

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MARIA KAARE

**IgLON perekonna adhesioonimolekulide ekspressiooni muutused seoses
psüühikahäiretega ning *Negr1*^{-/-} hiire sotsiaalne fenotüüp**

Magistritöö biomeditsiinis

40 EAP

Juhendajad: PhD Mari-Anne Philips

PhD Tambet Tõnissoo

Tartu 2018

INFOLEHT

IgLON perekonna adhesioonimolekulide ekspressiooni muutused seoses psüühikahäiretega ning *Negr1*^{-/-} hiire sotsiaalne fenotüüp

IgLON-id reguleerivad sünapsite plastilisust, neuritiidide väljakasvu ja teisi normaalsete närviringete moodustumiseks vajalikke protsesse; milles skisofreeniapatsientidel esineb sageli kõrvalekaldeid. Töö teoreetilise osa eesmärgiks on uurida, milliste erinevate fenotüüpidega on IgLON geenides paiknevaid SNP-sid varasemate uuringute käigus seostatud ning teha kindlaks, kas kõige olulisemad skisofreeniaga seotud lookused asuvad IgLON geenide lähedal. Töö praktilise osa eesmärk oli iseloomustada IgLON geenide mRNA/valgu ekspressiooni skisofreeniapatsientide dorsolateraalsetes prefrontaalkoores ning uurida kas inimuuringutes oluliselt muutunud

Märksõnad: skisofreenia, dorsolateraalne prefrontaalkoor, LSAMP, NTM, OPCML, NEGR1, IGLON5, GWAS uuringud, SNP-d, *Negr1*^{-/-} hiired, sotsiaalne käitumine.

CERCS: B790 Kliiniline geneetika

Changes of the expression levels of the genes coding IgLON family adhesion molecules in relation to mental disorders and social phenotype of *Negr1*^{-/-} mice

IgLON proteins have been shown to be involved in neurite outgrowth, synaptic plasticity and neuronal connectivity, all of which have been shown to be alerted in the brain of patients having the diagnosis of schizophrenia. The aims of the theoretical part of this thesis lies in explaining which of the various phenotypes are associated with the SNPs in the IgLON genes in the earlier studies and to find out whether the most important loci related to schizophrenia are located near the IgLON genes. The aims of the practical part of the study were the characterization of the mRNA/protein expression of the IgLON genes in the dorsolateral prefrontal cortex of the schizophrenia patients and, to determine whether switching off *Negr1* causes changes in the social behaviour of the mice.

Keywords: schizophrenia, dorsolateral prefrontal cortex, LSAMP, LSAMP, NTM, OPCML, NEGR1, IGLON5, GWAS, SNPs, *Negr1*^{-/-} mouse, social behavior.

CERCS: B790 Clinical genetics

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1. IgLON perekond	10
1.1.1. LSAMP.....	10
1.1.2. OPCML	13
1.1.3. NTM.....	14
1.1.4. NEGR1	16
1.1.5. IgLON5	17
1.2. Prefrontaalkoor	17
1.3. Skisofreenia	19
1.3.1. Skisoafektiivne häire	21
1.3.2. Skisofreeniaga seostatud geneetilised faktorid	21
1.3.3. Skisofreeniaga seostatud keskkonnafaktorid	22
1.3.4. Mudelid skisofreenia uurimiseks	24
2. EKSPERIMENTAALOSA	26
2.1. Töö eesmärgid.....	26
2.2. Materjalid ja metoodika	27
2.2.2. GWAS andmete analüüs.	27
2.2.3. Inimeste valim ja koeproovid.....	27
2.2.3.1. qPCR.....	28
2.2.3.2. Western blot.....	29
2.2.4. Negr1 puudulikkuse uurimine hiirmudelisel.....	30
2.2.4.1. Katseloomad	30
2.2.4.2. Vurrude trimmimise hindamine.....	30
2.2.4.3. Kolme kambri sotsiaalsustest	31
2.2.5. Statistilised analüüsid.....	31
2.3. Tulemused.....	33
2.3.1. Inimese IgLON geenide SNP-de analüüs.....	33
2.3.2. GWAS andmete analüüs	33

2.3.3. IgLON perekonna geenide ekspressiooni analüüs DLPFC-s	35
2.3.3.1. Gruppide vahelised analüüsid	35
2.3.3.2. Skisofreeniapatsientide grupisisene analüüs	38
2.3.3.2.1. Seos enesetappude sooritamise ja narkootikumide tarbimise vahel skisofreeniapatsientidel	39
2.3.4. <i>Western blot</i> analüüs	40
2.3.5. Kolme kambri sotsiaalsustest	42
2.3.6. Vurrude trimmimise hindamine	43
2.4. Arutelu	44
KOKKUVÕTE	50
SUMMARY	51
TÄNUSÕNAD	53
KASUTATUD KIRJANDUS	54
Kasutatud artiklid.....	54
Kasutatud õpikud	70
Kasutatud veebilehed	70
Bakalaureusetöö	70
LISAD	71
Lisa 1.....	71
Lisa 2.....	75
Lisa 3.....	77
LIHTLITSENTS.....	89

KASUTATUD LÜHENDID

ACC – ingl k *anterior cingulate cortex*

ADHD – aktiivsus- ja tähelepanuhäire, ingl k *attention deficit hyperactivity disorder*

APD – antisotsiaalne isiksushäire ingl k *antisocial personality disorder*

ASD – autismispektri häire, ingl k *autism spectrum disorder*

BCA – bitsiinohiinhape ingl k *bicinchoninic acid assay*

BMI – kehamassiindeks, ingl k *body mass index*

BPD – bipolaarne häire, ingl k *bipolar disorder*

CNV – koopiaarvu variatsioon, ingl k *copy number variation*

CT – tsükli lävi, ingl k *cycle threshold*

DISC1 – ingl k *Disrupted in schizophrenia*

DLPFC/dLPFC – dorsolateraalne prefrontaalkoor, ingl k *dorsolateral prefrontal cortex*

dmPFC – dorsomediaalne prefrontaalkoor, ingl k *dorsomedial prefrontal cortex*

DRG – spinaalganglion, ingl k *dorsal root ganglion*

DSM-4 – ingl k *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*

E – embrüonaalne arengupäev, ingl k *embryonic day of development*

eQTL – ekspressiooni kvantitatiivse tunnuse lookus, ingl k *expression quantitative trait loci*

fMRI – funktsionaalne magnetresonantstomograafia, ingl k *functional magnetic resonance imaging*

GABA – γ -aminovõihape, ingl k *gamma-aminobutyric acid*

GAPDH – glütseeraldehüüd-3-fosfaat dehüdrogenaas ingl k *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GPI–glükosüül-fosfatidüül-inositol, ingl k *glycosyl-phosphatidyl-inositol*

GWAS – ülegenoomsed assotsiatsiooni uuringud, ingl k *genome-wide association studies*

HSV-2 – ingl k *herpes simplex virus 2*

Ig – immuunoglobuliin

IgLON – immuunoglobulin LON, ingl k *immunoglobulin LON*

KON – kontroll

LCR – madala koopia kordused, ingl k *low copy repeat*

LSAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanivalk, ingl k *limbic system-associated membrane protein*

LSD – lüsergiinhappe dietüülamiidi, ingl k *lysergic acid diethylamide*

MAM – metüülasoksümetanoolatsetaat, ingl k *methylazoxymethanol acetate*

MDD–ingl k *major depressive syndrome*

MPFC – mediaalne prefrontaalkoor, ingl k *medial prefrontal cortex*

NEGR1 – neuraalne kasvuregulaator 1, ingl k *neuronal growth regulator 1*

NMDA – N-metüül-D-aspartaat, ingl k *N-methyl-D-aspartate*

NTM – neurotrimiin

OFC – orbifrontaalkoor, ingl k *orbifrontal cortex*

OPCML – opioide siduv raku adhesioonimolekul, ingl k *opioid binding protein/cell adhesion molecule like*

PCP–fentsükliidiini, ingl k *phencyclidine*

PD – paanikahäire, ingl k *panic disorder*

PGC– ingl k *Psychiatric Genetics Consortium*

RHK-10 – Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsiooni 10. versioon

RIN – ingl k *RNA integrity number*

RIPA – ingl k *radioimmunoprecipitation assay*

SA – skisoafektiivne häire

SCG – ülemine kaelaganglion, ingl k *superior cervical ganglion*

SKI – skisofreenia

SNP – ühenukleotiidne polümorfism, ingl k *single nucleotide polymorphism*

SP – signaalpeptiid, ingl k *signal peptide*

UTR – ingl k *untranslated region*

VLPFC/vlPFC – ventrolateraalne prefrontaalkoor, ingl k *ventrolateral prefrontal cortex*

vmPRC – ventromediaalne prefrontaalkoor, ingl k *ventromedial prefrontal cortex*

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon, ingl k *World Health Organization*

WT – metsiktüüp, ingl k *wild type*

SISSEJUHATUS

Neuraalsed adhesioonimolekulid on olulised närviringete tekkel ja säilitamisel. Üha enam tõendeid viitab sellele, et IgLON perekonna adhesioonimolekulid: limbilise süsteemiga seotud membraanivalk LSAMP (ingl k *limbic system-associated membrane protein*), neurotrimin (NTM), opioide siduv raku adhesioonimolekul OPCML (ingl k *opioid-binding cell adhesion molecule*), neuraalne kasvuregulaator NEGR1 (ingl k *neuronal growth regulator 1*) ja IgLON5, on olulised molekulaarsed faktorid, mis panustavad skisofreenia tekkesse. On näidatud, et IgLON valgud osalevad neuriitide väljakasvus, sünapside plastilisuses ja närviringete moodustumises; just nende protsesside puhul on näidatud muutuseid skisofreeniapatsientide ajus.

Käesolev töö on edasiarendus minu bakalaureusetööst „IgLON valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutused skisofreeniapatsientide dorsolateraalses frontaalkoores”. Uutes analüüsides on kasutatud juba osaliselt bakalaureusetöö käigus saadud qPCR analüüsi andmeid (Kaare, 2016). Bakalaureusetöös kasutatud andmeanalüüsimeetodid ei olnud optimaalsed, sest kasutati Student-t testi, mis on parameetriline test. Magistritöös kasutati mitteparameetrilisi teste, kuna andmed ei jaotunud normaaljaotuse kohaselt. Lisaks vaadati antud töös eraldi skisofreeniat ja skisoafektiivset häiret, teostati korrelatsioonanalüüsid ning viidi läbi *western blot* analüüs geeniekspressiooni tulemuste kinnitamiseks. Samuti uuriti kaasuva diagnoosi ning ainete tarbimise mõjusid skisofreeniapatsientide grupisiseselt.

Käesolev magistritöö jaguneb teoreetiliseks osaks, mis seisnes varasema kirjanduse ning GWAS andmete analüüsis ning praktiliseks osaks, mis baseerub laboratoorse töö tulemustel. Teoreetilise osa eesmärgiks oli selgitada, milliste erinevate fenotüüpidega on IgLON geenides asuvaid SNP-sid varasemates uuringutes seostatud ning spetsiifilisemalt analüüsida skisofreeniaga seotud ülegenoomseid assotsiatsiooniuuringuid (GWAS, ingl k *genome-wide association study*). Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli teha kindlaks, kas skisofreeniapatsientide dorsolateraalses prefrontaalkoores esineb muutuseid IgLON geenide mRNA/valgu ekspressioonis võrreldes tervete indiviididega ning uurida detailsemalt patsientide gruppi. Kuna *Negr1* geeni puhul nägime kõige suuremaid muutusi nii geeni kui valgu tasemel, oli eesmärgiks uurida *Negr1* välja lülitamise mõju hiiremudelil. Kuna skisofreenia puhul on üheks keskseks sümptomiks muutused sotsiaalses käitumises, uurisime *Negr1* väkjalülitamise mõju hiirte sotsiaalsele käitumisele kasutades kolme kambri sotsiaalsustesti ning hindasime nende vastastikkust vurrude trimmimist, mis on samuti oluline sotsiaalse hierarhia indikaator.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja Siirdemeditiini Instituudi Füsioloogia õppetoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. IgLON perekond

Raku adhesioonimolekulid, nagu näiteks IgLON valgud, on väga olulised närviringete korrektse moodustumisel. IgLON-id on immunoglobuliinide (Ig) superperekonda kuuluvad glükoproteiinidest adhesioonimolekulid. IgLON-id koosnevad kolmest C2 tüüpi Ig domeenist ja kinnituvad glükosüül-fosfatidüül-inositol (GPI, ingl k *glycosyl-phosphatidyl-inositol*) ankru abil rakkude plasmamembraanile. (Pimenta jt., 1995) IgLON perekonna adhesioonimolekulide hulka kuuluvad limbilise süsteemiga seotud membraanivalk (LSAMP, ingl k *limbic system-associated membrane protein*) (Horton ja Levitt, 1988), neurotrimin (NTM) (Struyk jt., 1995), opioide siduv raku adhesioonimolekul (OPCML, ingl k *opioid-binding cell adhesion molecule*) (Schofield jt., 1989), neuraalne kasvuregulaator 1 (NEGR1, ingl k *neuronal growth regulator 1*) (Funatsu jt., 1999) ja IgLON5 (Grimwood jt., 2004). IgLON valgud moodustavad raku pinnale homofiilseid ja heterofiilseid komplekse (Reed jt., 2004) ja reguleerivad neuriitide väljakasvu (Akeel jt., 2011), dendriitide hargnemist (Pischedda jt., 2014; Pischedda ja Piccoli, 2016) ja sünapside moodustumist (Hashimoto jt., 2009) nii arenevas kui ka täiskasvanud ajus. Polümorfisme IgLON geenides on seostatud inimesel mitmete erinevate psühhiaatriliste häiretega. Kuigi IgLON-id on eelkõige neuraalsed adhesioonimolekulid on näidatud, et nad võivad mitmetes kudedes toimida ka tuumorsupressoritena (Chen jt., 2003; Sellar jt., 2003; Ntougkos jt., 2005) Näiteks epiteliaalse munasarjavähi puhul on *OPCML*, *LSAMP* ja *NEGR1* mRNA ekspressiooni tase võrreldes terve koega langenud ning *NTM* ekspressiooni tase on tõusnud (Ntougkos jt., 2005).

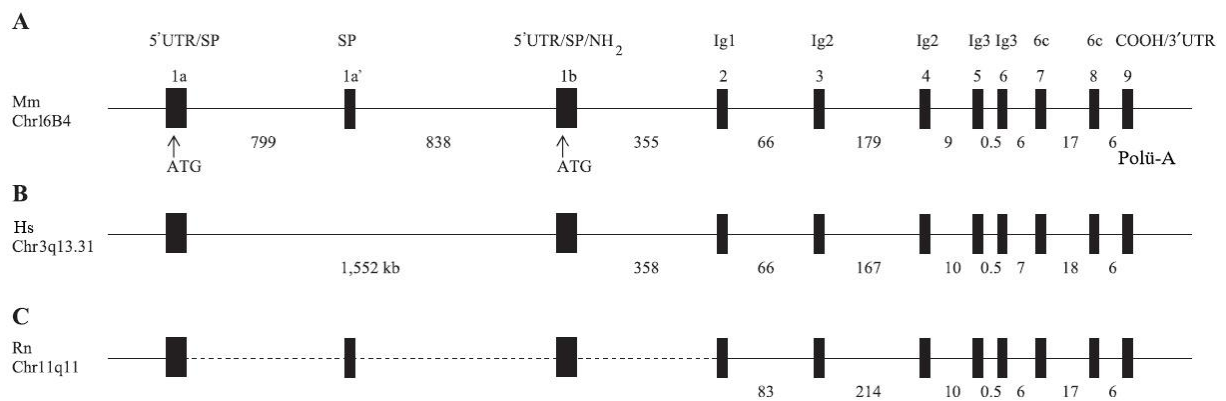
1.1.1. LSAMP

Inimesel paikneb *LSAMP* 3q13.31 piirkonnas (NCBI 1). *LSAMP* valku ekspresseeritakse limbilise süsteemi kortikaalsetes ja subkortikaalsetes regioonides paiknevate neuronite keha- ja dendriitidel (Levitt, 1984). *LSAMP* geenil on kaks alternatiivset promootorit 1a ja 1b (joonis 1). Hiirel ekspresseerub *Lsmp* 1a hipokampuse, temporaalkoore, mandelkeha, ventraalse striatumi ning tsingulaar- ja insulaarkoore piirkondades. *Lsmp* 1b ekspresseerub sensoorsetes radades, mis ulatuvad ajutüvest ja taalamuse sensoorsetest tuumadest primaarsete sensoorsete aladeni ajukoos. Lisaks ekspresseerub *Lsmp* 1b ka piirkondades, mis moodustavad limbilise süsteemi ja on seotud stressi ja erutuse reguleerimisega. (Philips jt., 2015). Lisaks närvisüsteemile esineb madal *Lsmp* 1a ja 1b ekspressioon veel urogenitaalsüsteemis, *Lsmp* 1b ekspresseerub ka südames, skeletilihastes ja peensooles.

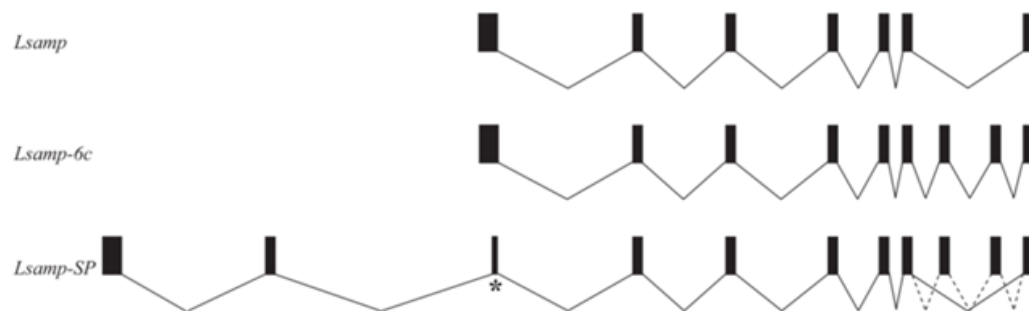
Samuti on tuvastatav *Lsamp* ekspressioon maksas. (Vanaveski jt., 2017). Hiire *Lsamp* cDNA kodeerib 338-aminohappelise polüpeptiidi, mille moodustavad kolm Ig domeeni. LSAMP valgul on kaks signaaljärjestust, milleks on signaalpeptiid (SP, ingl k *signal peptide*) ja hüdrofoobne C-terminus (Pimenta jt., 1995). SP roll pole täpselt teada, aga võimalik, et see on põhjuseks, miks erinevatelt promootoritelt saadud produktidel on erinev ekspressioonimuster. Lisaks võib SP-l olla roll posttranslatsioonilistes modifikatsioonides. SP lõigatakse mingil hetkel raku küljest ära, aga pole täpselt teada, millal see toimub.

