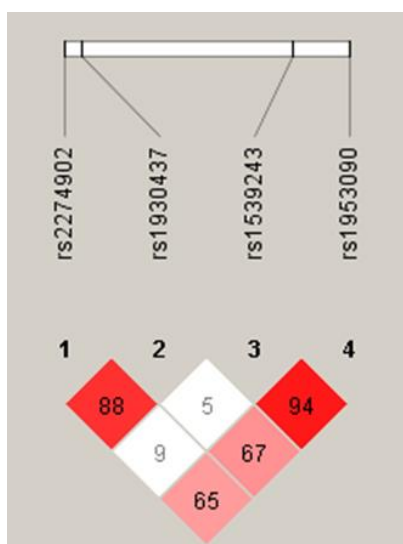
SNP	Asukoht	Major/ minor alleel	Minor alleeli sagedused		$\chi^2$ -testi väärtus	p- väärtus	Šansside suhe 95% usaldus- (OR) intervall (CI)		Permuteeritud p- väärtus
			P	K					
rs2274902	Intron 2	G/A	0,465	0,485	0,245	0,621	0,921	0,664....1,276	1
rs1930437	Intron 2	G/T	0,390	0,503	7,495	<b>0,0062</b>	0,631	0,454....0,878	<b>0.0248</b>
rs1539243	Ekson 4	C/T	0,197	0,166	0,959	0,328	1,234	0,810....1,882	1
rs1953090	Intron 4	A/C	0,295	0,278	0,200	0,655	1,086	0,757....1,557	1

P-patsiendid

K-kontrollid

**Tabel 5.** Cochran-Armitage trend test-i tulemused, saadud kasutades gPLINK/PLINK 1.07-t.

SNP	Major/ minor alleel	Alleelide suhted		$\chi^2$ -testi väärtus	Vabadus- astmete	
		Patsiendid	Katsealused		arv	p-väärtus
rs2274902	G/A	118/136	163/173	0.252	1	0.616
rs1930437	G/T	99/155	170/168	9.604	1	<b>0.0019</b>
rs1539243	G/T	50/204	56/282	1.017	1	0.313
rs1953090	A/C	75/179	93/241	0.204	1	0.652



**Joonis 2.** Ahelduse tasakaalustamatus eri SNP-de vahel. Antud joonis on saadud kasutades Haploview 4.2 tarkvara.

Antud eksperimentaalses töös käsitletud *IKBKE* SNP-dest on eelnevalt leitud seos SNP rs1953090 ja paanikahäire vahel, SNP-del rs2274902 ja rs1930437 on esinenud statistiliselt oluline seos depressiooniga ning SNP rs1539243 on näidanud seost nii paanikahäire kui ka depressiooniga. Täpsemalt, katsete tulemused viitavad, et SNP rs1539243 T-alleel on seotud suurema haigestumise tõenäosusega paanikahäiresse ja depressiooni, SNP rs2274902 A-alleel on protektiivne depressiooni suhtes ja SNP rs1953090 C-alleel on protektiivne paanikahäire suhtes ning SNP rs1930437 G-alleel on seotud suurema tõenäosusega haigestuda depressiooni (Koido jt, 2010; Traks jt, käsikiri väljasaatmisel). Arvestades andmeanalüüsi tulemusi, siis käesolev uurimus viitab, et SNP rs1930473 T-alleel omab protektiivset efekti skisofreeniasse haigestumise suhtes ning arvestades ka eelnevat tulemust on võimalik, et antud SNP G-alleel on üheks riskifaktoriks skisofreeniasse ja depressiooni haigestumisel.