Hiirel on *Lsamp* geen umbes 2,28 Mb pikkune ja sisaldab 11 eksonit. Viit eksonit kasutatakse alternatiivsel splaissingul, et moodustada kolm transkripti (joonis 2) ja seitse eksonit (1b–6 ja 9) kodeerivad *Lsamp* cDNA-d. Kaks eksonit (7 ja 8) osalevad alternatiivselt splaissitud vormi moodustumises, kus on toimunud 69 nukleotiidiline insertioon. Eksonid 1a ja 1a' kodeerivad hiire *Lsamp*-SP alternatiivset 5' UTR (ingl k *untranslated region*) signaalpeptiidi. Ekson 1b sisaldab 5'-UTR-i, initsiaator ATG järjestust ja nukleotiidset järjestust, mis kodeerib signaalpeptiidi ning LSAMP valgu N-terminust. Ekson 1a sisaldab alternatiivset 5'-UTR-i koos initsiaator ATG järjestusega ja järjestust, mis kodeerib signaaljärjestuse esimesi 22 aminohapet, ülejäänud 20 signaalpeptiidi aminohapet kodeeritakse ekson 1a' poolt. DNA järjestus, mis kodeerib Ig1 paikneb täielikult eksonis 2, samas kui Ig2 ja Ig3 kodeerivaid järjestusi katkestab intron ja seega need järjestused paiknevad mitmes eri eksonis. Ig2 paikneb eksonites 3 ja 4 ning Ig3 paikneb eksonites 5 ja 6. Viimases eksonis (9) paikneb valgu C-terminust kodeeriv ala ja 3'-UTR koos polüadenülatsioonisaidiga. Kaks suurt intronit paiknevad eksonite 1a ja 1a' ning 1a' ja 1b vahel, kolmas suur intron paikneb eksonite 1b ja 2 vahel (joonis 1). (Pimenta ja Levitt, 2004)

Inimese *LSAMP* geeni pikkus ja eksonite paigutus on identne hiire omaga, välja arvatud ekson 1a'. Inimesel on ekson 1a' läinud kaduma ühekoodonilise insertiooni ja kahe nukleotiidi lisandumise tõttu, mis põhjustavad raaminihke ja terminatsiooni koodoni tekke. Lisaks on puudu eksoni 1a akseptor splaissingu sait. Intronid on sarnase suurusega, välja arvatud esimene intron, mis 1a' eksoni puudumise tõttu on inimesel umbes 1,6 kb pikk (joonis 1). Ekson/intron struktuur on erinevatel imetaja liikidel kõrgelt konserveerunud. (Pimenta ja Levitt, 2004)



Joonis 1. Koduhiire (Mm) (A), tänapäevainimese (Hs) (B) ja rändroiti (Rn) (C) LSAMP struktuuri võrdlus. Inimese, hiire ja roiti *LSAMP* geeni pikkus ja eksonite paigutus on peaaegu identne, välja arvatud ekson 1a'. Inimesel on ekson 1a' läinud kaduma tänu ühekoodonilisele insertisoonile ja kahele lisa nukleotiidile, mis põhjustavad raaminihke ja terminatsiooni koodoni tekke (modifitseeritud Pimenta ja Levitt, 2004 järgi). SP – signaalpeptiid.

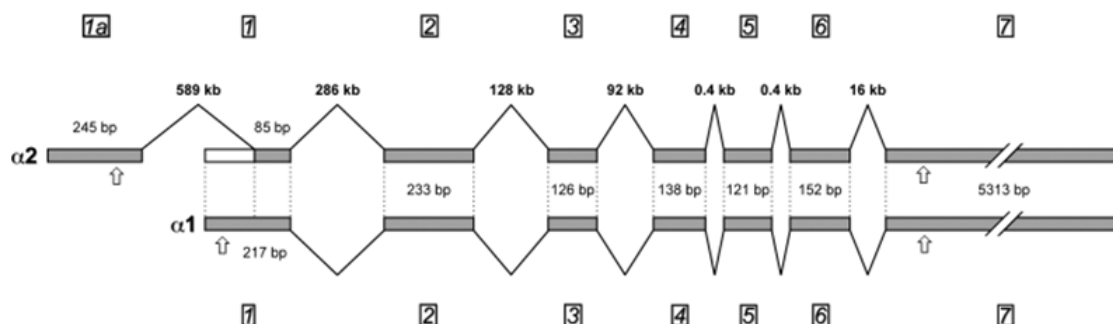


Joonis 2. Lsamp cDNA splaissing. Tänu splaissingule saadakse mitu *Lsamp* cDNA isovormi. (modifitseeritud Pimenta ja Levitt, 2004 järgi).

Polümorfisme *LSAMP* geenis on inimesel seostatud mitmete erinevate psühhiaatriliste häiretega. Hiljutiste uuringute kohaselt on kindlaid ühenukleotiidilisi polümorfisme (SNP, ingl k *singel nucleotide polymorphism*) inimese *LSAMP* geeni 1b promootoris seostatud skisofreenia riskiga (Koido jt., 2014). Seda seost on hiljuti kinnitatud ka Aasia valimis (Chen jt., 2017). Lisaks on leitud, et *LSAMP* valgu tase on tõusnud skisofreeniapatsientide postmortaalses dorsolateraalses prefrontaalkoores (Behan jt., 2009) ning postmortaalses anterioorses prefrontaalkoores võrreldes tervete inimestega (Cox jt., 2016). 2,06 Mb pikkust mikrodeletsiooni, mis hõlmab endas ka *LSAMP* geeni, piirkonnas 3q13.31 on seostatud skisofreeniaga (Lowther jt., 2014). Veel on näidatud, et *LSAMP* võib olla seotud depressiooni (MDD, ingl k *major depressive disorder*) ja paanikahäirete (PD, ingl k *panic disorder*) tekkega (Koido jt., 2012).

1.1.2. OPCML

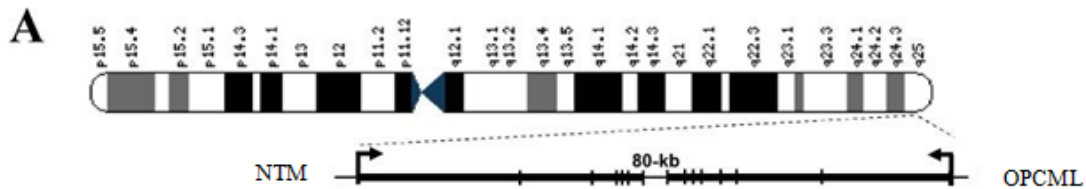
OPCML paikneb inimesel 11q25 piirkonnas (NCBI 2). *OPCML* geen sisaldab 7 eksonit ja on umbes 600 kb pikkune. (Sellar jt., 2003). *OPCML* geenil on kaks alternatiivset promootorit 1a ja 1b (joonis 3).



Joonis 3. *OPCML* geen. *OPCML* geen koosneb 7 eksonist ja 7 intronist. *OPCML* geenil on kaks alternatiivset promootorit 1a ja 1b ning kaks transkripti ($\alpha 2$ ja $\alpha 1$). Mõlemad transkriptid jagavad eksoneid 2–7, aga erinevad 5' eksoni poolest. Selleks, et tekiks spalissingu variant $\alpha 2$ eemaldatakse ekson 1 ülesvoolu osa (valge riskülik) ja liidetakse kokku ekson 1a ja eksoni 1 allavoolu osa. (modifitseeritud Reed jt., 2007 järgi)

Hiirel ekspresseerub *Opcml* 1a kõrgelt frontaalkoore piirkonnas ja 1b väikeaju piirkonnas. Mõlemad promootorid on aktiivsed haistesibula piirkonnas. *Opcml* 1a promootori aktiivsus märkimisväärne ka näiteks skeletilihastes, kopsudes, maksas ja munasarjades, südames on aktiivne ainult *Opcml* 1b promootor. (Vanaveski jt., 2017). *OPCML* ekspresseerub neuronite kehades ja dendriitidel (peamiselt postsünaptilistes piirkondades) ning *OPCML* ekspressiooni tase kasvab neuronite arenedes. *OPCML* osaleb sünapside arvu reguleerimisel: kui supresseerida *OPCML* ekspressioon neuronites, siis sünapside arv langeb ja kui *OPCML* on üleekspresseeritud, siis sünapside arv tõuseb. (Yamada jt. 2007)

IgLON perekonna liikmetest on *OPCML* kõige homoloogilisem *NTM*-ga ja nad paiknevad 11-ndal kromosoomil teineteisest 80 kb kaugusel vastupidistes orientatsioonides (joonis 4). *NTM* ekson 1a ja *OPCML* ekson 1a on omavahel identsed ning ekson 2 erineb ainult mõne aluspaari poolest. Esimene Ig domeen on neil 97% ulatuses identne, teine Ig domeen 70% ja kolmas Ig domeen 66% ulatuses identne. Seega on tõenäoline, et *OPCML* ja *NTM* on evolutsiooni käigus tekkinud geeni duplikatsiooni ja konversiooni tulemusena ühest ja samast eellasgeenist. (Cui jt., 2008)



Joonis 4. Lookuse 11q25 genoomne organisatsioon. *NTM* ja *OPCML* paiknevad kromosoomil lähestikku vastastikustes orientatsioonides. Nooled näitavad geeni orientatsiooni kromosoomil. (modifitseeritud Cui jt., 2008 järgi)

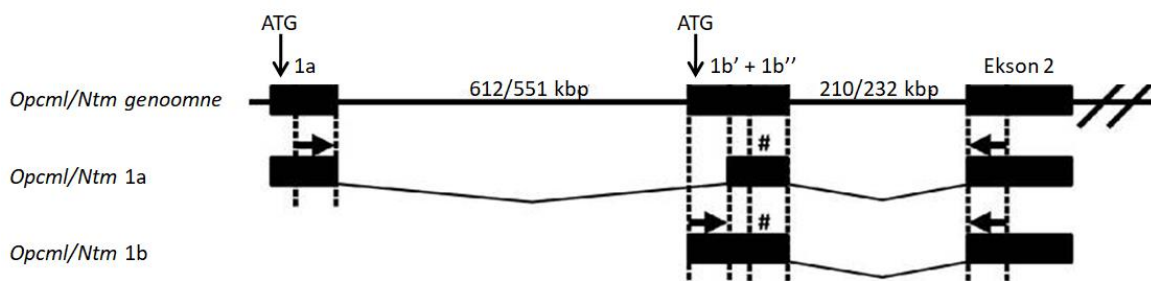
Mitmed uuringud on näidanud, et *OPCML* geenil võib olla seos skisofreenia tekkega. Panichareon jt. tuvastasid Tai populatsioonides neli SNP-d (rs3016384, rs1784519, rs1894193, ja rs1939498), mida nad seostasid skisofreenia tekkega (Panichareon jt., 2012). Samuti on leitud SNP-sid Euroopa populatsioonides, mida on seostatud skisofreeniaga (O'Donovan jt., 2008; Athanasiu jt., 2010). Lisaks on leitud, et *OPCML* on seotud MDD tekkega (Schol-Gelok jt., 2010). Skisofreenia tekkega on seostatud ka koopiarvu variatsioone (CNV, ingl k *copy number variation*) piirkonnas 11q25 (Magri jt., 2010; Ye jt., 2012). PGC (ingl k *Psychiatric Genetics Consortium*) poolt läbi viidud GWAS uuring näitas, et *OPCML* on seotud skisofreenia tekkeriskiga (Ripke jt., 2014).

Lisaks on näidatud, et *OPCML* geen mängib rolli kasvaja tekkel. Näiteks on *OPCML* geen seotud epiteelaalse munasarja kasvaja tekkega. Üldiselt on *OPCML* geeni CpG saared metüleerimata, aga epiteelaalse munasarja kasvaja puhul on *OPCML* geeni CpG saared metüleeritud. CpG saarte metüleerimine on üheks mehhanismiks, mille abil surutakse alla tuumorsupressorgeenide tööd. (Sellar jt., 2003) *OPCML* omab tuumorsupressiivset aktiivsust ka mitmetes teistes koetüüpides (näiteks kopsu, rinna ja eesnäärme kartsinoomi puhul ning lümfoomide puhul) (Cui jt., 2008).

1.1.3. *NTM*

Inimesel paikneb *NTM* geen 11q25 piirkonnas (NCBI 3). Inimese *NTM* on järjestuselt 97% ulatuses identne roti omaga ja sellel on kolm erinevat transkripti (Liu jt., 2004). *NTM* on ainus IgLON perekonna liige, mis on nii homo- kui ka heterofiilne adhesioonimolekul (Reed jt., 2004). Sarnaselt *LSAMP*-i ja *OPCML*-ga on ka *NTM*-l kaks alternatiivset promootorit (joonis 5). Hiirel on *Ntm* 1a ja 1b promootorite aktiivsused märgatavalt erinevad. *Ntm* 1a promootori aktiivsus on kõrgeim frontaalkoore ja taalamuse piirkondades, samas kui 1b on kõige aktiivsem väikeaju piirkonnas. Lisaks närvisüsteemile esineb madal *Ntm* ekspressiooni

veel südames, neerudes, neerupealistes, testistes, munasarjades ja emakas. *Ntm* 1b ekspresseerub lisaks maksas ja seemnejuhades. (Vanaveski jt., 2017) Arenguliselt on näidatud, et *NTM* ekspressiooni tase on täiskasvanu ajus märgatavalt kõrgem kui loote ajus (Jin jt., 2004).



Joonis 5. Hiire *Ntm* ja *Opcml* alternatiivsed promoitorid 1a ja 1b. (modifitseeritud Vanaveski jt., 2017 järgi)

NTM on oluline neuriitide väljakasvu kontrollimisel. *NTM* moodustab membraani pinnal homomeerseid komplekse ja vahendab homofiilset adhesiooni. *NTM* seob spetsiifiliselt spinaalganglioni (DRG, ingl k *dorsal root ganglion*) ja hipokampuse neuroneid, mis ekspresseerivad *NTM*-i ja ei seo ülemise kaelaganglioni (SCG, ingl k *superior cervical ganglion*) neuroneid, mis *NTM*-i ei ekspresseeri. *NTM* soodustab DRG neuronitel neuriitide väljakasvu ning SCG neuronitel inhibeerib neuriitide väljakasvu. (Gil jt., 1998)

Mitmed uuringud on näidanud, et *NTM* on seotud kognitiivsete funktsioonidega. *NTM* geeni esimesest intronist on leitud neli SNP-d, mida on seostatud kognitiivsete funktsioonide ja hilise algusega Alzheimeri tõvega (Liu jt. 2007). Perekonnapõhised uuringud on tuvastanud *NTM* geenist SNP-sid, mida on seostatud intelligentsusega (Pan jt., 2011). CNV-sid *NTM* geenis on seostatud autismispektri häirete (ASD, ingl k *autism spectrum disorder*) tekkega. (Maruani jt., 2015). *NTM*-d on genoomiüleste metaanalüüside abil seostatud skisofreenia ja bipolaarse häirega (Wang jt., 2010).

NTM võib rolli mängida ka kasvajate tekkel. Ntougkos jt. näitasid epiteliaalse munasarjavähi puhul *NTM* ekspressioonitaseme tõusu (Ntougkos jt., 2005). Ulmer jt. leidsid *NTM* geenist ühe SNP, mis võib olla seotud primaarse avatud nurga glaukoomi tekkega (Ulmer jt., 2012). Ajukasvajate puhul on näidatud *NTM* ekspressiooni taseme langust. (Jin jt., 2004).

1.1.4. NEGR1

Inimesel paikneb *NEGR1* geen 1p31.1 piirkonnas (NCBI 4). Hiirel ekspresseerub *Negr1* kõrgemalt oimusagara, väikeaju, suurajukoore ning eesaju piirkonnas. Madalam *Negr1* ekspressioon on tuvastatud ajutüves ja silmades. Lisaks närvisüsteemile ekspresseerub *Negr1* veel mitmetes organites ja kudedes (näiteks skeetilihaates, neerupealistes, südames, kopsudes, maksas, neerudes, munasarjades, testistes). (Vanaveski jt., 2017)

NEGR1 on oluline mitmete psühhiaatriliste häirete kujunemisel. Näiteks mikrodeletsiooni *NEGR1* geeni piirkonnas on seostatud skisofreeniaga (Holliday jt., 2009). *NEGR1* transkript on märgatavalt ülesreguleeritud skisofreeniapatsientide postmortaasles anterioorses prefrontaalkoores võrreldes tervete inimestega (Cox jt., 2016). Geenivariante *NEGR1* geenist ülesvoolu jäävates regulaator piirkondades on seostatud MDD tekkega (Hyde jt., 2016). Snieker jt. näitasid, et *NEGR1*-l võib olla seos intelligentsusega (Snieker jt., 2017). Genovese jt. tuvastasid õel ja vennal, kellel esines neuropsühhiaatrilisi ja käitumuslikke probleeme ning probleeme õppimisega, mikrodeletsiooni *NEGR1* geenis (Genovese jt., 2015). Veel on *NEGR1* seostatud vaimse puude, kõnelemisraskuste (Tassano jt. 2015), düsleksia (Veerappa jt., 2013) ning juveniilse müokloonilise epilepsiaga (Naseer jt. 2017).

Mitmed GWAS uuringud on näidanud, et *NEGR1* võib olla oluline lookus, mis on seotud ülekaalulisusega (Thorleifsson jt., 2009; Speliotes jt., 2010; Mägi jt., 2013). Willer jt. leidsid *NEGR1* geenist kolm SNP-d (rs3101336, rs2568958 ja rs2815752), mis paiknevad umbes 60 kb *NEGR1* geenist ülesvoolu ja mida nad seostasid kehamassiindeksiga. Samas piirkonnas on ka kaks deletsiooni: 10 kb pikkune ja 45 kb pikkune deletsioon, millel on samuti seos ülekaalulisuse tekkega. (Willer jt., 2009)

Katsed rakukultuuridega on näidanud, et *NEGR1*-l on oluline roll sünapside arvu reguleerimisel. *NEGR1* üleekspressioon vähendab tunduvalt sünapside arvu varajases staadiumis (3, 7 ja 14 päev) olevates rakukultuurides, aga samas tõstab sünapside arvu hilises staadiumis (21 ja 28 päev) olevates rakukultuurides. Lisaks leiti, et varajastes rakukultuurides ekspresseerub *NEGR1* peamiselt aksonitel ja presünaptilistes terminaalides ning hilisemates rakukultuurides ekspresseerub *NEGR1* peamiselt dendriitide postsünaptilistel ogadel (ingl *k postsynaptic spine*). *Western blot* analüüs näitab, et *NEGR1* ekspresseeritakse varajastes staadiumites üsna vähe, aga hilisemates kultuurides märgatavalt rohkem. Seega on *NEGR1* mõju sünapsidele sõltuvalt arengustaadiumist erinev. (Hashimoto jt., 2008)

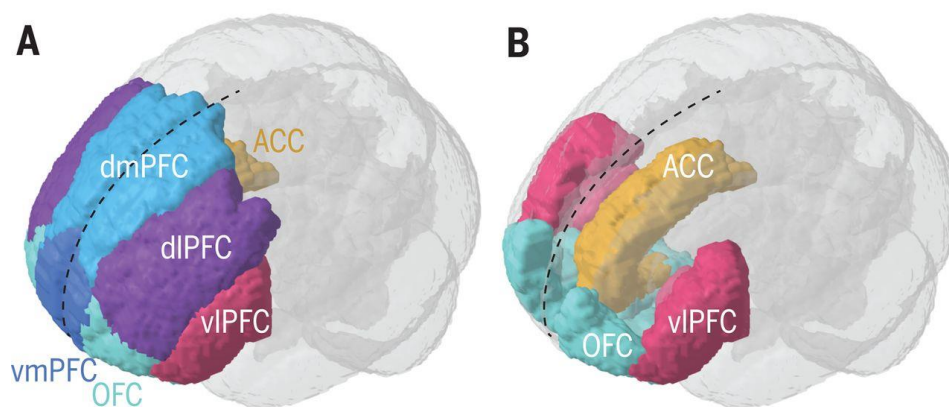
Veel on näidatud, et NEGR1 osaleb neuriitide väljakasvul ja nende hargnemisel. Pischedda jt. näitasid, et NEGR1 ekspressiooni supresseerimise tulemusena rakukultuurides *in vitro* tingimustel tekivad neuronid, millel on vähem neuriite kui kontrollidel ja tekkinud neuriidid on lühemad ja vähem hargnenud kui normaalsel rakul. Sarnast tulemust näidati ka *in vivo* katsetes hiirtega, kus oli vähenenud neuriitide ja nende väljakasvete arv ning vähenenud neuriitide pikkus. (Pischedda jt., 2014)

1.1.5. IgLON5

IGLON5 on kõige hiljutisemalt avastatud IgLON perekonna liige. Inimesel paikneb IGLON5 19q13.41 piirkonnas (NCBI 5). Hiirel ekspresseeritakse *Igln5* kõrgemalt ajutüves, taalamuses ja silmades ning madalamalt hipokampuses, *septum pellucidum*'is ja ajuripatsis (Vanaveski jt., 2017). IGLON5 on 336 aminohappe pikkune ja on kõige sarnasem OPCML (50%), NTM (48–49%) ja LSAMP-ga (46–47%) ning kõige vähem sarnane NEGR1-ga (41%). IGLON5-l, nagu kõigil IgLON-itel, on N-terminaalne signaalpeptiid, kolm paari tsüsteiinijääke ja kolm C2 tüüpi immunoglobuliini domeeni. (Vanaveski jt., 2017) Uuringud on näidanud, et *IGLON5*-l on seos unehäirete, kroonilise neurodegeneratsiooni ja rakupinna autoimmuunsusega. Unehäiretega patsientidel on tuvastatud IGLON5 vastased autoantikehad. (Sabater jt., 2014; Leypolt jt., 2015)

1.2. Prefrontaalkoor

Prefrontaalkoor moodustab inimese ajukoorest 29%. Prefrontaalkoor osaleb mitmetes kõrgemates kognitiivsetes funktsioonides nagu mõtlemine, argumenteerimine, planeerimine ja otsuste langetamine. (Funahashi 2017) Selleks, et neid funktsioone täita peab prefrontaalkoor saama infot ajupiirkondadelt, mis vastutavad sensorsete tajude, mälu ja emotsioonide eest. Prefrontaalkoor saab teavet mitmetelt kortikaalsetelt ja subkortikaalsetelt struktuuridelt ja saadab omakorda infot samadele struktuuridele. Sihtmärgiks on nii eksitatoorsed kui ka inhibitoorsed neuronid – muster, mis tõenäoliselt vastutab oluliste signaalide välja valimise ja ebaoluliste signaalide mahasurumise eest (Barbas jt., 2009). Anatoomia põhjal saab prefrontaalkoore jagada orbifrontaalkooreks (OFC, ingl k *orbifrontal cortex*), dorsolateraalseks prefrontaalkooreks (DLPFC, ingl k *dorsolateral prefrontal cortex*), ventrolateraalseks prefrontaalkooreks (VLPFC, ingl k *ventrolateral prefrontal cortex*) ja mediaalseks prefrontaalkooreks (MPFC, ingl k *medial prefrontal cortex*) (joonis 6) (Barbas jt., 2009).



Joonis 6. Inimese prefrontaalkoore anatoomia. dmPFC – dorsomediaalne prefrontaalkoor, dlPFC – dorsolateraalne prefrontaalkoor, vmPFC – ventromediaalne prefrontaalkoor, vlPFC – ventrolateraalne prefrontaalkoor, OFC – orbifrontaalkoor, ACC –anterioorne tsingulaarkoor, punktiir – sagitaalne keskjoon (Carlén, 2017).

Prefrontaalsed piirkonnad, mis on seotud keskse täidesaatva funktsiooniga on lateraalsed piirkonnad. Nendel piirkondadel on roll kognitiivsete funktsioonide juures, mis nõuavad informatsiooni valimist, väljaotsimist ja ajutist säilitamist piisavalt pikka aega, et sooritada vajalik ülesanne. Mediaal- ja orbifrontaalkoore posterioorsed osad kuuluvad limbilise süsteemi kortikaalsete komponentide hulka. Primaatide prefrontaalse limbilise piirkonna kahjustused mõjutavad emotsionaalset käitumist ja sotsiaalset suhtlust. Limbilise süsteemi prefrontaalsel komponentidel on tugevad sidemed ülejäänud prefrontaalkoorega, andes anatoomilise aluse radadele, mis on seotud kognitiivsete ja emotsionaalsete protsessidega. (Barbas jt., 2009) Uuringud on näidanud, et antisotsiaalne käitumine on seotud prefrontaalkoore struktuuri ja funktsiooni vähenemisega. Täpsemalt on seostatud suurenenud antisotsiaalset käitumist parema OFC ja vasaku DLPFC struktuuralse ja funktsionaalse vähenemisega (Yang jt., 2010). Veel on näidatud, et DLPFC kahjustused põhjustavad probleeme planeerimise, tähelepanu suunamise, otsuste tegemise ja püsiva vastusega (Manes jt., 2002). Funktsionaalsed uuringud on näidanud DLPFC langenud metaboolset aktiivsust agressiivsetel Alzheimeri tõbe põdevatel patsientidel (Hirono jt., 2000) ja ka agresiivsetel epilepsiat põdevatel lastel (Juhász jt., 2001). Funktsionaalne magnetresonantstomograafia (fMRI, ingl k *functional magnetic resonance imaging*) uuring on näidanud ebanormaalset DLPFC funktsioneerimist antisotsiaalse isiksushäirega (APD, ingl k *antisocial personality disorder*) patsientidel nii emotsionaalsete (Schneider jt., 2000) kui ka inhibitoorsete ülesannete lahendamisel (Völlm jt., 2004). Mitmed uuringud on näidanud, et prefrontaalkoorel võib olla seos skisofreenia tekkega (Soares ja Mann, 1997; McCarely jt., 1999). Oluline on juba prefrontaalkoore areng looteas. Näiteks on võimalik, et ema poolsed infektsioonid, mis põhjustavad tsütokiini radade aktivatsiooni, võivad häirida normaalset

neuraalsete eellasrakkude sümmeetrilist jagunemist ja seega häirida normaalset kortikaalset arengut (Stolp jt. 2011). Dorsolateraalne prefrontaalkoor on viimane korteksi piirkond, mis hakkab kortikaalplaadist arenema ja samuti lõpetab viimasena küpsemise ja saavutab täiskasvanule omase struktuuri. (Selemon ja Zecevic, 2015) Uuringud on näidanud, et prefrontaalkoore sünapside vähenemine jätkub ka kolmekümnendates eluaastates (Petanjek jt., 2011). Sünapside eemaldamise käigus eemaldatakse eksitatorseid sünapseid ja seega on see protsess väga oluline, et täiskasvanu korteksis oleks õige eksitatorsete ja inhibitorsete sünapside tasakaal. Arvatakse, et häired eksitatorsete ja inhibitorsete sünapside tasakaalus mängivad rolli psühhiaatriliste haiguste, sh skisofreenia, tekkes. (Selemon ja Zecevic, 2015)

1.3. Skisofreenia

Skisofreenia on keerulise etioloogiaga raske neuropsühhiaatiline häire, mis mõjutab ligikaudu 1% maailma elanikkonnast (21 miljonit inimest) (WHO; Costain jt., 2012). Perekondlikud uuringud on näidanud, et skisofreenial on kõrge pärilikkus (80%) (Mäki jt., 2005) ja genoomiüleste assotsiatsiooniuuringutega on tehtud kindlaks mitmeid kromosoomaalseid lookuseid, mis võiksid olla seotud skisofreenia tekkega (Stefansson jt., 2009; Purcell jt., 2009; Yue jt. 2017). Tõendid GWAS uuringutest ja valguekspressiooni uuringutest, mis on leidnud muutuseid valkude ekspressioonis skisofreeniapatsientidel näitavad, et enamus patofüsioloogilisi protsesse, mida on näidatud skisofreeniapatsientidel, on seotud neuraalse transmissiooni, sünapside küpsemise ja plastilisuse, neuriitide väljakasvu ning neurogeneesiga (Hosak jt., 2012; Nascimento jt., 2015; Singh jt., 2018).

Skisofreenia sümptomid jagatakse tavaliselt kolme kategooriaase. Positiivseteks sümptomiteks loetakse selliseid käitumuslikke tunnuseid, mis skisofreeniapatsientidel esinevad aga tervetel isikutel mitte. Positiivsete sümptomite hulka kuuluvad hallutsinatsioonid (kõige sagedamini kuulmishallutsinatsioonid), paranoia ja pettekujutelmad. (Need jt., 2009) Negatiivseteks sümptomiteks loetakse selliseid käitumuslikke tunnuseid, mis skisofreeniapatsientidel puuduvad aga tervetel isikutel on olemas. Negatiivsete sümptomite hulka kuuluvad huvide ja rõõmutunde kadumine (apaatia, anhedoonia) ja sotsiaalne eemaldumine. (Sarkar jt., 2015) Kolmadaks kategooriaks on kognitiivsed sümptomid. Kognitiivsete sümptomite alla kuuluvad probleemid tähelepanuvõimega, raskused mälu, raskused probleemide lahendamisel ja info töötlemisel ning raskused otsuste langetamisel. Skisofreeniapatsientide ravimiseks kasutatakse tänapäeval antipsühhootikume. Antipsühhootikumid suudavad üsna hästi alla suruda positiivseid sümptomeid aga negatiivsed

ja kognitiivsed sümptomid antipsühhootikumide ravile nii hästi ei allu. Üks võimalik viis skisofreenia ravi parandamiseks on teha kindlaks geneetilised riskifaktorid, mis võivad selgitada haiguse patofüsioloogilisi aluseid ja olla molekulaarsel tasemel abiks ravi leidmisel. (Need jt., 2009)

Meestel esineb skisofreenia sagedamini (12 miljonit) kui naistel (9 miljonit) (WHO). McGrath jt. leidsid, et meestel esineb haigus 1,4 korda sagedamini kui naistel (McGrath jt., 2004). Meestel saab skisofreenia tavaliselt alguse varajases täiskavanueas (vanuses 18–24), naistel saab haigus üldiselt alguse umbes 4 aastat hiljem (WHO). Naistel on haigusel ka teine märgatav haripunkt vanuses 45–50, mida seostatakse menopausi ja östrogeeni taseme langusega. Noorematel naistel on üldiselt haiguse kulg kergem ja nad alluvad paremini antipsühhootilistele ravimitele võrreldes menopausis olevate naistega. Uuringud on näidanud, et naistel on üldiselt negatiivsed sümptomid kergemad kui meestel ning neil esinevad pigem positiivsed ja afektiivsed sümptomid. Samuti vastavad naised paremini antipsühhootikumide ravile võrreldes meestega. (Gogos jt. 2015) Seega arvatakse, et östrogeenil on skisofreenia vastu kaitsvad omadused, aga rolli võivad mängida ka teised suguhormoonid nagu progesteron või luteiniseeriv hormoon. Hetkel pole veel kindlaks tehtud molekulaarseid mehhanisme, mille kaudu östogreen võiks skisofreeniat mõjutada, aga arvatakse, et östrogeen võib reguleerida kesknärvisüsteemi dopaminergilist süsteemi, mõjutades dopamiini retseptorite ja transporterite ekspressiooni ja funktsioneerimist. (Gogos jt., 2015)

Üheks suureks skisofreeniapatsientide enneaegse surma põhjuseks on enesetapud. Epidemioloogilised uuringud on näidanud, et skisofreeniapatsiendi hulgas on suitsiidsus kõrgem kui ülejäänud elanikkonna hulgas. Võrreldes tervete isikutega on skisofreeniapatsientidel 8,5 korda suurem risk sooritada enesetapp. Ligikaudu 40–50% skisofreeniapatsientidest on tunnistanud, et neil on elujooksul esinenud enesetapumõtteid, 20–50% skisofreeniapatsientidest on elujooksul püüdnud sooritada enesetappu ja ca 4–13% skisofreeniapatsientidest lõpetab oma elu enesetapuga. (Hor ja Taylor, 2010; Kasckow jt., 2011) Enamus enesetappe sooritatakse haiguse esimese 10 aasta jooksul ja 50% enesetappudest sooritatakse esimesel kahel aastal. Veel on näidatud, et mehed sooritavad enesetappe sagedamini kui naised, aga pole teada kas see tuleneb sellest, et meestel esinevad üldiselt raskemad sümptomid või sellest, et meestel saab haigus alguse varem kui naistel. Haiguse varasem algus ja raskemad sümptomid võivad viia madalama sotsiaalse ja ametialase võimekuseni. Lisaks on leitud, et mehed sooritavad üldiselt enesetapu nooremas eas kui naised. (Kasckow jt., 2011) Samuti on leitud seos suidsidaalsuse ja teatud ainete

kuritarvitamise vahel. On leitud, et skisofreeniapatsientidel, kes kuritarvitavad teatud aineid (narkootikumid, alkohol) on suurem risk sooritada enesetapp. (Gut-Fayand jt., 2001)

1.3.1. Skisoafektiivne häire

Skisoafektiivse häire puhul esinevad psühhiaatrilise haiguse ühe episoodi ajal nii afektiivsed kui ka skisofreenilised sümptomid. Skisoafektiivne häire jaguneb kaheks: maniakaalseks skisoafektiivseks häireks ja depresiivseks skisoafektiivseks häireks. Maniakaalse skisoafektiivse häire puhul esinevad ühe ja sama haigusepisoodi ajal nii maniakaalsed kui ka skisofreenilised sümptomid. Võib esineda ebanormaalne meeleolu tõus, millega kaasnevad kõrgeenenud enesehinnang ja suurusmõtted, vahel võib esineda kõrgeenenud erutus või ärevus, millega võib kaasuda agressiivne käitumine ja tagakiusamismõtted. Depressiivse skisoafektiivse häire puhul esinevad haiguse ühe ja sama episoodi käigus nii skisofreeniale kui ka depressioonile iseloomulikud sümptomid. Selle vormiga võivad kaasuda unehäired, energia, isu ja kehakaalu langus, normaalsete huvide vähenemine, keskendumisvõime alanemine, süütunne, lootusetustunne, enesetapumõtted. Samal ajal võivad esineda ka skisofreeniale omased sümptomid: näiteks võib isik arvata, et ta mõtted levivad või neid segatakse või võõrad jõud püüavad teda juhtida. Indiviid võib arvata, et teda jälgitakse või ta võib kuulda hääli, mis on laimavad ja võivad rääkida tema tapmisest või arutavad omavahel tema käitumist. Depressiivse vormi puhul on episoodid tavaliselt vähem ägedad ja teisi vähem häirivad kui maniakaalse vormi puhul, kuid depresiivse vormi puhul kestavad episoodid tavaliselt kauem kui maniakaalse vormi puhul. (RHK-10 – Rahvusvaheline Haiguste Klassifikatsiooni 10. versioon). Skisoafektiivne häire esineb umbes 0,5–0,8% populatsioonist. Erinevalt skisofreeniast esineb skisoafektiivne häire sagedamini naistel kui meestel, aga sarnaselt skisofreeniaga saab meestel see üldiselt alguse nooremas eas kui naistel. (Malhi jt., 2008)

1.3.2. Skisofreeniaga seostatud geneetilised faktorid

Kuigi ei ole suudetud tuvastada kõiki geene, mis on seotud skisofreenia etioloogiaga, on kliiniliste uuringute käigus leitud mitmeid geneetilisi muutusi, mis võiksid olla seotud skisofreenia tekkega (Koob jt., 2010). Kaksikute, adopteerimiste ja perekonna uuringud pakuvad tõendeid selle kohta, et geneetilised faktorid on skisofreenia tekkel olulised. Uuringud on näidanud, et skisofreenial on kõrge päritavus, mis jääb vahemikku 73–90% (Sullivan jt., 2003). Erinevate uuringutega on leitud mitmeid kandidaatgeene, mis võiksid olla

seotud skisofreenia etioloogiaga. Peamiselt on need geenid, mis mängivad rolli neuraalses arengus, nagu näiteks aju struktuuride ja neurotransmitter süsteemide (serotonergiline-, glutamaatergiline-, dopaminergiline süsteem) arengus. (Mäki jt., 2005) GWAS uuringud on aidanud tuvastada mitmeid skisofreenia riskialleele (Ripke jt., 2013). On näidatud, et skisofreenia jagab samu riskialleele mitmete teiste psühhiaatriliste häiretega, nagu näiteks bipolaarne häire (BPD, ingl k *bipolar disorder*), depressioon (MDD, ingl k *major depressive syndrome*) autismispektri häired (ASD, ingl k *autism spectrum disorder*) ja aktiivsus- ja tähelepanuhäired (ADHD, ingl k *attention deficit hyperactivity disorder*) (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013).

Skisofreeniapatsientidel on tuvastatud mitmeid CNV-sid, mis võivad olla kas deletsioonid või duplikatsioonid (The International Schizophrenia Consortium, 2008). Enamik skisofreeniaga seotud CNV-sid on suured ja korduvad, mis tähendab, et mitmed mutatsioonid on tekkinud genoomil täpselt samasse või peaaegu samasse kohta. Korduvad CNV-d külgnevad tavaliselt korduvate genoomsete elementidega nagu näiteks madala koopia kordused (LCR, ingl k *low copy repeat*), mis tekitavad mutatsioone läbi mittealleelse homoloogilise rekombinatsiooni. (Rees jt., 2015) On näidatud, et skisofreeniaga seotud CNV-d tõstavad samuti mitmete teiste neuropsühhiaatriliste häirete tekkeriski (Kirov jt., 2014). Näiteks skisofreeniaga seotud deletsioonid piirkonnas 15q11.2 (Kovel jt., 2010) ja 15q13.3 (Helbig jt., 2009) on lisaks seotud ka epilepsia tekkega ja duplikatsioonid piirkonnas 16p13.11 on lisaks skisofreeniale seotud ka ADHD tekkega (Williams jt., 2010).