Traks jt leidsid kasutades veebipõhist rakendust ConSite (Sandelin jt, 2004), et intronis paiknev SNP rs1930437 asub oletatavas c-Rel-i seondumissaidis. c-Rel on NF- $\kappa$ B perekonda kuuluv valk, mis sisaldab transkriptsiooni aktivatsiooni domeeni (Kawai ja Akira, 2007). Nimelt leidsid nad, et G-nukleotiidi vahetus T-nukleotiidi vastu antud seondumissaidis põhjustab häirumise seondumissaidi järjestuses ning võib viia NF- $\kappa$ B enhaanseri funktsiooni vähenemisele. Nad pakkusid välja, et G-alleel võib olla seotud suurema *IKBKE* transkriptsiooniga, mis mõjutab põletikuprotsesse ning see võib omakorda kajastuda psühhiaatriliste haiguste tekkel. Antud kontekstis on oluline välja tuua, et NF- $\kappa$ B indutseerib eelpõletikuliste geenide transkriptsiooni (Tak ja Firestein, 2001) ning skisofreenikutel on täheldatud suurenenud eelpõletikuliste tsütokiinide nagu näiteks IL-1 $\beta$  (Soderlund jt, 2009) ja IL-6 (Garver jt, 2003) suurenenud taset seljaajuvedelikus ning IL-1 $\beta$  (Liu jt, 2010) ja TNF- $\alpha$  (Liu jt, 2010, O'Brien jt, 2008) suurenenud taset seerumis. Lisaks on huvitav ka asjaolu, et IKK $\epsilon$  aktiveerib NF- $\kappa$ B raja läbi cRel-i C-terminaalse transaktivatsiooni domeeni fosforüleerimise, mis viib cRel-I $\kappa$ B $\alpha$  kompleksi lagunemisele tsütoplasmas ning cRel-i kuhjumisele tuumas (Harris jt, 2006). See mehhanism võib aidata kaasa suuremale IKK $\epsilon$  ekspressioonile. Samas tuleb arvestada, et antud veebipõhine rakendus ConSite näitab suurel hulgal nii c-Rel-i kui NF- $\kappa$ B seondumiskohti *IKBKE* geenis.

Teadaolevalt ei ole avaldatud artikleid, mis käsitleksid *IKBKE* geeni polümorfismide ja skisofreenia või skisofreeniale lähedaste haiguste nagu autism (Meyer jt, 2011) ja bipolaarne häire (Purcell jt, 2009) vahelist seost. Avaldatud on aga artikkel, milles on näidatud seos kromosoomi regiooni 1q32 ja skisofreenia vahel Korea populatsioonis (Jang jt, 2007). Ka on näidatud seos antud kromosoomi regiooni ja bipolaarse häire vahel (Detera-Wadleigh jt,



1999). Lisaks on näidatud seost skisofreeniale omaste või lähedaste tunnuste ja signaaliülekanne radade komponentide vahel, milles osaleb ka antud geeni produkt. Näiteks on leitud, et IKK aktiivsuse tõus naalduvas tuumas, mis osaleb motivatsioonis, tasustamises, mootorsetes funktsioonides ja õppimises (Shirayama jt, 2006), suurendab hiirtel ärevusele ja depressioonile sarnanevat käitumist kui ka vastuvõtlikkust stressi poolt tingitud anhedoonia ja sotsiaalse võõrandumise suhtes (Christoffel jt, 2012). *IKBKE* geeni produkt IKK $\epsilon$  osaleb TLR3 ja TLR4 vahendatud signaaliülekanne radades (Takeda ja Akira, 2004) ning katsed TLR3 ligandi poly(I:C)-ga (Alexopoulou jt, 2001) on näidanud, et kui teatud tiinuse etapil seda süstida närilistele, siis nende näriliste järglastel esineb ajuvatsakeste suurenemine (Li jt, 2009; Piontkewitz jt, 2011). Ajuvatsakeste suurenemine on skisofreeniale üks omasemaid neuroanatomilisi hälbeid (Wright jt, 2000). Katsed TLR4 ligandi LPS-iga (Kumar jt, 2011) näitavad, et LPS-i poolt esile kutsutud TLR4 aktivatsioon põhjustab hiirtel mikroglia poolt vahendatud neurodegeneratsiooni (Lehnardt jt, 2003). Lisaks on Venkatasubramanian ja Debnath (2013) esitanud hüpoteesi, et TLR3/TLR4 vahendatud signaliseerimine on seotud liigse hulga reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite moodustumises, millega kaasneb neuronite kahjustumine ja üldine neurodegeneratsioon ning seoses sellega kõrgem risk haigestuda skisofreeniasse. Samas ei viita need näited IKK $\epsilon$  olulisusele antud patoloogiate kujunemisel, vaid tervikuna antud signaaliradade tähtsusele haigusele omaste sümptomite kujunemisel.