GWAS uuringute abil on suudetud tuvastada mitmeid SNP-sid, mis võiksid olla seotud skisofreenia tekkega. PGC (ingl k *Psychiatric Genetics Consortium*) viis läbi uuringu, mis hõlmas endas umbes 36 989 juhtumit ja 113 075 kontrolli. Uuringu käigus leiti 108 lookust, mis sisaldasid SNP-sid, mida seostati skisofreenia tekkega. Aga need on kõigest väike osa kõigist SNP-dest, mis võiksid panustada skisofreenia tekkesse. (Ripke jt., 2014) Kokku võiks olla ligikaudu 8300 sellist SNP-d, mis sõltumatult panustavad skisofreenia tekkesse ja mis kõik koos seletavad ära umbes 50% skisofreenia geneetilisest eelsoodumusest. (Ripke jt., 2013)

1.3.3. Skisofreeniaga seostatud keskkonnafaktorid

Skisofreenia väljakujunemisel ja tekkel mängivad olulist osa ka keskkonnafaktorid. Samas nende panust skisofreenia tekkesse on mitmetel põhjustel keeruline kindlaks teha. Esiteks, mõjutavad mitmed faktorid isikut juba pikka aega enne haiguse avaldumist ja tihti on kõige

olulisem periood just sünnieelne periood, kus keskkonnafaktorid mõjutavad haiguse kujunemist. Teiseks põhjuseks on see, et keskkonnafaktorid on vähem piiritletud, kui näiteks geneetilised faktorid. (Koob jt., 2010) Näiteks neil emadel, kes olid rasedad 1944 aasta nn Hollandi nälja talve ajal, on järglastel suurenenud risk skisofreenia väljakujunemiseks (Franzek jt., 2008) kuna alatoitumine on üheks skisofreeniat kujundavaks riskiteguriks. Samas nälgimine suurendab ka stressi ja lisaks on ka oluline mida söödi. Seega ei saa kindlalt ja üheselt väita, et millised keskkonnatingimused täpselt suurenenud skisofreenia riski võivad põhjustada. On oluline märkida, et skisofreenia tekib tõenäoliselt keskkonnafaktorite ja geneetiliste faktorite koosmõjul. Seega on keeruline uurida isoleeritult ainult keskkonnafaktoreid. (Koob jt., 2010)

Üheks keskkonnateguriks, mis võib suurendada skisofreenia tekkeriski on isa vanus. Sipos jt. näitasid, et nende valimi puhul 15,5% skisofreenia juhtudest võisid olla põhjustatud sellest, et isa oli nende sünnihetkel vanem kui 30 aastat. (Sipos jt., 2004) Samuti näitasid Malaspina jt., et skisofreeniapatsientidel oli isa vanus tunduvalt kõrgem kui uuringus olnud tervete isikute isadel (Malaspina jt., 2002).

Üha enam tõendeid näitavad, et prenataalsed infektsioonid, nagu näiteks gripp, punetised, herpes (HSV-2, ingl k *herpes simplex virus*) ja toksoplasmoos, võivad panustada skisofreenia etioloogiasse. Prenataalne kokkupuude punetistega toimib kesknärvisüsteemile teratogeenselt, mistõttu võib põhjustada lapseea psühhiaatrilisi häireid. Brown jt. uurisid isikuid, kelle ema oli raseduse ajal põdenud punetisi ja näitasid, et 20% isikutest, kellel oli prenataalselt kokkupuude punetistega, oli täiskasvanuna diagnoositud skisofreenia. (Brown jt., 2001) Veel on näidatud, et kui ema põeb raseduse keskel või lõpus grippi, siis on lapsel 3-korda suurenenud risk selleks, et tal elu jooksul kujuneb välja skisofreenia ning kui ema põeb grippi peale esimest trimestrit siis on 7-korda suurem oht, et lapsel kujuneb kunagi hilisemas elus välja skisofreenia (Brown jt., 2004). Lisaks on näidatud, et neuronaaalsele arengule võib negatiivset mõju avaldada ja lõpuks skisofreenia tekkeni viia ema immuunreaktsioon, mis tekib vastusena infektsioonidele. Mitmed uuringud on näidanud, et emapoolsete tsütokiinide taseme tõusul võib olla roll skisofreenia tekkes. (Buka jt., 2001; Brown jt., 2004) Brown jt. näitasid, et emapoolse interleukiin-8 taseme tõus teisel/kolmandal trimestril on seotud skisofreenia tekkega (Brown jt. 2004).

Mitmed uuringud on näidanud, et kanepi tarvitamine tõstab riski skisofreenia väljakujunemiseks (Zammit jt., 2002) Kanepi tarvitajatel kujuneb haigus välja keskmiselt 2,7 aastat varem kui kanepit mitte tarvitavatel isikutel (Large jt., 2011). Lisaks on leitud seos

vanuse vahel, millal hakati kanepit tarvitama ja vanuse vahel, millal skisofreenia alguse sai. (Leeson jt., 2012; Stefanis jt., 2013). Veel on leitud, et kanepi tarvitamisel võib olla suurem mõju naistele kui meestele (Donoghue jt., 2014). Siiski pole päris selge, kas kanep otseselt tõstab psühhootiliste tekkeriski või samad geenid, mis suurendavad psühhootiliste tekkeriski suurendavad ka riski tarbida kanepit. Näiteks uuriti 2082 indiviidi ja näidati seost skisofreenia riskialleelide ja kanepi tarvitamise vahel. Tulemus oli statistiliselt oluline nii siis, kui võrreldi omavahel neid, kes on elujooksul tarvitanud kanepit ja neid, kes seda kunagi teinud ei ole ($p=2,6 \times 10^{-4}$), kui ka siis, kui võrreldi kanepi tarvitajaid omavahel sõltuvalt tarvitatud kanepi kogusest ($p=3,0 \times 10^{-3}$). Seega näidati, et osa skisofreenia ja kanepi tarvitamise vahelisest seosest tuleneb jagatud geneetilist etioloogiast. (Power jt., 2014)

1.3.4. Mudelid skisofreenia uurimiseks

Kasutusel on mitmeid erinevaid loomudeleid, mille abil skisofreeniat uuritakse. Kasutatakse farmakoloogilisi- (dopamiin, glutamaat, serotoniin, γ -aminovõihape (GABA, ingl k *gamma-aminobutyric acid*), kahjustuste- (neonataalne ventraalne hipokampuse kahjustus), arengulisi- (sotsiaalne isolatsioon, MAM – metüülasoksümetanoolatsetaat, ingl k *methylazoxymethanol acetate*) ja geneetilisi mudeleid (DISC1 (ingl k *Disrupted in schizophrenia*), neuregulin 1 ja sellega seotud geenid, düsbindiin, reelin). Farmakoloogilistest mudelitest kasutatakse nt dopamiini mudelit, kus amfetamiini manustamine hiirtele/rottidele põhjustab muutuseid dopaminergilises süsteemis ning tekivad skisofreenia positiivsetele sümptomitele sarnased sümptomid. Antud meetodiga ei ole suudetud saavutada negatiivseid ega kognitiivseid sümptomeid. Veel kasutatakse farmakoloogilistest mudelitest glutamaadi mudelit, kus kasutatakse fentsükliidiini (PCP, ingl k *phencyclidine*). PCP on glutamaadi N-metüül-D-aspartaadi (NMDA, ingl k *N-methyl-D-aspartate*) retseptori antagonist. PCP kasutamine põhjustab hiirtele/rottidel hallutsinatsioone ja pettekujutelmaseid, lisaks põhjustab PCP nii hiirtele kui rottidel muutuseid sotsiaalses käitumises ja kognitiivseid häireid. Kahjustuste mudeli puhul kahjustatakse hiirtele/rottidel mõnda aju piirkonda, mille kahjustusi on näidatud skisofreeniapatsientidel (prefrontaalkoor, hipokampus, taalamus) ja saavutatakse seeläbi skisofreeniale omased sümptomid. Serotoniini ja GABA mudeli puhul kasutatakse samuti nende retseptorite antagoniste. (Jones jt., 2011) Arengulistes mudelitest kasutatakse MAM mudelit, kus tiineid hiiri/rotte süstitakse MAM-ga, see põhjustab poegadel häireid neuraalses arengus. MAM sihtmärgiks on kesknärvisüsteemi neuroblastid. MAM efekt on sõltuv tiinuspäevast, millal seda kasutatakse, kuna MAM inhibeerib nende piirkondade arengut, mis arenevad antud hetkel kõige kiiremini. Kui rottidel kasutada MAM-i 17. tiinuspäeval, siis

tekivad poegadel mitmed kognitiivsed ja anatoomilised muutused (vähenenud hipokampus, taalamus ja mitmed korteksi piirkonnad, samuti on vähenenud kogu aju kaal ca 11% võrra), mis on iseloomulikud skisofreeniale (Flagstad jt., 2004). Sotsiaalse isolatsiooni mudeli puhul pannakse pojad peale rinnapiimast võõrdumist eraldi puuridesse, mis põhjustab neil püsivaid muutuseid käitumises ja neuraalses arengus (Lukkes jt., 2009). Geneetiliste mudelite puhul kasutatakse geneetiliselt modifitseeritud hiire liine. Geneetilistest mudelitest kasutatakse nt DISC1 *knockout* mudelit. DISC1 oli üks esimestest geenidest, millel leiti olevat seos skisofreeniaga. DISC1 hiirtel on suurenenud lateraalvatsakesed ja osadel DISC1 mutantidel on toimunud muutused ka hipokampuses. Loodud on seitse erinevat DISC1 hiireliini. Mitmeid nimetatud mudelitest iseloomustavad muutused hiirte/rottide sotsiaalses käitumises, mis on üks olulistest skisofreeniale iseloomulikest sümptomitest. (Jones jt., 2011)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

- 1) Kirjanduse põhjal välja selgitada milliste erinevate fenotüüpidega on IgLON geenides asuvad SNP-d seotud.
- 2) Välja selgitada varem läbiviidud GWAS uuringute andmete alusel, kas mõni skisofreenia kujunemise riskiga seostatud lookus paikneb IgLON geenide lähedal.
- 3) Hinnata kõigi viie IgLON perekonna adhesioonimolekuli ekspressiooni taset skisofreeniapatsientide ja kontrollisikute dorsolateraalses prefrontaalkoores. Kinnitada kõige olulisemat muutust, NEGR1 tõusu ka valgu tasemel.
- 4) Välja selgitada kas IgLON perekonna geenide ekspressioon ja kaasuva depressioon, suitsidaalsuse ning psühhoaktiivsete ainete tarbimise vahel esineb seoseid.
- 5) Välja selgitada kas *Negr1* (IgLON perekonna liige, mille ekspressioon on oluliselt muutunud skisofreeniapatsientidel) väljalülitamine hiirtel põhjustab muutusi sotsiaalses käitumises.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Inimese IgLON geenide SNP-de analüüs

Selleks, et selgitada, milliste erinevate fenotüüpidega on inimestel IgLON geenides asuvad SNP-d seostunud, viidi läbi teemakohane kirjanduse analüüs. IgLON geenides asuvate SNP-de tuvastamiseks ja nende kohta info saamiseks kasutati andmebaase Pubmed, Ensembl, NCBI, SNPedia. Andmebaasides kasutati otsingusõnu „SNP”, „IgLON”, „LSAMP”, „NEGR1”, „NTM”, „OPCML”.

2.2.2. GWAS andmete analüüs.

Analüüsisiti viimase aja kõige suuremat skisofreenia riskilookuste GWAS metauuringut (Ripke jt. 2014). Antud uuringus uuriti 36 989 skisofreeniapatsienti ja 113 075 tervet indiviidi, uuringus osalesid mitmed töögrupid paljudest erinevatest riikidest sh ka Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu. Joonised (joonis 7–9) koostati kasutades Ricopili online andmebaasi, mis võimaldab visualiseerida huvipakkuvaid regioone selekteeritud GWAS andmestikes (<https://data.broadinstitute.org/mpg/ricopili/>). Joonistele lisati oluliste eQTL (ingl k *expression quantitative trait loci*) lookuste asukohad. Need eQTL lookused tähistavad SNP-sid, mille kohta on näidatud, et nende variandid seostuvad statistiliselt oluliselt lähedal asuva geeni ekspressiooniga DLPFC piirkonnas (Fromer jt., 2016). See annab aluse oletada, et need SNP-d asuvad vastava geeni regulaatoralas. Info eQTL lookuste kohta saadi Fromer jt. (2016) katse tulemusi koondavast online andmebaasist, mis asub online aadressil: <https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn2759792/wiki/69613>

2.2.3. Inimeste valim ja koeproovid

Inimeste DLPFC koeproovid saadi New South Walesi ajupankade Ühenduselt (ingl k *New South Wales Brain Bank Network*, (<https://nswbrainbank.org.au/>). Uuringus kasutati 37 skisofreeniapatsiendi (seal hulgas 7 skisoafektiivse häirega patsiendi) ja 37 kontrollindiviidi postmortaalseid DLPFC proove. Skisofreeniapatsiendid olid diagnoositud vastavalt DSM-4le (ingl k *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*). Uuringus kasutatud valimi detailse kliinilise ja demograafilise kirjelduse on avaldanud Weicker jt. (2010). Surmaeelne antipsühhootikumide ravi standardiseeriti kõigil patsientidel elu jooksul kasutatud kloorpromasiini ühikutesse, et oleks võimalik võrrelda erinevaid antipsühhootikume saanud patsientide elu jooksul manustatud ravimi kogust. Antidepressantide ravi ajalugu näidati ka

kvalitatiivsel skaalal (jah/ei). Kuusteist patsienti oli minevikus tarvitanud psühhoaktiivseid aineid: kanepit (n=10), amfetamiini (n=4), opiaate (n=3), lüsergiinhappe dietüülamiidi (LSD, ingl k *lysergic acid diethylamide*) (n=5) või muud täpsustamata hallutsinogeeni (n=1). Mitmed patsiendid kasutasid kahte või anamat erinevat narkootikumi. Antud inimeste grupi kasutamise kiitsid heaks inimuuringute eetika komiteed Wollgongi Ülikoolist (HE99/222) ja New South Walesi Ülikoolist (HREC07261). Aju poolkerade uuringuks koguti koeproovid seitsmelt tervelt meessoost indiviidilt, kelle keskmine vanus oli $50,85 \pm 8,27$ aastat. Proovid kogusid Tartu Ülikooli patoloogilise anatoomia ja kohtuarstiteaduste osakond ning Eesti Kohtuekspertiisi Instituut. DLPFC proovid dissekteeriti kvalifitseeritud patoloogide poolt Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee nõusolekul (223/T-4).

2.2.3.1. qPCR

RNA eraldamiseks kasutati Trizol reagenti (Invitrogen) ning cDNA sünteesiks kasutati Random Hexamer (Applied Biosystems) ja SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) reagente vastavalt tootja protokollile. IgLON perekonna geenide poolt kodeeritavate transkriptide ekspressiooni tase DLPFC kvantifitseeriti qRT-PCR-iga. *LSAMP*, *OPCML* ja *NTM* transkriptide tuvastamiseks disainiti 1a *forward* praimerid 1a eksonile ja 1b *forward* praimerid 1b eksonile (lisa 2 tabel 7). *OPCML*, *LSAMP* ning *NTM* eksonite 1a ja 1b korral kasutati universaalset sondi ja universaalset *reverse* praimerit (lisa 2 tabel 7). Referentsgeenina kasutati *HPRT*, mille efektiivsus ja stabiilsus frontaalkoores on eelnevalt tõestatud (Raud jt., 2009). Geeniekspressiooni läbiviimisel kasutati järgnevat segu: 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] ja TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) reagenti. Kvantitatiivne reaalaja-PCR viidi läbi ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) ja ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel. Reaktsiooni maht oli 10 µl ja igast proovist villiti neli kordust. Nii *OPCML*-i, *NTM*-i, *LSAMP*-i kui *NEGR1* transkriptide ekspressiooni tase mõõdeti FAM-märgistatud MGB-sondiga ja standardiseeriti koduhoidja geeni *HPRT* VIC-TAMRA sondi suhtes. Andmed analüüsiti ja teisendati $2^{-\Delta\Delta CT}$ kujule (Livak ja Schmittgen, 2001). Kuna nii patsientide grupis kui ka kontrollgrupis üks proov ei toiminud kasutati geeniekspressiooni analüüsil 36+36 isiku cDNA proove.

2.2.3.2. Western blot

Dissekteeritud ajuosaga eppendorf'i tuubid pandi koheselt vedellämmastikku ning säilitati kuni valgu eraldamiseni -80°C juures. Valgu eraldamiseks kasutati jääkülma RIPA (ingl k *radioimmunoprecipitation assay*) puhvrit (Thermo Fisher Scientific) koos proteaasi inhibiitoriga (1x) (Thermo Fisher Scientific). DLPFC koeproovid sonikeeriti ja tsentrifuugiti (Thermo Scientific Heraeus Fresco 17, 24 x 1,5/2,0 ml rootor ClickSeal kaanega) 10 min 12 000 g 4°C juures. Supernatant koguti kokku ja valgu konsentratsioon määrati BCA (ingl k *bicinchoninic acid assay*) meetodil (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). BCA meetod põhineb värvusreaktsioonil, mille käigus reageerivad valgu peptiidsidemed vaseioonidega. Reaktsiooni käigus redutseeritakse Cu^{2+} ioonid Cu^{1+} ionideks ning viimane on proportsionaalne valgu hulga lahuses. Vase katiooni (Cu^{1+}) tuvastamiseks kasutati bitsiinhoniinhapet (BCA) sisaldavat reagenti. Kahe BCA molekuli kelatatsiooni käigus ühe vase katiooniga muutub lahuse värvus lillaks ning värvuse intensiivsus on vastav valgu hulgale lahuses. Polüakrüülamiidgeeli radadele kanti võrdses koguses valku (20 μg). Valguproovid eraldati geelelektroforeesil, millele järgnes valkude ülekandmine nitrotselluloosmembraanile, kasutades NuPAGE elektroforeesi süsteemi (Life Technologies). *Western blot* analüüsis blokeeriti membraane üks tund 3% lõssipulbriga PBS-i lahuses. Pärast seda inkubeeriti membraane 3% lõssipulbri PBS-0,1% Tween-20-s primaarsete antikehadega üleöö 4°C juures. Järgmisel päeval pesti membraane 6 korda Milli-Q veega ning inkubeeriti PBS-0,1% Tween-20-s vastava fluorokroomiga konjugeeritud sekundaarse antikehaga 1 tund toatemperatuuril. Sellele järgnes uuesti membraani pesu 6 korda Milli-Q veega ning 20 min PBS-0,1% Tween-20-ga. Proovid visualiseeriti kasutades LI-COR Odyssey CLx süsteemi (LI-COR Biotechnologies). Pildid muudeti must-valgeks ning kvantifitseeriti Image Studio Lite 3.1.4 programmiga (LI-COR Biotechnologies).

Primaarsed antikehad, mida kasutati: hiire anti-NEGR1 (1:1000) (sc-393293, Santa Cruz), hiire anti-NTM (1:1000) (sc-390941, Santa Cruz), küüliku anti-GAPDH antikeha (1:10,000) (247002, Synaptic Systems).

Sekundaarsed antikehad, mida kasutati: Alexa Flour 790 fluorokroomiga konjugeeritud küüliku IgG vastane kitses tehtud sekundaarne antikeha (1:40000) (711-655-152, Jackson ImmunoResearch) ja Alexa Flour 680 fluorokroomiga konjugeeritud hiire IgG vastane kitses tehtud sekundaarne antikeha (1:5000) (A21057, Invitrogen).

2.2.4. *Negr1* puudulikkuse uurimine hiirmudelil

2.2.4.1. Katseloomad

Katses kasutatud hiired pärinesid Freiburgi Ülikoolist Saksamaalt ja esimest korda kirjeldasid neid Lee jt. (2012). Selleks, et uurida *Negr1* inaktiveerimise tulemusi *in vivo*, loodi *Negr1* puudulikkusega hiireliin. Hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes asendati *Negr1* geenis ekson 2, mis kodeerib esimest Ig-domeeni ja 3'eksoni/introni splaissaiti, neomütsiini resistentsuskassetiga. *Negr1*^{-/-} alleel viidi homoloogilise rekombinatsiooni abil embrüonaalsetesse tüvirakkudesse. Saadud embrüonaalseid tüvirakke kasutati, et luua kimäärsed hiired, mida ristati C57BL/6J hiireliiniga. (Lee jt., 2012) Oma katses kasutasime nii *Negr1*^{-/-} kui ka metsiktüüpi (*Negr1*^{+/+}) (WT, ingl k *wild type*) hiirtena 2–3 kuu vanuseid isaseid F2 hübriide [(129S5/SvEvBrd×C57BL/6) × (129S5/SvEvBrd×C57BL/6)]. Sellist geneetilist tausta kasutatakse Tartu Ülikooli Bio-ja Siirdemeditiini Instituudis standardina. Kombineeritud taust pakub usaldusväärset efekti, kuna eemaldatud on enamus tüvespetsiifilisi efekte, mis on põhjustatud homosügootsete lookuste poolt. Katsetes kasutatud *Negr1*^{-/-} ja WT hiired olid pesakonnakaaslased. Hiirte genotüpiseerimiseks kasutati genoomset PCR-i ja mutantse alleeli puhul kasutati järgnevaid primereid: *forward* 5'CTC CTG CCG AGA AAG TAT CCA TC 3'; *reverse* 5'CAC TGC AGA AGG CAA CAA TC 3' ning saadi 1,5 kb pikkune amplikon, WT alleeli puhul kasutati järgnevaid primereid: *forward* 5'GCA GAC AAC ACA TAC ATG TAT AGG 3'; *reverse* 5'GTT GTG AAT TGT GAG TGG TAA CTC 3' ning saadi 200 bp pikkune amplikon.

Katseloomad elasid standardsetes loomapuurides (42,5 x 26,6 x 15,5 cm). Ühes puuris elas 10 looma. Puurides kasutati haavapuidust allapanu (2 cm kiht) ning haavapuidust pesamaterjali (0,5 l). Allapanu ja pesamaterjali vahetati iga nädal. Loomi hoiti temperatuuril 22±1°C ja 12/12 valguse-pimeduse režiimil (kl 19 kustutati tuled). Toit ja vesi olid loomadele vabalt kättesaadavad. Kõik katsed viidi läbi koos vastavat luba omava isikuga. Kõik loomkatsed viidi läbi vastavalt Euroopa Ühenduste direktiivile (2010/63 / EL) ning kõikide eksperimentide korraldamiseks oli Eesti Vabariigi põllumajandusministeeriumi Loomkatseprojekti loakomisjoni luba (28. aprill 2014, nr 29).

2.2.4.2. Vurrude trimmimise hindamine

Selleks, et hinnata hiirte sotsiaalset käitumist kasutasime vurrude trimmimise (ingl k *barbering*) analüüsi. Varasemad uuringud on näidanud, et vurrude trimmimine viitab

dominantsele käitumisele ja näitab sotsiaalseid hierarhiat (Long, 1972; Strozik jt., 1981). Vurrude trimmimine kujutab endast puurikaaslaste vurrude lühemaks või täielikult ära närimist. Vurrude trimmimist hinnati kodupuuris olevatel kolme kuu vanustel isastel hiirtel. Vurrude trimmimise hindamiseks kasutati kolmeastmelist skaalat: vurrud puuduvad, osaliselt trimmitud vurrud ja trimmimata vurrud (joonis 14 A). Vurrude trimmimist hinnati 34 *Negr*-/- ja 33 WT hiirel.

2.2.4.3. Kolme kambri sotsiaalsustest

Hiirte sotsiaalse käitumise hindamiseks kasutati automaatset kolme kambriga puuri (joonis 13A). Test viidi läbi neljas staadiumis, mis kõik kestsid 10 minutit. Esimene staadium koosnes 5 minutilisest kohanemisperioodist isoleeritud puuris ja 5 minutilisest kohanemisperioodist keskmises kambri. Teine staadium oli 10 minutiline kohanemisperiood, kus kambri ukseid olid avatud, testhiir asetati keskmisesse kambris ja lasti tutvuda kõigi kolme kambriga. Kolmandas staadiumis pandi testhiir keskmisesse kambris (kamber 2) ning asetati samast soost ja sama vanune võõras hiir (võõras 1) väikese puuriga kas kambris 1 või 3, teise pandi lihtsalt tühi väike puur. Uksed avati ja testhiir sai vabalt liikuda kõigi kolme kambri vahel. Neljandas staadiumis vahetati võõras 1 asukohta (kas kamber 1 või 3) ja kambris, kus eelmises staadiumis oli võõras 1 asetati väike puur uue võõra hiirega (võõras 2). Uksed avati ja testhiir sai liikuda kõigis kolmes kambri. Kõik võõrad, keda kasutati olid samas vanuses mitte pesakonnakaaslastest isased WT hiired ja olid kohanenud puuriga eelmisel päeval (30 minutit kolm korda). Testi filmiti ja hiljem arvutati kui palju aega testhiir veetis igas kambri testi erinevates staadiumites.

2.2.5. Statistilised analüüsid

Statistilised analüüsid viidi läbi programmidega R – 3.3.2 ja IBM SPSS Statistics 23. Kõik qPCR tulemused teisendati lineaarsel skaalale $2^{-\Delta\Delta CT}$, kus ΔCT on meid huvitava geeni (FAM) ja koduhoidjageeni (VIC) tsüklite läve (CT, ingl *k cycle threshold*) vaheline erinevus. Tulemused väljendati keskmiste väärtustena koos keskvaertuse standardveaga (SEM, ingl *k standard error of the mean*). Oluliseks loeti p-väärtus alla 0,05 ($p < 0,05$).

Geeniekspressiooni analüüsimiseks kasutati mitteparameetrilisi teste, kuna geeniekspressiooni analüüsi tulemused ei olnud Shapiro Wilk testi kohaselt normaaljaotusega. Geeniekspressiooni taseme võrdlemiseks kahe grupi vahel, nagu diagnostiline grupp (patsient/kontroll), sugu (mees/naine) ja ajupoolkera (vasak/parem), kasutati Mann-Whitney

U testi. Lisaks kasutati Mann-Whitney *U* testi, et võrrelda geeniekspressiooni tasemete erinevusi patsientide grupi siseselt, kasutades binaarseid tunnuseid nagu antidepressantide ajalugu (jah/ei), depressiooni esinemine (jah/ei), enesetapukatsete ajalugu (jah/ei), surm enesetapu läbi (jah/ei). Geeniekspressiooni taseme võrdlemiseks rohkem kui kahe grupi vahel kasutati Kruskal-Wallis testi (nt kui uuriti ka skisoafektiivset häiret eraldi). Tamhanesi *post hoc* testi kasutati, et kindlaks teha gruppide keskmiste erinevused veel spetsiifilisemalt.

Spearmani korrelatsioone kasutati, et teha kindlaks kas koeproovi omadused (pH, RIN (ingl *k RNA integrity number*), surmajärgne intervall, aju kaal, ajumaht ja vanus surma ajal) on seotud geeniekspressiooni tasemega. Eraldi korrelatsiooni analüüsid viidi läbi skisofreeniapatsientide grupis (elu jooksu kasutatud kloorpromasiini kogus, vanus haiguse alguses ja haiguse kestus).

Kuna Spearmani korrelatsiooni analüüsi kohaselt olid osad faktorid seotud geeni transkriptide tasemega viidi läbi kovarieeruvuse analüüs (ANCOVA). ANCOVA analüüs teostati ainult *NTM 1b-le*, mille jaotus oli lähedane normaaljaotusele.

Hii-ruut testi kasutati, et võrrelda narkootikumide kasutamist patsientidel, kes olid sooritanud enesetapu või enesetapukatse patsientidega, kes seda ei olnud teinud. Binaarne logistilise regressiooni analüüs viidi läbi, et erinevate geeniekspressiooni tasemete järgi ennustada tõenäosust olla skisofreenik.

Kolme kambri sotsiaalsustesti tulemused esitati igas kambris veedetud aja keskmiste väärtustena (sekundites) koos SEM väärtustega. Tulemuste analüüsimiseks viidi läbi Student *t*-test. Sotsiaalse uudsuse testi tulemuste analüüsimiseks kasutati kahepoolset ANOVA testi. Selleks, et võrrelda vurrude trimmimist *Negr1*^{-/-} hiirtel ja metsiktüüpi hiirtel kasutati Hii-ruut testi.

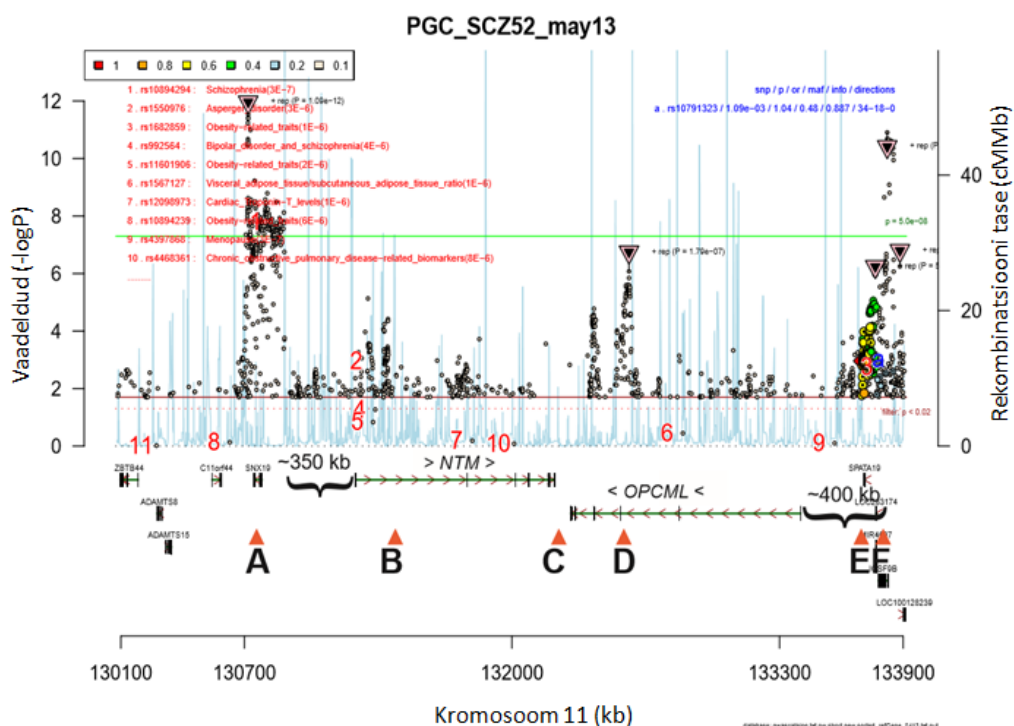
2.3. Tulemused

2.3.1. Inimese IgLON geenide SNP-de analüüs

Kirjanduse analüüsi alusel valmis tabel (lisa 1), kust on võimalik saada ülevaade, milliste erinevate fenotüüpidega on siiani läbi viidud assotsiatsiooniuuringud IgLON geenides asuvad SNP-d seostanud. Kokku leiti IgLON geenidest 108 SNP-d, mis seostuvad mõne spetsiifilise fenotüübiga. Kuigi valdavalt on leitud, et polümorfismid IgLON geenides on seotud psühhiaatriliste häiretega, on leitud seoseid ka väga laia spektri ajuga otseselt mitte seotud fenotüüpide ja häiretega.

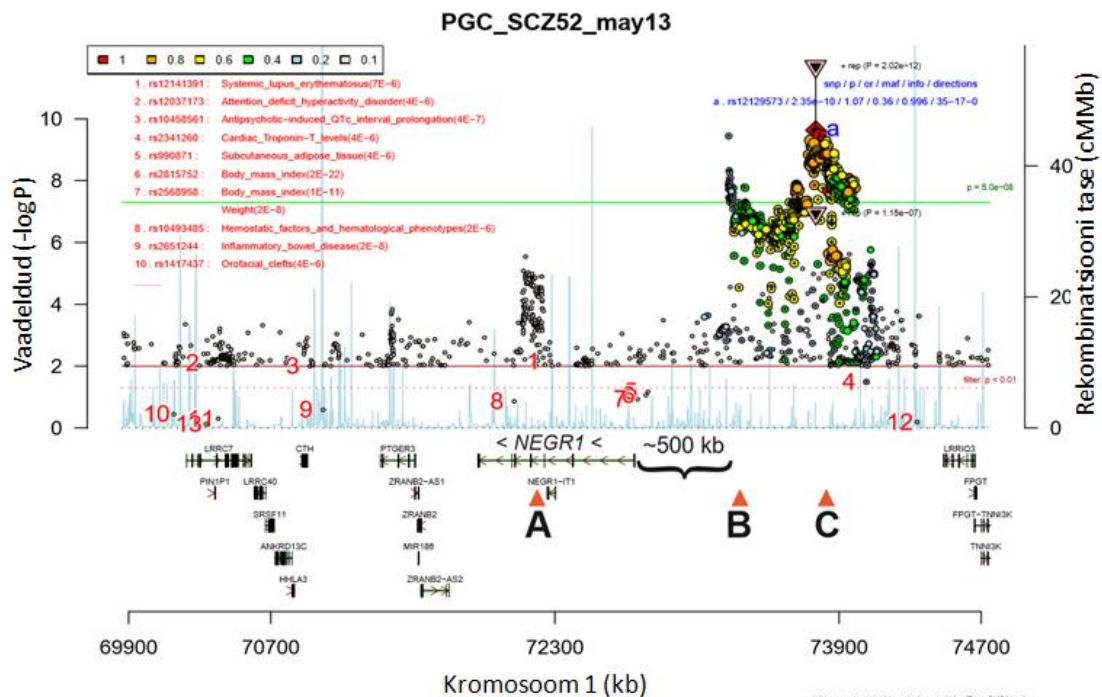
2.3.2. GWAS andmete analüüs

Leiti, et Ripke jt. (2014) poolt tuvastatud 108 kõige olulisemast skisofreeniariskiga seostatud lookusest kolm asuvad IgLON geenidest (*NEGR1* (joonis 8), *OPCML* ja *NTM* (joonis 7)) vähem kui 500 kb ülesvoolu.

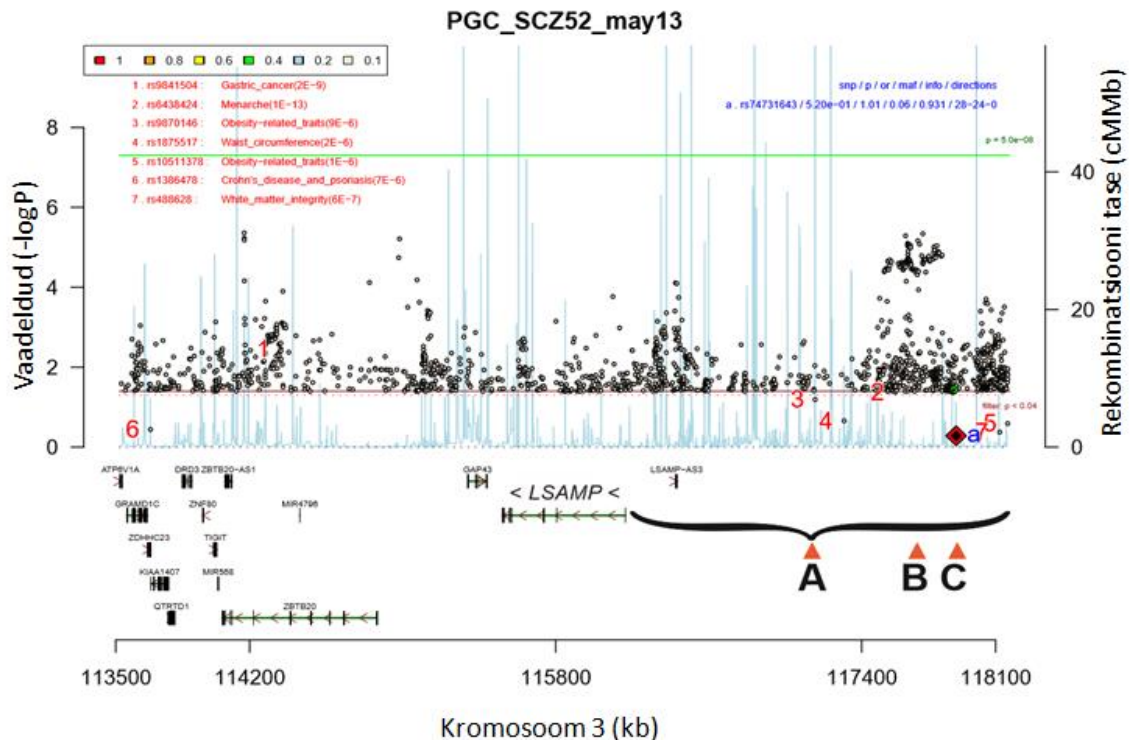


Joonis 7. *NTM* ja *OPCML*. A. Ripke jt. (2014) läbiviidud meta-analüüs näitas, et umbes 350 kb *NTM* geenist ülesvoolu jääb skisofreeniaga seotud lookus ($p \leq 5 \times 10^{-8}$), mis vastab Ripke jt. (2014) lisade tabelis 3 lookuse kohale 16. Siiski kõige kõrgem piik ($p=1,09 \times 10^{-12}$) jääb *NTM* geenist 500 kb ülesvoolu, kus paikneb teine geen (*SNX19*), seega pole *NTM* peamine kandidaat antud piirkonnas. B. SNP rs11222692 asukoht *NTM* geenis. Fromer jt. (2016), rs11222692 on eQTL, mis mõjutab *OPCML* ekspressiooni DLPFC-s. C. *NTM* ja *OPCML*

paiknevad üksteisest umbes 80 kb kaugusel, vastastikustes orientatsioonides. **D.** Ripke jt. (2014) kohaselt paikneb *OPCML* geenis skisofreeniaga seotud SNP rs2917569 ($p=1,79e^{-07}$). **E.** SNP rs10791323 asukoht, tegemist on eQTL-ga, mis mõjutab *OPCML* ekspressiooni DLPFC-s (Fromer jt. 2016). **F.** *OPCML* geenist umbes 400 kb ülesvoolu jääb oluline skisofreeniaga seotud lookus ($p=3,84e^{-11}$) (Ripke jt. 2014). Aga antud piik paikneb teises geenis (*IGSF9B*) ja seega *OPCML* pole esimene kandidaat antud piirkonnas. Samas asub antud piirkonnas *OPCML* ekspressiooni mõjutav eQTL rs10791323, mis näitab, et antud piirkond sisaldab *OPCML* geeni jaoks olulisi regulaator regioone. (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)