Antud eksperimentaalse töö piiravateks teguriteks olid väike valim ning see, et antud uurimustöö raames uuriti ainult 4 SNP-d. Seega oleks edaspidi oluline katsesse kaasata suuremal arvul katseisikuid, et saada täiendavat kinnitust saadud tulemustele ning uurida ka teiste *IKBKE* geeni SNP-de seoseid skisofreeniaga. Kuna Eesti populatsioonis läbiviidud katse tulemusena leiti statistiliselt oluline SNP rs1930437, mis on näidanud olulist seost lisaks skisofreeniale ka depressiooniga, siis oleks oluline uurida, kas antud SNP võiks olla omane ka teistele lähedastele psühhiaatrilistele haigustele ning viia uuringuid läbi ka teistes geograafiliselt lähedastes populatsioonides. Võttes arvesse ka asjaolu, et *IKBKE* geeni produkt IKK $\epsilon$  on väga sarnane valgule TBK1 (Verhelst jt, 2013) ning nende funktsioonid on teatud määral asendatavad (Perry jt, 2004), siis oleks oluline uurida ka *TBK1* geeni polümorfismide seoseid skisofreeniaga kui ka *TBK1* ja *IKBKE* geenide polümorfisme kombineeritult seoses skisofreeniaga. Samuti oleks huvitav uurida *IKBKE* geeni polümorfisme skisofreenikute emadel, arvestades asjaolu, et ema immuunsüsteemi

aktivatsiooni kahjulikku mõju lootele seostatakse suurenenud skisofreeniasse haigestumise riskiga (Patterson, 2009).

## KOKKUVÕTE

Geen *IKBKE* kodeerib kinaasi nimega IKKε, mis osaleb viirusvastastes signaaliradades ning arvestades asjaolu, et ema infektsioonid raseduse ajal tõstavad skisofreeniasse haigestumise riski, on huvipakkuv uurida antud geeni seoseid skisofreeniaga. Käesolevas uurimustöös genotüpeeriti *IKBKE* geeni polümorfismid rs1539243, rs2274902, rs1930437 ja rs1953090. Antud polümorfismid on eelnevalt näidanud seost depressiooni ja paanikahäirega. Uuringu rühma moodustasid 127 skisofreenia patsienti ja 170 tervet kontrollisikut. Eksperimentaalse töö tulemusena leiti üks statistiliselt oluline ( $p_{\text{väärtus}}=0,0062$ ) *IKBKE* geeni SNP rs1930437, mille olulisus säilis ka pärast mitmese testimise korrigeerimise Bonferroni meetodil ( $p_{\text{väärtus}}=0,0248$ ). Katse tulemused viitavad, et Eesti populatsioonis omab antud SNP T-alleel protektiivset efekti (OR=0,631; 95% CI: 0,454....0,878) skisofreeniasse haigestumise suhtes. Kuna antud SNP on näidanud seost ka depressiooniga, siis edaspidi oleks oluline uurida antud SNP seoseid ka teiste psühhiaatriliste haigustega ning viia uuringuid läbi ka teistes geograafiliselt lähedastes populatsioonides. Käesoleva uurimustöö piiravateks teguriteks olid väike valim ja asjaolu, et uuriti vähest hulka SNP-sid. Seega oleks oluline katsesse kaasata nii suuremal hulgal katseisikuid, et saada täiendavat kinnitust saadud tulemustele, kui ka uurida suuremal hulgal *IKBKE* geeni SNP-sid.