Joonis 8. NEGR1 A. Ripke jt. (2014) läbiviidud metaanalüüs näitab, et *NEGR1* geenis asub skisofreeniaga seotud lookus, kuhu on kuhjunud tavalisest suurem kogus skisofreeniaga seotud väga olulisi assotsiatsioone. Antud lookuse p-väärtus on umbes 10^{-6} , mis ei jõua statistiliselt olulise p-väärtuse tasemeni ($p \leq 5 \times 10^{-8}$). B. *NEGR1* geenist umbes 500 kb ülesvoolu paikneb skisofreeniaga seotud lookus, mille piigiks on rs35998080, mille p-väärtus on $3,59 \times 10^{-10}$, mis on statistiliselt oluline. C. Ca 1000 kb *NEGR1* geenist ülesvoolu jääb antud piirkonna kõrgeim piik, mille p-väärtus on $2,02 \times 10^{-12}$, mis vastab Ripke jt. (2014) lisades tabelis 3 lookuse kohale 21 (Ripke jt., 2014) (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)



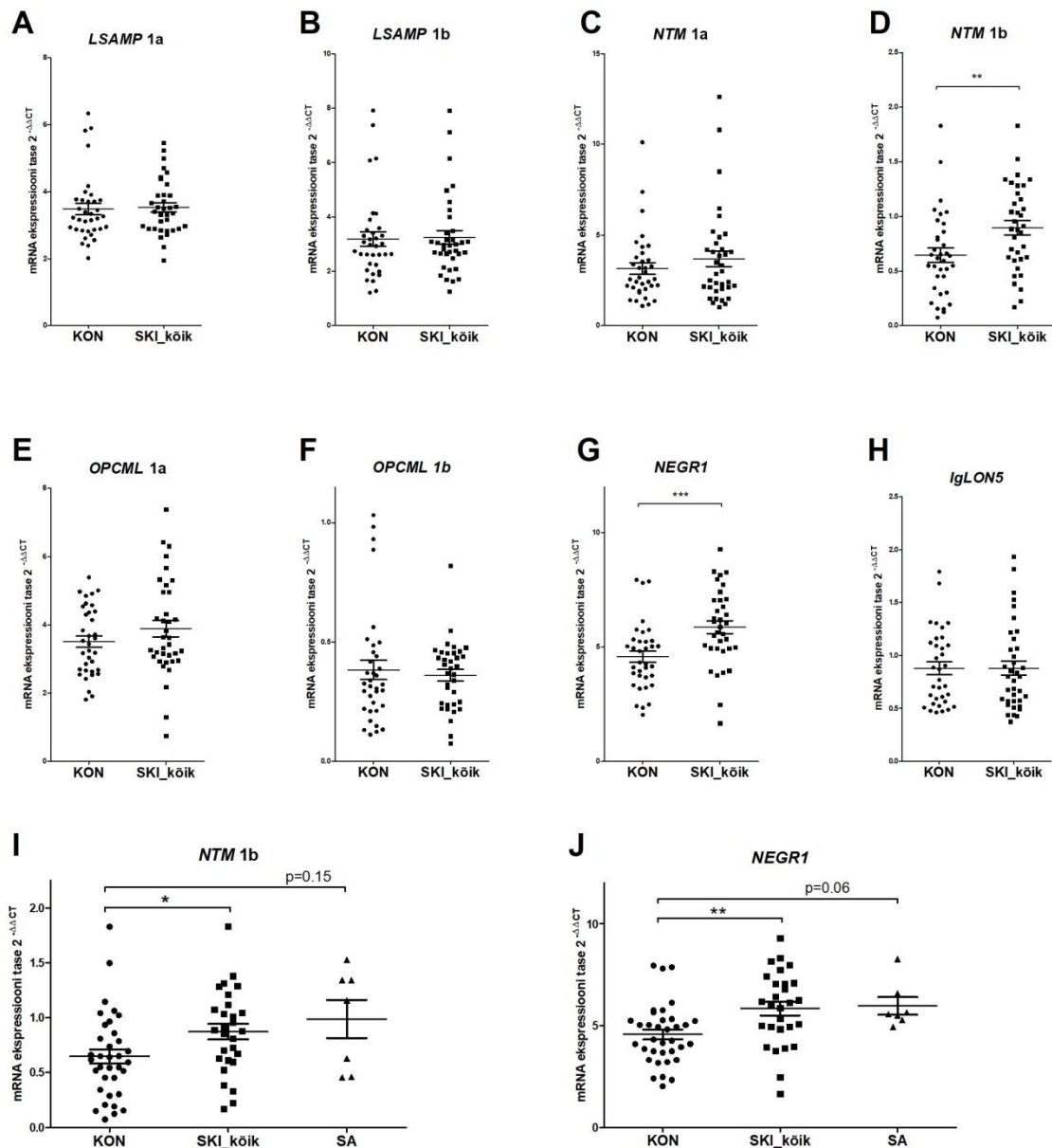
Joonis 9. LSAMP A. Genoomset regiooni *LSAMP* geenist ülesvoolu nimetatakse „geenikõrbeks” (ingl *gene desert*), mis on 2,099 Mb pikk (chr3:116,520,120–118, 619,479)(Gimelli jt., 2016). Ripke jt. (2014) poolt läbiviidud metaanalüüsi põhjal ei paikne *LSAMP* geeni lähedal statistiliselt olulist ($p \leq 5 \times 10^{-8}$) skisofreeniaga seotud lookust. **B.** Lähim skisofreeniaga seotud piik paikneb umbes 1500 kb *LSAMP* geenist ülesvoolu (p -väärtus ligikaudu 10^{-6}). Nn geenikõrbe regioon sisaldab *LSAMP* geeni regulaator alasid. **C.** SNP rs74731643 umbkaudne asukoht, mis on eQTL ning mõjutab dorsolateraaalses prefrontaalkoores *LSAMP* geeni ekspressiooni (Fromer jt., 2016). rs74731643 asukoht on tähistatud punase rombi ja selle kõrval paikneva sinise „a” tähga. (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)

2.3.3. IgLON perekonna geenide ekspressiooni analüüs DLPFC-s

2.3.3.1. Gruppide vahelised analüüsid

Mann-Whitney *U* testi kohaselt ei olnud statistiliselt olulist erinevust IgLON geenide ekspressioonitasemete vahel sõltuvalt indiviidi soost ja ajupoolkerast. Skisofreeniapatsientidel olid keskmised IgLON geenide ekspressioonitasemed tõusnud võrreldes kontrollgrupiga (väljaarvatud IgLON5, joonis 10H). Mann-Whitney *U* testi kohaselt olid statistiliselt oluliselt erinevad *NTM* 1b ja *NEGR1* ekspressioonitasemed skisofreeniapatsientide ja kontrollgrupi vahel. *NTM* 1b ekspressiooni tase oli skisofreeniapatsientidel märgatavalt tõusnud ($m=0,94$) võrreldes kontrollgrupiga ($m=0,64$) ($p<0,01$) (joonis 10D). Samuti oli tõusnud skisofreeniapatsientidel *NEGR1* ekspressiooni tase ($m=6,07$) võrreldes kontrollgrupiga ($m=4,57$) ($p<0,001$) (joonis 10G).

Kui skisoafektiivse häirega patsiendid ($n=7$) eraldati skisofreeniapatsientidest, siis Kruskal-Wallise test näitas statistiliselt olulist erinevust *NTM* 1b ekspressioonitasemes gruppide vahel ($H^2=9.11$; $df=2$; $p<0,05$). Tamhanes *post hoc* test näitas, et skisofreeniapatsientide keskmine *NTM* 1b ekspressiooni tase ($m=0,93$, $sd=0,48$) on statistiliselt oluliselt ($p<0,05$) kõrgem kui kontrollgrupil ($m=0,65$; $sd=0,039$). Kuigi skisoafektiivse häirega patsientide *NTM* 1b ekspressiooni tase ($m=0,99$; $sd=0,46$) oli samuti kõrgem kui kontrollgrupil, ei esinenud statistiliselt olulist erinevust ei kontrollgrupiga ($p=0,15$) ega skisofreeniapatsientidega ($p=1$) (joonis 10I). Samuti näitas Kruskal-Wallise test, et *NEGR1* ekspresiooni tasemes esineb gruppide vahel statistiliselt oluline erinevus ($H^2=12,09$; $df=2$; $p=0,002$). *Post hoc* test näitas, et skisofreeniapatsientide *NEGR1* ekspressiooni tase ($m=6,09$; $sd=2,24$) on statistiliselt oluliselt ($p<0,01$) kõrgem kui kontrollgrupil ($m=4,57$; $sd=1,47$). Skisoafektiivse häirega patsientide *NEGR1* ekspressiooni tasemes ($m=5,97$; $sd=1,13$) ei esine statistiliselt olulist erinevust võrreldes skisofreeniapatsientidega ($p=1$) ega kontrollgrupiga ($p=0,06$), kuigi kontrollgrupi puhul jäi p -väärtus statistiliselt olulisele väärtusele väga lähedale (joonis 10J).



Joonis 10. qPCR tulemused teisendatud $2^{-\Delta\Delta CT}$ kujule. *LSAMP* 1a (A), *LSAMP* 1b (B), *NTM* 1a (C), *NTM* 1b (D), *OPCML* 1a (E), *OPCML* 1b (F), *NEGR1* (G) ja *IgLON5* (H) ekspressiooni tasemed skisofreeniapatsientidel (SKI, n=36) ja kontrollgrupil (KON, n=36). Skisoafektiivse häirega patsiendi eraldati skisofreeni patsientidest ja viidi läbi täiendav analüüs *NTM* 1b (I) ja *NEGR1* (J) jaoks. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, KON – kontrollgrup (n=37), SKI – skisofreeniapatsient (n=30), SA – skisoafektiivne häire (n=7). qPCR analüüsides kasutati koduhoidjana *HPRT*-d. (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)

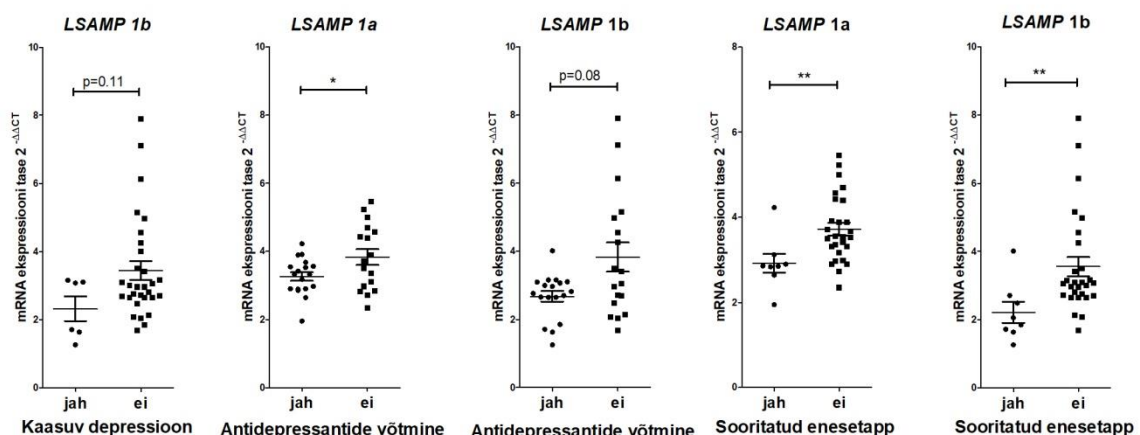
Selleks, et määrata, kas proovidele iseloomulikud faktorid on seotud geeniekspressiooni tasemega kasutati mitteparameetrilist korrelatsiooni koefitsienti. Tulemused näitasid, et RIN (ingl k *RNA integrity number*) väärtus on korrelatsioonis *LSAMP* 1a ($r = -0,40$; $p < 0,01$), *LSAMP* 1b ($r = -0,33$; $p < 0,01$) ja *NTM* 1a ($r = -0,49$; $p < 0,01$) mRNA ekspressiooni tasemega. Koeproovide pH tase oli korrelatsioonis *LSAMP* 1a ($r = -0,50$; $p < 0,01$), *LSAMP* 1b ($r = -0,49$;

$p < 0,001$), *NTM* 1a ($r = -0,43$; $p < 0,01$) ja *NTM* 1b ($r = -0,26$; $p < 0,05$) mRNA ekspressiooni tasemetega. Kuna leiti, et *NTM* 1b mRNA ekspressiooni tase korreleerub koe pH-ga viidi läbi ANCOVA kovariatsiooni analüüs, et teha kindlaks, kas *NTM* 1b ekspressiooni taseme erinevus skisofreeniapatsientidel ja kontrollisikutel on endiselt statistiliselt oluline ka siis, kui arvestada pH-d. ANCOVA kovariatsiooni analüüsi tulemused näitasid, et muutus on endiselt statistiliselt oluline.

Selleks, et ennustada ekspressioonitaseme põhjal tõenäosust olla skisofreeniapatsient viidi läbi logistilise regressiooni analüüs. Mudeli kohaselt oli logaritm tõenäosusest olla skisofreeniapatsient positiivselt seotud *NTM* 1b ja *NEGR1* ekspressiooni tasemega (mõlemal juhul $p < 0,05$). Seega, mida kõrgem on *NTM* 1b ekspressiooni tase seda suurem on tõenäosus kuuluda skisofreeniapatsientide gruppi (3,65 korda suurem tõenäosus) ja mida kõrgem on *NEGR1* ekspressiooni tase seda suurem on tõenäosus olla skisofreeniapatsient (1,61 korda suurem)

2.3.3.2. Skisofreeniapatsientide grupisene analüüs

Haigust iseloomustavate faktorite (nagu elujooksul kasutatud kloorpromasiini kogus, vanus haiguse alguses ja haiguse kestus) ja geeni ekspressiooni taseme vahel ei esinenud statistiliselt olulisi korrelatsioone. Mann-Whitney *U* test näitas, et *LSAMP* 1a ekspressiooni tase on statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) erinev patsientidel, kes on kasutanud elu jooksul antidepressante ($n = 18$; $m = 3,25$; $sd = 0,35$) võrreldes patsientidega, kes ei ole kasutanud antidepressante ($n = 18$; $m = 3,83$; $sd = 0,96$) ($w = 109$) (joonis 11). Teiste transkriptide puhul ei esinenud statistiliselt olulisi muutuseid seoses antidepressantide tarvitamisega.



Joonis 11. *LSAMP* 1a ja 1b seos kaasuva depressiooni (MDD), antidepressantide võtmise ja sooritatud enesetappudega. Patsientidegrupi sisesed analüüsid näitasid osade *IgLON* transkriptide madalamat ekspressiooni seoses depressiooniga seotud faktoritega nagu antidepressantide kasutamine ning enesetappude

sooritamine. Kõik kuus patsienti, kellel oli MDD kasutasid antidepressante. Samas kaheksat patsiendist, kes sooritasid enesetapu ainult kolmel oli MDD ja olid kasutanud elu jooksul antidepressante. $^{***}p<0,01$; $^{*}p<0,05$ (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)

Lisaks näitasid analüüsid, et patsientidel, kes sooritasid enesetapu ($n=8$) oli statistiliselt oluliselt madalam *LSAMP* 1a, *LSAMP* 1b (joonis 11), *NTM* 1b ning *IgLON5* ekspressiooni tase võrreldes nende patsientidega, kes enesetappu ei sooritanud ($n=28$) (tabel 1). Ülejäänud taranskriptide puhul ei esinenud statistiliselt olulisi ekspressiooni taseme erinevusi patsientide vahel, kes sooritasid enesetapu ja nende vahel, kes ei sooritanud.

Tabel 1. Seos enesetappude ja IgLON geenide ekspressiooni taseme vahel (Mann-Whitney U test)

Geen	Sooritas enesetapu		Ei sooritanud enesetappu		p-väärtus	w-väärtus
	m	sd	m	sd		
<i>LSAMP</i> 1a	2,92	0,63	3,87	1,12	<0,01	189
<i>LSAMP</i> 1b	2,21	0,86	3,55	1,48	<0,05	191
<i>NTM</i> 1b	0,62	0,27	0,97	0,48	<0,05	181
<i>IGLON5</i>	0,56	0,12	0,95	0,41	<0,01	181

2.3.3.2.1. Seos enesetappude sooritamise ja narkootikumide tarbimise vahel skisofreeniapatsientidel

Antud valimi puhul oli 17 (tabel 3) patsienti üritanud sooritada enesetappu ja nendest 8 (tabel 2) patsienti surid enesetapu tõttu. 16 patsiendil oli probleem narkootikumide tarvitamisega, kanep oli kõige populaarsem, mida tarvitati ($n=10$). Selleks, et võrrelda narkootikume kuritarvitavaid patsiente, kes sooritasid enesetapu ja patsiente, kes ei sooritanud enesetappu, teostati Hii-ruut analüüs. Leiti, et esineb oluline seos narkootikumide kuritarvitamise ja enesetappude vahel $\chi^2(1, n=37)=6,01$, $p<0,05$. Patsientidel, kes sooritasid enesetapu, olid suurema tõenäosusega tarvitanud elujooksul narkootikume (8 patsiendist, kes sooritasid enesetapu, 7 olid tarvitanud narkootikume) kui patsientidel, kes ei sooritanud enesetappu (29 patsiendist 9 tarvitasid narkootikume). Kui vaadeldi ainult kanepi tarvitamist leiti samuti statistiliselt oluline seos: $\chi^2(1, n=37)=9,01$, $p<0,01$. Patsiendid, kes sooritasid enesetapu, kasutasid suurema tõenäosusega kanepit (8-st patsiendist, kes sooritasid enesetapu, 6 tarvitasid kanepit) kui patsiendid, kes ei sooritanud enesetappu (29 patsiendist 4 tarvitasid kanepit) (tabel 2).

Tabel 2. Kirjeldav statistika enesetappude sooritamise ja narkootikumide tarbimise kohta

	Sooritas enesetapu	Ei sooritanud enesetappu
Kanep	6	4
Muud narkootikumid	1	5
Ei tarvitanud narkootikume	1	20

Edasi uuriti patsiente, kes olid sooritanud enesetapukatse. Kui uuriti kõiki narkootikume, siis ei leitud statistiliselt olulist seost enesetapukatsete ja narkootikumide tarvitamise vahel: $\chi^2(1, n=37)=2,05$ ning $p=0,15$ (17 patsiendist, kes üritasid sooritada enesetappu, 10 tarvitasid narkootikume ning 20 patsiendist, kes pole püüdnud sooritada enesetappu, 6 tarvitasid narkootikume). Kui uuriti ainult kanepi tarvitamist, siis leiti statistiliselt oluline seos enesetapukatsete ja kanepi tarvitamise vahel: $\chi^2(1, n=37)=4,65$ ning $p<0,05$. Patsiendid, kes olid püüdnud sooritada enesetappu, tarvitasid suurema tõenäosusega kanepit (17 patsiendist, kes olid püüdnud sooritada enesetappu, 8 tarvitasid kanepit) kui patsiendid, kes ei olnud püüdnud sooritada enesetappu (20 patsiendist 2 tarvitasid kanepit) (tabel 3). Alkoholi tarbimise ja enesetappude vahel ei leitud statistiliselt olulist seost samuti ei leitud statistiliselt olulist seost alkoholi tarvitamise ja IgLON geenide ekspressiooni tasemete vahel.

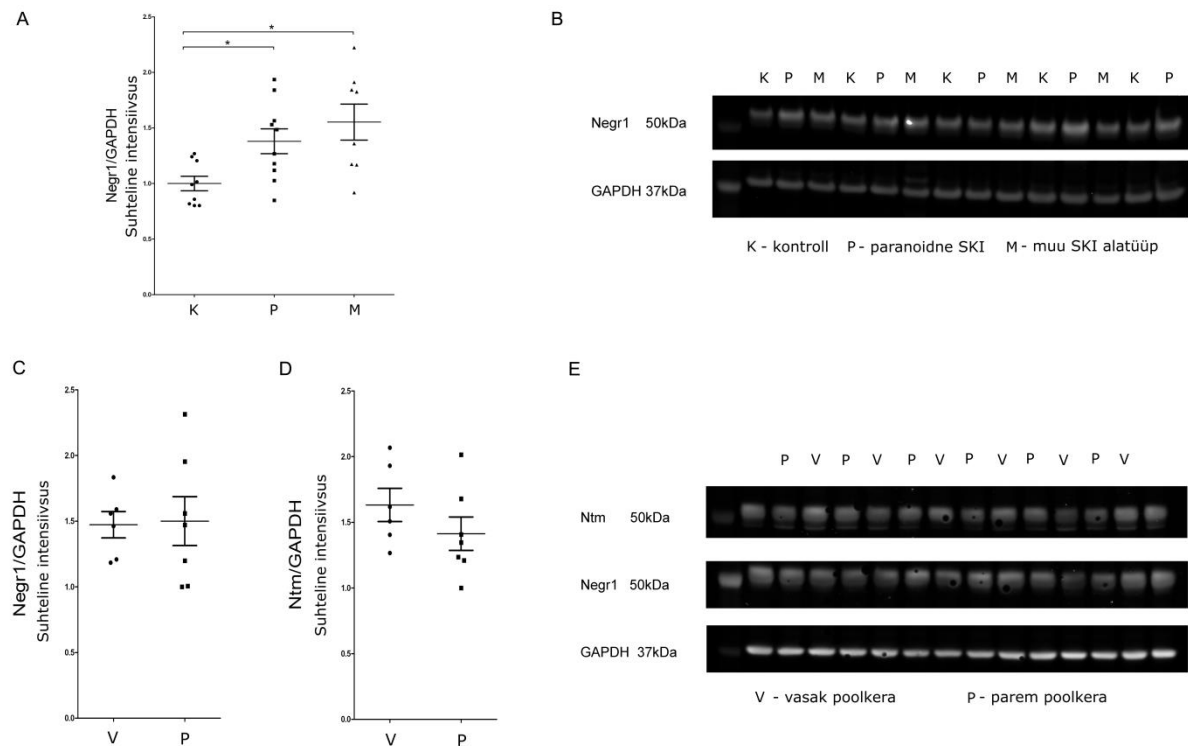
Tabel 3. Kirjeldav statistika enesetapukatsete sooritamise ja narkootikumide tarbimise kohta

	On sooritanud enesetapukatse	Ei ole sooritanud enesetapukatset
Kanep	8	2
Muud narkootikumid	2	4
Ei tarvitanud narkootikume	7	14

2.3.4. Western blot analüüs

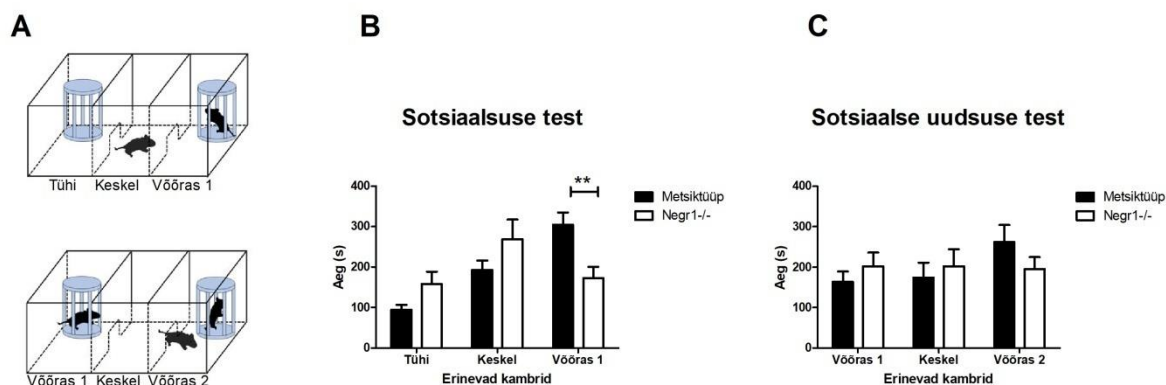
Krutskal-Wallise testi kohaselt esineb statistiliselt oluline erinevus NEGR1 valgu tasemes erinevat tüüpi skisofreeniapatsientide ja kontrollgrupi vahel ($H^2=8,01$; $df=2$; $p=0,01$) (joonis 12A-B). Tamhanesi *post hoc* test näitas, et paranoidse skisofreeniaga patsientide keskmine NEGR1 valgu tase ($m=1,72$; $sd=0,43$) oli kõrgem kui kontrollgrupi keskmine valgu tase ($m=1,24$; $sd=0,24$) ($p<0,05$). Samuti oli kõrgem teisi skisofreenia tüüpe omavate patsientide

keskmise NEGR1 valgu tase ($m=1,93$; $sd=0,57$) võrreldes kontrollgrupiga ($p<0,05$). Lisaks uuriti veel 7 tervet isikut, et vaadata, kas esineb erinevusi NTM ja NEGR1 valgu tasemes erinevates ajupoolkerades. Mann-Whitney U test näitas, et poolkerade vahel ei esine statistiliselt olulist ($p>0,05$) erinevust NTM ja NEGR1 valgu tasemetes (joonis 12C-E).



Joonis 12. Western blot analüüsi tulemused. **A, B.** NEGR1 analüüs ja vastav immunoblot. DLPFC proovid saadi kontrollidelt (K, $n=9$), paranoidse skisofreeniaga patsientidelt (P, $n=10$) ja muude alatüüpidega skisofreeniapatsientidelt (M, $n=8$). **C-E.** NEGR1 ja NTM analüüsid paremas (P, $n=7$) ja vasakus (V, $n=7$) poolkeras ja vastavad immunoblotid. DLPFC proovid koguti tervetelt indiviididelt ($n=7$). Joonisel märgitud keskvärtus $\pm$ SEM, $*p<0,05$. (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)

2.3.5. Kolme kambri sotsiaalsustest



Joonis 13. Kolme kambri test. A. Kolme kambri testi disain (modifitseeritud Lim jt., 2017 järgi) B. Kolme kambri sotsiaalsustest. Mõõdeti metsiktüüpi (*Negr1*^{+/+}) ja *Negr1*^{-/-} (n=20 genotüübi kohta) kõigis kolmes kambri veedetud aeg (sekundites). C. Sotsiaalse uudsuse test. **p<0,01

Negr1^{-/-} hiired ($m=172,9 \pm 27,7$ s) veetsid statistiliselt oluliselt ($p<0,01$) vähem aega kambris, kus oli võõras hiir (võõras 1), võrreldes metsiktüüpi hiirtega ($m=304,3 \pm 30,4$ s) (joonis 13B). Kuigi tulemus ei ole statistiliselt oluline on siiski märgata, et *Negr1*^{-/-} hiired veetsid rohkem aega tühjas või keskmises puuris võrreldes metsiktüüpi hiirtega (tabel 4) (joonis 13B).

Tabel 4. Kolme kambri sotsiaalsustesti tulemused (sekundites)

	Metsiktüüp		<i>Negr1</i> ^{-/-}	
	Keskmine	SEM	Keskmine	SEM
Võõras 1	304,3	30,4	172,9	27,7
Keskel	192,8	23,4	268,6	48,9
Tühi	94,8	11,8	158,4	30,4

Sotsiaalse uudsuse testis ei olnud erinevused *Negr1*^{-/-} hiirte ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt olulised (tabel 6). Kuigi tulemuste põhjal on näha, et metsiktüüpi hiired veetsid rohkem aega ($m= 262,2 \pm 41,9$ s) kambris, kus oli Võõras 2 võrreldes *Negr1*^{-/-} hiirtega ($m=195,5 \pm 29,2$ s) (tabel 5) (joonis 13C).

Tabel 5. Sotsiaalse uudsuse testi tulemused

	Metsiktüüp		<i>Negr1</i> ^{-/-}	
	Keskmine	SEM	Keskmine	SEM
Võõras 1	163,8	25,8	202,4	33,5
Keskel	174,0	37,4	202,0	42,0
Võõras 2	262,2	41,9	195,5	29,2

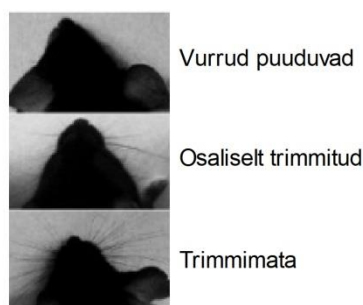
Tabel 6. Sotsiaalse uudsuse testi tulemuste statistiline analüüs (kahepoolne ANOVA)

	F-väärtus	p-väärtus
Genotüübi efekt	F(1,102)=0,0000	1,0000
Kambri efekt	F(2,102)=0,99243	0,37423
Genotüüp x Kamber	F(2,102)=1,3221	0,27110

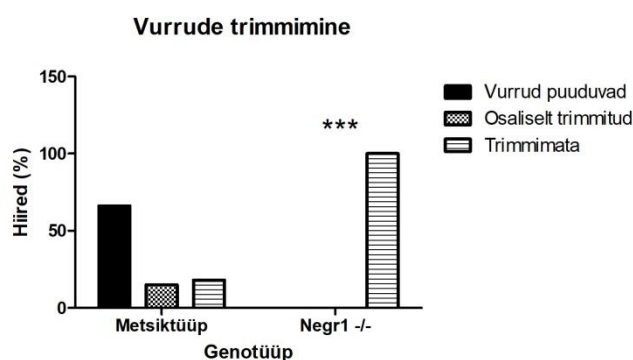
2.3.6. Vurrude trimmimise hindamine

Hii-ruut test näitas, et vurrude trimmimises esineb *Negr1*^{-/-} hiirtel ja metsiktüüpi hiirte vahel statistiliselt oluline erinevus ($\chi^2=130,48$, $p<0.00001$). 100% *Negr1*^{-/-} hiirtest olid vurrud trimmimata, samas kui metsiktüüpi hiirte puhul oli ainult 18% hiirtest trimmimata vurrudega, 15% oli osaliselt trimmitud vurrudega ja 66% hiirtest vurrud üldse puudusid (joonis 14B).

A



B



Joonis 14. Vurrude trimmimise hindamine. A. Vurrude trimmimist hinnati kolme astmelisel skaalal: vurrud puuduvad, osaliselt trimmitud, trimmimata. B. *Negr1*^{-/-} hiirtel esineb statistiliselt oluline erinevus vurrude trimmimises võrreldes metsiktüüpi hiirtega. Vurrude trimmimist hinnati 33 WT ja 34 *Negr1*^{-/-} hiirel. *** $p<0,001$

2.4. Arutelu

Varasemad uuringud on seostanud SNP-sid IgLON geenides mitmete erinevate fenotüüpidega. Näiteks on SNP-sid *LSAMP* geenis seostatud skisofreenia ja bipolaarse häirega (Koido jt., 2014; Chen jt., 2017), enesetappude (Must jt., 2008), MDD ja paanikahäirete (Koido jt., 2012) ning südamehaigustega (Wang jt., 2008; Dugan jt., 2013). SNP-del *NTM* geenis on näidatud seost intelligentsuse (Pan jt., 2010), bipolaarse häire (Wang jt., 2010), aspergeri sündroomi (Salyakina jt., 2010), ADHD (Brevik jt., 2016), rasvumise ja tüüp II diabeedi (Below jt., 2011; Comuzzie jt., 2012) ning mitmete kasvajatega (Lin jt., 2012; Abu-Ameron jt., 2015). *OPCML* geenist on tuvastatud SNP-sid, mis on seotud näiteks skisofreenia (Athanasia jt., 2010; Panichareon jt., 2012; Ma jt., 2014; Goes jt., 2015) ning intelligentsusega (Chiang jt., 2012). SNP-sid *NEGR1* geenis on seostatud ülekaalulisuse (Thorleifsson jt., 2008; Willer jt., 2008; Mägi jt., 2013), söömishäirete (Gamero-Villarroel jt., 2015) ning MDD-ga (Hyde jt., 2016). Seega osalevad IgLON geenid lisaks psühhiaatriliste häirete tekkele ka mitmete muude haiguste välja kujunemisel ning IgLON valgud ei ole ainult kesknärvisüsteemile spetsiifilised vaid neid leidub ka muudes kudedes (Vanaveski jt., 2017).

GWAS andmete analüüs näitas, et Ripke jt. (2014) poolt tuvastatud 108 kõige olulisemast skisofreenia kujunemise riskiga seotud lookusest kolm asuvad IgLON geenidest (*NEGR1*, *OPCML* ja *NTM*) vähem kui 500 kb ülesvoolu. Ripke jt. (2014) on senini kõige ulatuslikum ülegenoomne skisofreeniaga seotud riskilookuste metauuring, kus loeti oluliseks seos geenidega, mis asusid kuni 500 kb kaugusel riskilookusest. IgLON geenidega Ripke jt., (2014) seost välja ei toonud, kuna nende kolme olulise riskilookuse puhul peeti olulisemaks teisi geene. Siiski, näiteks *OPCML* puhul asus riskilookuses SNP rs10791323, mis Fromer jt., (2016) andmestiku alusel on eQTL, mis mõjutab *OPCML* ekspressiooni DLPFC-s. Fromer jt., (2016) andmestikku analüüsid leiti veel ka seda, et eQTL-id, mis mõjutavad IgLON geenide ekspressiooni DLPFC-s võivadki asuda geeni kodeerivast alast kaugemal, näiteks *LSAMP* geeni puhul kuni 2Mb kodeerivast alast ülesvoolu, mis viitab sellele, et IgLON geenide regulaatoralad võivad asuda väga ulatuslikel genoomsetel piirkondadel. Kokkuvõttes leidsime olulist tõendmaterjali, et IgLON perekonna adhesioonimolekule kodeerivad geenid asuvad kõige olulisemate skisofreenia riski ennustavate lookuste läheduses, kuid edasi tuleks kindlasti uurida, kas nendes lookustes on tuvastatud IgLON geene mõjutavad regulaatoralad.

Neuraalsed raku adhesioonimolekulid, nagu IgLON valgud, on olulised korrektsete neuraalsete rakkude vaheliste interaktsioonide moodustumisel, mis on aluseks aju normaalsele

funktsioneerimisele. Antud uuring näitas, et skisofreeniapatsientide DLPFC-s on toimunud muutused IgLON perekonna adhesioonimolekulide ekspressioonis, oluline tõus tuvastati *NEGR1* ja *NTM* 1b transkriptides. *Western blot* analüüs kinnitas, et *NEGR1* valgu tase on tõusnud nii paranoidse skisofreenia kui ka muude alatüüpidega skisofreeniapatsientide DLPFC-s. Antud tulemust kinnitab ka Fromer jt. läbiviidud uuring, kus samuti näidati, et skisofreeniapatsientide DLPFC-s on *NEGR1* geen ülesreguleeritud. Kuigi antud analüüs ei näidanud, et tõus oleks statistiliselt oluline, kuna kogu transkriptoomi uuringud peavad valepositiivsete tulemuste vältimiseks kasutama rangemaid kriteeriumeid, on tulemused siiski kooskõlas käesoleva töö tulemustega. (Fromer jt., 2016) IgLON perekonda kuuluvate valkude tõusu skisofreeniapatsientidel on näidatud ka varasemates töödes. Nimelt LSAMP ja *NEGR1* valgud on märgatavalt ülesreguleeritud skisofreeniapatsientide postmortaasles anterioorses prefrontaalkoores võrreldes tervete inimestega (Cox jt., 2016). Seost skisofreenia ja *NEGR1* geeni vahel näitasid ka Holliday jt., kes tuvastasid skisofreeniapatsientidel *NEGR1* geenist mikrodeletsiooni, mida nad seostasid skisofreenia tekkega. (Holliday jt., 2009).

NEGR1-l on oluline roll sünapside arvu reguleerimisel. Rakukultuuri varajastes staadiumites vähendab *NEGR1* üleekspressioon sünapside arvu ning hilises staadiumites olevates rakukultuurides tõstab *NEGR1* üleekspressioon sünapside arvu. (Hashimoto jt., 2008) Korrektne sünapside arv ja tasakaal on väga oluline DLPFC normaalseks funktsioneerimiseks ning arvatakse, et muutused sünapside arvus ning eksitatorsete ning inhibitorsete sünapside tasakaalus mängivad olulist rolli psühhiaatriliste haiguste nagu skisofreenia tekkes. (Selemon ja Zecevic, 2015). Seega muutused *NEGR1* ekspressioonis võivad põhjustada muutuseid sünapside arvus ja tasakaalus skisofreeniapatsientide DLPFC ja olla neil üheks skisofreenia tekke põhjuseks. Lisaks on näidatud, et *NTM* ja *NEGR1* on olulised neuriitide väljakasvu kontrollimisel (Gli jt., 1998; Pischetta jt., 2014).