## Associations between *IKBKE* gene and schizophrenia

Ahto Salumets

### Summary

Schizophrenia is a severe brain disease which has a long history of effects on society. The current understanding of schizophrenia principally derives from the work of Emil Kraepelin, Eugen Bleuler and Kurt Schneider. Schizophrenia is characterised by positive symptoms which include hallucinations and delusions, and negative symptoms such as apathy or social deprivation. Prevalence of schizophrenia ranges from 4 to 7 per 1000 persons. Schizophrenia is a multifactorial disease with several subtypes and whose aetiology is associated with both genetic predisposition and environmental risk factors.

Prenatal infections play a significant role in the aetiology of schizophrenia. One of the well-known risk factors for schizophrenia is a maternal influenza infection during pregnancy. In addition to influenza, there are several other viral and bacterial infections which have been reported to be associated with schizophrenia. The precise underlying mechanism which causes the increased risk of developing schizophrenia is still unclear.

*IKBKE* gene encodes a protein named IKK $\epsilon$  which is involved in antiviral signalling pathways. The aim of this case-control study was to investigate whether there exists an association between schizophrenia and *IKBKE*'s single nucleotide polymorphisms rs1539243, rs2274902, rs1930437 and rs1953090 amongst Estonian population. These polymorphisms have been previously linked to panic disorder and major depressive disorder. 127 schizophrenia patients and 170 healthy controls participated in this study.

It was found that *IKBKE* gene polymorphism rs1930437 has a statistically significant ( $p_{\text{value}}=0.0062$ ) association with schizophrenia and the result remained significant after Bonferroni correction ( $p_{\text{value}}=0.0248$ ). The results of this study refer to the possible protective effect (OR=0.631; 95% CI: 0.454...0.878) of the T-allele against the genesis of schizophrenia. Considering the small sample size, further research is required.

## **TÄNUAVALDUSED**

Avaldan tänu oma juhendajale vanemteadur Kati Koidole ja kaasjuhendajale teadur Tiit Nikopensiusele.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006), 124, 783–801.
- Aleman, A., Kahn, R. S., Selten, J.-P. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* (2003), 60, 565–571.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. Recognition of doublestranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* (2001), 413, 732–738.
- Bao, X., Indukuri, H., Liu, T., Liao, S. L., Tian, B., Brasier, A. R., et al. IKKepsilon modulates RSV-induced NF-kappaB-dependent gene transcription. *Virology* (2010), 408, 224–231.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* (2005), 21, 263-265.
- Benes, F. M., Berretta, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* (2001), 25, 1–27.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., et al. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J* (2000), 19, 4976–4985.
- Boyd, J. H., Pulver, A. E., Stewart, W. Season of birth: schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Bulletin* (1986), 12(2), 173–86.
- Brown, A. S., Begg, M. D., Gravestine, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., Babulas, V. P., Susser, E. S. Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* (2004), 61(8), 774–80.
- Brown, A. S., Cohen, P., Greenwald, S., Susser, E. Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella. *Am. J. Psychiatry* (2000), 157, 438–43.
- Brown, A. S., Cohen, P., Harkavy-Friedman, J., Babulas, V., Malaspina, D., Gorman, J. M., Susser, E. S. Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol. Psychiatry* (2001), 49, 473–86.

- Brown, A. S., Schaefer, C. A., Quesenberry, C. P., Liu, L., Babulas, V. P., Susser, E. S. Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am. J. Psychiatry* (2005), 162, 767–773.
- Carlsson, A. Does dopamine play a role in schizophrenia? *Psychological Medicine* (1977), 7, 583–597.
- Christoffel, D. J., Golden, S. A., Heshmati, M., Graham, A., Birnbaum, S., Neve, R. L., Hodes, G. E., Russo, S. J. Effects of Inhibitor of  $\kappa$ B Kinase Activity in the Nucleus Accumbens on Emotional Behavior. *Neuropsychopharmacology* (2012), 37, 2615–2623.
- Chubb, J.E., Bradshaw, N. J., Soares, D. C., Porteous, D. J., Millar, J. K. The DISC locus in psychiatric illness. *Molecular Psychiatry* (2008), 13, 36–64.
- Clark, K., Peggie, M., Plater, L., Sorcek, R. J., Young, E. R., Madwed, J. B., et al. Novel crosstalk within the IKK family controls innate immunity. *Biochem. J.* (2011), 434, 93–104.
- Clement, J. F., Meloche, S., Servant, M. J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell. Res.* (2008), 18, 889–899.
- Crow, T. J. Constraints on concepts of pathogenesis: language and the speciation process as the key to the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* (1995), 52, 1011–1014.
- Davies, G., Welham, J., Chant, D., Torrey, E. F., McGrath, J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* (2003), 29(3), 587-593.
- Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., Davidson, M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am. J. Psychiatry* (1991), 148, 1474–1486.
- De la Vega, F. M., Lazaruk, K. D., Rhodes, M. D., Wenz, M. H. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutation Research* (2005), 573, 111-135.
- de Messias, E. L. M., Cordeiro, N. F., Sampaio, J. J. C., Bartko, J. J., Kirkpatrick, B. Schizophrenia and season of birth in a tropical region: relationship to rainfall. *Schizophrenia Research* (2001), 48, 227-234.

- Detera-Wadleigh, S. D., Badner, J. A., Berrettini, W. H., Yoshikawa, T., Goldin, L. R., Turner, G., Rollins, D. Y., Moses, T., Sanders, A. R., Karkera, J. D. et al. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96(10), 5604-5609.
- Duan, J., Martinez, M., Sanders, A. R., Hou, C., Burrell, G. J., Krasner, A. J., Schwartz, D. B., Gejman, P. V. DTNBP1 and schizophrenia: association evidence in the 3' end of the gene. *Human Heredity* (2007), 64, 97–106.
- Eastwood, S. L., Harrison, P. J., 2006. Cellular basis for reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* (2006), 163, 540-542.
- Eisenächer, K., Krug, A. Regulation of RLR-mediated innate immune signaling – It is all about keeping the balance. *European Journal of Cell Biology* (2012), 91, 36– 47.
- Ellman, L. M., Deicken, R. F., Vinogradov, S., Kremen, W. S., Poole, J. H., Kern, D. M., Tsai, W. Y., Schaefer, C. A., Brown, A. S. Structural brain alterations in schizophrenia following fetal exposure to the inflammatory cytokine interleukin-8. *Schizophrenia Research* (2010), 121, 46–54.
- Fatemi, S. H., Earle, J. A., McMenomy, T. Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Molecular Psychiatry* (2000), 5, 654–663.
- Gallagher, B. J., Jones, B. J., McFalls Jr., J. A., Pisa, A. M. Schizophrenic subtype, seasonality of birth and social class: a preliminary analysis. *European Psychiatry* (2007), 22, 123-128.
- Garver, D. L., Tamas, R. L., Holcomb, J. A. Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. *Neuropsychopharmacology* (2003), 28(8), 1515–1520.
- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. 1998. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* (1998), 16, 225–260.
- Gilmore, T. D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* (2006), 25, 6680–6684.



- Goff, D. C., Tsai, G., Levitt, J., Amico, E., Manoach, D., Schoenfeld, D. A., Hayden, D. L., McCarley, R., Coyle, J. T. A placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* (1999), 56, 21–27.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Gerevini, V. D., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R. et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* (2000), 57, 1061-1069.
- Harris, J., Olieri, S., Sharma, S., Sun, Q., Lin, R., Hiscott, J., Grandvaux, N. Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK  $\epsilon$ . *Journal of Immunology* (2006), 177, 2527–2535.
- Harrison, P. J., Law, A. J., Eastwood, S. L. Glutamate receptors and transporters in the hippocampus in schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003), 1003, 94–101.
- Hoening, J., 1983. The concept of schizophrenia. Kraepelin–Bleuler–Schneider. *Br. J. Psychiatry* (1983), 142, 547–556.
- Huang, W., Ghisletti, S., Perissi, V., Rosenfeld, M. G., Glass, C. K. Transcriptional integration of TLR2 and TLR4 signaling at the NCoR derepression checkpoint. *Mol. Cell* (2009), 35, 48–57.
- Hunter, M. D., Woodruff, P. W. R. History, aetiology and symptomatology of schizophrenia. *Psychiatry* (2005), 4(10), 2–6.
- Jang, Y. L., Kim, J. W., Lee, Y. S., Park, D. Y., Cho, E. Y., Jeun, H. O., Lee, D., Hong, K. S. Linkage of schizophrenia with chromosome1q32 in Korean multiplex families. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* (2007), 144B, 279–284.
- Javitt, D. C., Zukin, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* (1991), 148, 1301– 1308.
- Jentsch, J. D., Roth, R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (1999), 20, 201–225.

- Kanduc, D. Describing the hexapeptide identity platform between the influenza A H5N1 and Homo sapiens proteomes. *Biologics: Targets & Therapy* (2010), 4, 245–61.
- Kawai, T., Akira, S. Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *TRENDS in Molecular Medicine* (2007), 13(11), 460-469.
- Kawai, T., Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* (2010), 11, 373–384.
- Kawai, T., Akira, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2008), 1143, 1–20.
- Kendler, K. S., McGuire, M., Gruenberg, A. M., Ohare, A., Spellman, M., Walsh, D. The Roscommon family study. 1. Methods, diagnosis of probands, and risk of schizophrenia in relatives. *Arch. Gen. Psychiatry* (1993), 50, 527-40.
- Keshavan, M. S., Nasrallah, H. A., Tandon, R. Schizophrenia, “Just the Facts” 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: From the elephant to the mouse. *Schizophrenia Research* (2011), 127, 3–13.
- Kim, J. S., Kornhuber, H. H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neuroscience Letters* (1980), 20, 379–382.
- Kishore, N., Huynh, Q. K., Mathialagan, S., Hall, T., Rouw, S., Creely, D., Lange, G., Carroll, J., Reitz, B., Donnelly, A. et al. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *J. Biol. Chem.* (2002), 277, 13840–13847.
- Knapp, M., Mangalore, R., Simon, J. Global costs of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* (2004), 30, 279–93.
- Kneeland, R. E., Fatemi, S. H. Viral infection, inflammation and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2013), 42, 35–48.
- Koido, K., Eller, T., Kingo, K., Kõks, S., Traks, T., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E., Maron, E. Interleukin 10 family gene polymorphisms are not associated with major depressive disorder and panic disorder phenotypes. *Journal of Psychiatric Research* (2010), 44, 275 - 277.

- Kravchenko, V. V., Mathison, J. C., Schwamborn, K., Mercurio, F., Ulevitch, R. J. IKKi/IKKepsilon plays a key role in integrating signals induced by pro-inflammatory stimuli. *The Journal of Biological Chemistry* (2003), 278, 26612–26619.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* (2011), 30, 16–34.
- Lahti, A. C., Weiler, M. A., Tamara Michaelidis B. A., Parwani, A., Tamminga, C. A. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* (2001), 25(4), 455–67.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003), 100, 8514–8519.
- Lemaitre, B., Nicloas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* (1996), 86, 973–983.
- Lewandowski, K. E. Relationship of catechol-O-methyltransferase to schizophrenia and its correlates: evidence for associations and complex interactions. *Harv. Rev. Psychiatry* (2007), 15, 233–244.
- Lewis, D. A., Hashimoto, T. Deciphering the disease process of schizophrenia: the contribution of cortical GABA neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* (2007), 78, 109–131.
- Lewis, D. A. Inhibitory neurons in human cortical circuits: substrate for cognitive dysfunction in schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* (2014), 26, 22–26.
- Li, Q., Cheung, C., Wei, R., Hui, E. S., Feldon, J., Meyer, U., et al. Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from MRI in a mouse model. *PLoS One* (2009), 4(7), e6354.
- Liu, L., Jia, F., Yuan, G., Chen, Z., Yao, J., Li, H., Fang, C. Tyrosine hydroxylase, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are over expressed in peripheral blood mononuclear cells from schizophrenia patients as determined by semi-quantitative analysis. *Psychiatry Res.* (2010), 176(1), 1–7.

- Malaspina, D., Harlap, S., Fennig, S., et al. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* (2001), 58, 361–367.
- Marcelis, M., Takei, N., van Os, J. Urbanization and risk for schizophrenia: does the effect operate before or around the time of illness onset. *Psychological Medicine* (1999), 29, 1197–1203.
- McGrath, J. Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? *Schizophrenia Research* (1999), 40, 173–177.
- McGrath, J., Saha, S., Welham, J., Saadi, O., MacCauley, C., Chant, D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrantstatus and methodology. *BMC Medicine* (2004), 2, 13.
- Meyer, U., Feldon, J., Dammann, O. Schizophrenia and Autism: Both Shared and Disorder-Specific Pathogenesis Via Perinatal Inflammation? *Pediatric Research* (2011), 69(5).
- Moreno, R., Sobotzik, J. M., Schultz, C., Schmitz, M. L. Specification of the NF-kappaB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK epsilon. *Nucleic Acids Res.* (2010), 38, 6029–6044.
- Morgan, V. A., Jablensky, A. V., Castle, D. J. Season of birth in schizophrenia and affective psychoses in Western Australia 1916–61. *Acta Psychiatr. Scand.* (2001), 104, 138–47.
- Mounce, J., Luo, L., Caprihan, A., Liu, J., Perrone-Bizzozero, N. I., Calhoun, V. D. Association of GRM3 polymorphism with white matter integrity in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, (2014).
- O'Brien, S. M., Scully, P., Dinan, T. G. Increased tumor necrosis factor-alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. *Psychiatry Res.* (2008), 160(3), 256–262.
- Olney, J. W., Newcomer, J. W., & Farber, N. B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* (1999), 33, 523–533.
- Pallast, E. G. M., Jongbloet, P. H., Straatman, H. M., Zielhuis, G. A. Excess seasonality of births among patients with schizophrenia and seasonal ovopathy. *Schizophrenia Bulletin* (1994), 20(2), 269–276.

- Patterson, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav. Brain Res.* (2009), 204(2), 313–321.
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C., Cheng, G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* (2004), 199, 1651–1658.
- Perry, T. L. Normal cerebrospinal fluid and brain glutamate levels in schizophrenia do not support the hypothesis of glutamatergic neuronal dysfunction. *Neuroscience Letters* (1982), 28, 81–85.
- Peters, R. T., Liao, S. M., Maniatis, T. IKK $\epsilon$  is part of a novel PMA-inducible I $\kappa$ B kinase complex. *Mol Cell* (2000), 5, 513–522.
- Piontkewitz, Y., Arad, M., Weiner, I. Abnormal trajectories of neurodevelopment and behavior following in utero insult in the rat. *Biol Psychiatry* (2011), 70, 842–851.
- Prasad, K. M., Talkowski, M. E., Chowdari, K. V., McClain, L., Yolken, R. H., Nimgaonkar, V. L. Candidate genes and their interactions with other genetic/environmental risk factors in the etiology of schizophrenia. *Brain Research Bulletin* (2010), 83, 86–92.
- Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., Sklar, P., et al. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* (2009), 460, 748–752.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J. & Sham, P. C. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics* (2007), 81, 559-575.
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J., A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* (2005), 2, 413–433.
- Sandelin, A., Wasserman, W. W., Lenhard, B. ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res.* (2004), 32, 249-252.
- Sharma, S., TenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., Hiscott, J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* (2003), 300, 1148–1151.

- Sheehan, D. V., Lecrubier, Y., Sheehan, K. H., et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* (1998), 59(20), 22-33.
- Shimada, T., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Inoue, J., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., Akira, S. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to I $\kappa$ B kinases. *Int. Immunol.* (1999), 11, 1357–1362.
- Shirayama, Y., Chaki, S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Current Neuropharmacology* (2006) , 4, 277-291.
- Soderlund, J., Schroder, J., Nordin, C., Samuelsson, M., Walther-Jallow, L., Karlsson, H., et al. Activation of brain interleukin-1beta in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* (2009), 14, 1069–1071.
- Sorensen, H. J., Mortensen. E. L., Reinisch, J. M. , Mednick, S. A. Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* (2009), 35(3), 631–637.
- Sullivan, P. F., Kendler, K. S., Neale, M. C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch. Gen. Psychiatry* (2003), 60, 1187–1192.
- Tak, P. P., Firestein, G. S. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation* (2001), 107(1).
- Takeda, K., Akira, S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* (2004),16, 3–9.
- Talkowski, M. E., Kirov, G., Bamne, M., et al., A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* (2008), 17, 747–758.
- Tan, W., Wang, Y., Gold, B., Chen, J., Dean, M., Harrison, P. J., Weinberger, D. R., Law, A. J. Molecular cloning of a brain-specific, developmentally regulated neuregulin 1 (NRG1) isoform and identification of a functional promoter variant associated with schizophrenia. *The Journal of Biological Chemistry* (2007), 282, 24343–24351.
- Tandon, R., Keshavan, M. S., Nasrallah, H. A. Schizophrenia, “Just the Facts” What we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophrenia Research* (2008), 102, 1–18.

Tandon, R., Nasrallah, H. A., Keshavan, M. S. Schizophrenia, “Just the Facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research* (2009), 110, 1–23.

Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., et al. NAK is an I $\kappa$ B kinase-activating kinase. *Nature* (2000), 404, 778–782.

Traks, T., Koido, K., Balõtshev, R., Eller, T., Kõks, S., Maron, E., Tõru, I., Shlik, J., Vasar, E., Vasar, V. Polymorphisms of *IKBKE* gene are associated with major depressive disorder and panic disorder. Manuscript submitted.

Venkatasubramanian, G., Debnath, M. The TRIPS (Toll-like receptors in immunoinflammatory pathogenesis) Hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2013), 44, 301–311.

Verhelst, K., Verstrepen, L., Carpentier, I., Beyaert, R. I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ): A therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology* (2013), 85, 873–880.

Voineskos, A. N., Lett, T. A. P., Lerch, J. P., Tiwari, A. K., Ameis, S. H., Rajji, T. K., Müller, D. J., Mulsant, B. H., Kennedy, J. L. Neurexin-1 and frontal lobe white matter: an overlapping intermediate phenotype for schizophrenia and autism spectrum disorders. *PLoS One* (2011), 6(6), e20982.

World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Diagnostic criteria for research.

Wright, I. C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P. W. R., David, A. S., Murray, R. M., Bullmore, E. T. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry* (2000), 157, 16–25.

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., Day, I. N. M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research* (2001), 29, e88.

### **Kasutatud veebiaadressid**

<http://consite.genereg.net>

<http://www.ensembl.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Ahto Salumets

(sünnikuupäev: 29.01.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Skisofreenia ja *IKBKE* geeni vahelised seosed,

mille juhendajad on Kati Koido ja Tiit Nikopensius,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2014