Varasemad uuringud on näidanud, et nii *NTM* kui ka *NEGR1* on seotud lisaks skisofreeniale veel mitmete muude psühhiaatriliste häiretega. Näiteks on näidatud *NEGR1* taseme tõusu MDD patsientide DLPFC-s võrreldes tervete isikutega. (Chang jt., 2014) Geenivariante *NEGR1* geenist ülesvoolu jäävates regulaatorpiirkondades on seostatud MDD tekkega (Hyde jt., 2016). Mikrodeletsiooni *NEGR1* geenis on seostatud neuropsühhiaatriliste, käitumuslike ja õppimisprobleemidega (Genovese jt., 2015). Väikeseid ümberkorraldusi *NTM* geenis on seostatud ASD-ga (Maruani jt., 2015). *NTM* geeni esimesest intronist on leitud neli SNP-d, mida on seostatud kognitiivsete funktsioonide ja hilise algusega Alzheimeriga (Liu jt. 2007). *NTM* geenist on leitud SNP (rs35974940), mida on seostatud ADHD tekkega (Brevik jt., 2015). GWAS uuringute kohaselt asub *NTM* geenis SNP (rs992564), mis mõjutab nii

skisofreenia kui ka BPD teket (Wang jt., 2010), mis on üheks tõendiks sellele, et skisofreenia jagab riskialleele mitmete teiste psühhiaatriliste häiretega (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2011). Kuigi käesolev töö ei näidanud statistiliselt olulist *NEGR1* taseme muutust skisoafektiivse häirega patsientidel (joonis 10J), mis võib tuleneda väikesest patsientide arvust (n=7), näitavad saadud tulemused koos varasemate uuringutega, et *NEGR1* tõus võib olla frontaalkoores mitmete psühhiaatriliste häirete molekulaarseks markeriks.

Analüüsid ei näidanud muutuseid *LSAMP* ekspressioonis, kuigi eelnevad uuringud on näidanud *LSAMP* valgu taseme tõusu skisofreeniapatsientide DLPFC-s (Behan jt., 2009), anterioorses prefrontaalkoores (Cox jt., 2016) ja orbifrontaalkoores (Velásquez jt., 2017) võrreldes tervete isikutega. Samuti on SNP-sid *LSAMP* geeni 1b promootoris seostatud skisofreenia riskiga (Koido jt., 2014; Chen jt., 2017). Veel on leitud *LSAMP* geenist CNV-sid, mida on samuti seostatud skisofreenia tekkega (Lowther jt., 2014). Põhjus miks analüüsid ei näidanud *LSAMP* taseme muutust võib olla selles, et antud töös mõõdeti alternatiivsetelt promootoritelt 1a ja 1b saadud taranskriptide tasemeid eraldi ja kummagi transkripti tase eraldi ei tõuse nii palju, et tekiks statistiliselt oluline muutus. Samas valgu tasemel, kus vaadeltakse mõlemalt promootorilt saadudprodukte koos, on muutus piisavalt suur, et osutada statistiliselt oluliseks. Lisaks ei pruugi mRNA tase alati olla vastavuses valgu tasemega. Samas oluline *NTM* 1b ekspressiooni taseme tõus skisofreeniapatsientide DLPFC-s näitab, et IgLON perekonna geenide uurimisel on oluline uurida alternatiivseid promootoreid ka eraldi. Kuna peale N-terminaalse 1a/1b-isovormi spetsiifilise signaalpeptiidi, mida kodeerib 5'-kodeeriv piirkond, ära lõikamist on IgLON valgud omavahel identsed hoolimata sellest, kumba promootori pealt antud molekuli sünteesi alustati (Pimenta ja Levitt, 2004). Seega ei *LSAMP* ega *NTM* antikehad ei ole suutelised vahet tegema *LSAMP* 1a ja 1b ning *NTM* 1a ja 1b isovormidel, millel on üle aju väga erinevad ekspressiooni mustrid (Philips jt., 2015; Vanaveski jt., 2017). qPCR on hetkeseisuga optimaalseim meetod, millega on võimalik vaadelda promootori-spetsiifilisi isovorme eraldi.

Analüüsid ei näidanud statistiliselt olulist *OPCML* taseme muutust skisofreeniapatsientide DLPFC-s võrreldes tervete isikutega. Antud tulemust kinnitab ka juba varem antud valimis läbiviidud uuring, kus analüüsiti GWAS uuringu abil kindlaks tehtud skisofreeniaga seotud lookuste ekspressiooni taset. Seega GWAS uuringute abil mingi haigusega seostatud lookused ei pruugi mõjutada lähima geeni ekspressiooni. (Umeda-Yano jt., 2014) Kuna inimesel paiknevad *NTM* ja *OPCML* üksteisest kõigest 80 kb kaugusel, siis on võimalik, et need geenid jagavad regulatoorseid mehhanisme. Üheks selliseks näiteks on SNP rs11222692 (joonis 7B),

mis paikneb *NTM* geeni intronis, mis on eQTL, mis mõjutab *OPCML* geeni ekspressiooni taset DLPFC-s (Fromer, jt., 2016). Muutuseid piirkonnas 11q25 on ka varasemalt seostatud skisofreeniaga (Magri jt., 2010; Ye jt., 2012) ning skisofreenia tekkega seostatud SNP-sid on tuvastatud nii *OPCML* (O'Donovan *etal.*, 2008; Panichareon jt., 2012) kui ka *NTM* geenis (Wang jt., 2010). Seega on *NTM* ja *OPCML* arvestatavad skisofreeniaga seotud riskilookused.

Lisaks näitasid analüüsid, et antidepressante kasutanud patsientidel on statistiliselt oluliselt madalam *LSAMP* 1a ekspressiooni tase võrreldes antidepressante mitte kasutanud patsientidega. Veel näitasid analüüsid *LSAMP* statistiliselt olulist ekspressiooni taseme langust skisofreeniapatsientidel, kes sooritasid enesetapu võrreldes nende patsientidega, kes enesetappu ei sooritanud. Seost *LSAMP* geeni ja enesetappude vahel on näidatud ka juba varasemalt (Must jt., 2008; Sokolowski jt., 2016). On näidatud, et psühhoosi järgne depressioon, lootusetuse tunne, sotsiaalne isolatsioon ja teatud ainete (narkootikumid, alkohol) tarvitamine on suurteks riskiteguriteks skisofreeniapatsientide suitsidaalsusele (Pompili jt., 2007). Suur osa enesetappe sooritatakse paari kuu jooksul peale psühhoosi, kui patsientidel on psühhoosijärgne depressioon (Siris, 2001; Kasckow jt., 2011). Analüüsid näitasid *LSAMP* 1b taseme langust skisofreeniapatsientidel, kellel oli liskas skisofreeniale ka MDD võrreldes patsientidega, kelle MDD-d ei olnud. Tulemus ei olnud küll statistiliselt oluline, aga selle põhjuseks võib olla väike patsientide arv, kellel oli lisaks skisofreeniale ka MDD (n=6). Kuna antud uuringu puhul 8 patsiendist, kes sooritasid enesetapu kolmel oli MDD, ei saa antud uuringu põhjal kindlalt väita, kas MDD on seotud skisofreeniapatsientide suitsiidsusega. Veel on leitud, et skisofreeniapatsientidel, kes kuritarvitavad teatud aineid on suurem risk sooritada enesetapp (Gut-Fayand jt., 2001). Seost narkootiliste ainete tarvitamise ja enesetappude vahel näitasid ka antud töös läbiviidud analüüsid. Analüüsid näitasid, et 8 patsiendist, kes sooritasid enesetapu, 7 kasutasid narkootilisi aineid ja 6 neist kanepit ning 17 patsiendist, kes olid sooritanud enesetapukatse, 10 olid tarvitanud narkootilisi aineid ja 8 neist tarvitas kanepit. Seda, et kanepi tarvitamine võib skisofreeniapatsientidel tõsta enesetapuriski on näidatud ka juba varem (Serafini jt., 2014). Seega tundub, et kanep on üheks oluliseks riskiteguriks seoses skisofreeniapatsientide suitsidaalsusega.

Kuna *NEGR1* oli kõige enam muutunud IgLON transkript/valk skisofreeniapatsientide DLPFC-s ning tuvastati ka oluline skisofreeniaga seotud lookus 500 kb *NEGR1* geenist ülesvoolu, uurisime selle geeni mõju käitumisele hiirmudelil. Uurisime, kuidas *Negr1* välja lülitamine mõjutab hiire sotsiaalset käitumist, kuna häired sotsiaalses käitumises on skisofreenia kujunemisel kesksed.

Katsed *Negr1*^{-/-} hiirtega näitasid, et *Negr1*^{-/-} ja metsiktüüpi hiirte sotsiaalne käitumine on märgatavalt erinev. Kui normaalne, metsiktüüpi hiir, eelistab tühjale kambrile puuriosa, kus asub võõras hiir ning asub teda uudistama, siis *Negr1*^{-/-} hiirte jaoks tundub olevat ebaoluline, kas kõrvalkamber on tühi, on seal võõras hiir või juba tuttav hiir. Analüüsid näitasid, et *Negr1*^{-/-} hiired veedavad märgatavalt vähem aega võõra hiire (võõras 1) seltsis võrreldes metsiktüüpi hiirtega ja eelistavad rohkem aega veeta keskmises kambris või tühjas kambris. Kuigi sotsiaalse uudsuse test ei näidanud statistiliselt olulist erinevust *Negr1*^{-/-} ja metsiktüüpi hiirte vahel, oli siiski märgatav teatavat erinevus *Negr1*^{-/-} ja metsiktüüpi hiirte vahel. Metsiktüüpi hiired veetsid rohkem aega puuris, kus oli uus võõras hiir, kellega nad varem polnud kokku puutunud (võõras 2), võrreldes *Negr1*^{-/-} hiirtega. Muutuseid sotsiaalses käitumises on varasemalt näidatud ka *Lsamp*^{-/-} hiirtel (Innos jt., 2011). Muutused sotsiaalses käitumises on iseloomulikud ka skisofreeniapatsientidele. Skisofreeniale iseloomulikeks sümptomiteks on sotsiaalne võõrandumine, madal sotsiaalne staatus ja huvipuudus (Sarkar jt., 2015).

Veel näitasid analüüsid, et erinevalt metsiktüüpi hiirtest ei trimmi *Negr1*^{-/-} hiired üksteise vurrusid. Vurrude trimmimine viitab dominantsele käitumisele ja näitab sotsiaalset hierarhiat (Long, 1972; Strozik jt., 1981). Vurrude trimmimine on eriti omane osadele hiireliinidele (nt C57BL/6 ja A2G), mis näitab, et sellel on tugev geneetiline komponent. Vurrud mängivad hiire käitumise juures väga olulist rolli, hiired kasutavad vurre selleks, et teha kindlaks esemete asukohta nende vahetus ümbruses, et eristada erinevaid tekstuure, tasakaalu kontrollimiseks ja ruumis orienteerumiseks ning selle uurimiseks. Seega võib muudetud vurrude pikkus tänu vurrude trimmimisele muuta looma käitumisharjumusi ja mõjutada nende saavutusi erinevates käitumistestides. (Kalueff jt., 2006) Sarnast käitumist on varem näidatud ka *Lsamp*^{-/-} hiirtel (Innos jt., 2011).

Muutused *Negr1*^{-/-} hiirte sotsiaalses käitumises viitavad sellele, et *NEGR1* võib olulist rolli mängida mitmete psühhiaatriliste häirete tekkes ja *Negr1*^{-/-} hiired on heaks mudeliks, millega uurida skisofreeniale omaseid muutuseid sotsiaalses käitumises. Võttes arvesse Tartu Ülikooli Füsioloogia labori avaldamata andmeid, et *Negr1*^{-/-} hiirtel on suurenenud lateraalsakesed, võiks *Negr1*^{-/-} hiir olla võrreldav varasemalt kirjeldatud skisofreenia hiirmudelitega, nagu näiteks DISC1. Lateraalsakesete suurenemist on näidatud ka skisofreeniapatsientidel (Kempton jt., 2010). Samuti on *Negr1*^{-/-} hiire hippokampuse neuroneid kultuuri viies näidatud, et *Negr1*^{-/-} neuronitel esineb tugevaid kõrvalekaldeid neuriitide väljakasvus (Singh jt., 2018)

Tulevikus on plaanis edasi uurida, kas genotüüp mõjutab geeniekspressiooni. Selleks plaanime käesolevas töös kasutatud kohordi ülegenoomselt genotüpiseerida. Kuna käesolevas töös tuvastasime, et kolmes IgLON geenist vähem kui 500 kb ülesvoolu asuvad olulised skisofreeniaga seotud riskilookused, tuleks uurida, kas need lookused tõesti mõjutavad IgLON geenide regulatsiooni ja kas on võimalik leida nendest piirkondadest regulaatorjärjestusi. Samuti on käimas ka juba katsed neuraalsete rakukultuuridega, et uurida IgLON geenide mõju neuronite arengule ja neuriitide väljakasvule. Hiirmudelites peaks IgLON puudulikel hiirtel uurima ajus juhteteid ja vaadata, et kas nendes esineb kõrvalekaldeid. Lisaks oleks plaanis potentsiaalse doktoritöö projekti käigus põhjalikumalt uurida ka käesolevas töös kasutatud *Negr1*^{-/-} hiirmudelit.

KOKKUVÕTE

IgLON valgud osalevad neuriitide väljakasvus, sünapside plastilisuses ja närviringete moodustumises. Häired aju funktsionaalsete ühenduste tekkel, mida iseloomustavad häired neuraalsete teede terviklikkuses, peetakse üheks skisofreeniale omaseks fenotüübiks. Raku adhesioonimolekulid nagu IgLON-id on olulised neuraalsete ringete korrektse moodustumisel. Üha enam tõendeid viitab sellele, et IgLON geenidel on oluline roll mitmete psühhiaatriliste häirete välja kujunemisel.

Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada, milliste erinevate fenotüüpidega on IgLON geenides asuvaid SNP-sid varasemates uuringutes seostatud ning spetsiifilisemalt analüüsida skisofreeniaga seotud GWAS uuringuid. Ekperimentaalse osa eesmärgiks oli teha kindlaks, kas skisofreeniapatsientide dorsolateraalses prefrontaalkoores esineb muutuseid IgLON geenide mRNA/valgu ekspressioonis võrreldes tervete indiviididega ning uurida detailsemalt patsientide gruppi. Uurida hiirmudelil, kas ühe skisofreenias väga olulise geeni *Negr1* väljalülitamine põhjustab muutuseid sotsiaalses käitumises.

Töö käigus saadi järgnevad tulemused:

- 1) Kirjandusliku analüüsi põhjal tuvastati IgLON geenidest 108 SNP-d, mis seostuvad mõne spetsiifilise fenotüübiga.
- 2) Viimaste aastate kõige olulisemast GWAS uuringust (Ripke et al, 2014) selgus, et 108 olulisemast lookusest 3 paiknevad IgLON perekonna geenidest (*NEGR1*, *OPCML*, *NTM*) vähem kui 500 kb ülesvoolu.
- 3) Skisofreeniapatsientidel on dorsolateraalses prefrontaalkoores statistiliselt oluliselt tõusnud *NEGR1* ekspressiooni tase (1,33 kordne tõus) ja *NTM* 1b ekspressiooni tase (1,47 kordne tõus). Samuti on *NEGR1* valgu tase tõusnud nii paranoitse alatüübiga kui ka muude alatüüpidega skisofreeniapatsientidel võrreldes kontrollisikutega.
- 4) Patsientide grupsisised analüüsid näitasid, et osade IgLON transkriptide (põhiliselt *LSAMP* 1a ja 1b) madalam ekspressiooni tase on seotud kaasneva depressiooniga skisofreeniapatsientidel. Lisaks leiti, et kanepi tarvitamine võib olla skisofreeniapatsientidel seotud suitsidaalse käitumisega.
- 5) *Negr1*^{-/-} hiire sotsiaalses käitumises esineb märgatavaid muutuseid võrreldes metsiktüüpi hiirega. *Negr1* puudulikkusega hiired ei eelista võimalusel teise tundmatu hiire seltskonda üksindusele ning grupimajutuses ei trimmi nad vastastikku vurre. Need tulemused viitavad, et sotsiaalsed suhted ja sotsiaalne hierarhia ei ole *Negr1* puudulikkusega hiire jaoks sama olulised kui metsiktüüpi hiire jaoks.

SUMMARY

Changes of the expression levels of the genes coding IgLON family adhesion molecules in relation to mental disorders and social phenotype *Negr1*^{-/-} mice

Neural adhesion molecules are important for the formation and storage of neural connections. More and more evidence suggest that the neural adhesion molecules LSAMP, NTM, OPCML, NEGR1 and IGLON5 of the IgLON family take part in the development of schizophrenia. IgLONs are glycoprotein adhesion molecules which belong to Ig superfamily. IgLONs are composed of three C2-type Ig domains and are attached to the plasma membrane of the cells with a GPI anchor. IgLON proteins promote neurite outgrowth, synaptic plasticity and development of nervous system. These processes have also shown abnormalities in schizophrenia patients. Disorders in the functional connection formation of the brain, characterised by incompleteness of the neural network, are considered to be one of the phenotypes related to schizophrenia. Cell adhesion molecules such as IgLONs play an important role in proper formation of neural circles.

The aim of this thesis lies in explaining which of the various phenotypes are associated with the SNPs in the IgLON genes in the earlier studies. More specifically, to analyze the GWAS researches related to schizophrenia in order to establish whether the most important loci related to schizophrenia are located near the IgLON genes. Also, to determine whether there are changes in the mRNA/protein expression of the IgLON genes in the dorsolateral prefrontal cortex of the schizophrenia patients as compared to the healthy individuals. To examine the group of patients in more detail to determine whether the concurrent depression, suicidal tendencies, consumption of psychoactive substances and the expression of IgLON family genes are connected to one another. And finally, to determine on the basis of a mouse model whether switching off one of the most important genes in schizophrenia *Negr1* causes change in the social behaviour of the mice.

During the research, the following results were established:

- 1) The most relevant recent GWAS research (Ripke et al, 2014) revealed that 3 out of 108 most important loci are located less than 500 kb upstream of the IgLON family genes (NEGR1, OPCML, and NTM).

- 2) The analyses showed that in the dorsolateral prefrontal cortex of the schizophrenia patients the *NEGR1* expression level and the *NTM1b* expression level have statistically significantly risen (1.33 times and 1.47 times respectively).
- 3) The Western blot analysis showed a statistically significant rise of NEGR1 protein levels both in paranoid subtype and other subtypes of schizophrenia patients as compared to control individuals.
- 4) The analyses within the patient groups revealed that the lower expression level of some IgLON transcripts (mainly *LSAMP1a* and *1b*) may be related to the concurrent depression of the schizophrenia patients. In addition to that, the analyses showed the potential connection between canopy abuse and suicidal behaviour of the schizophrenia patients.
- 5) There were significant changes in the social behaviour of the *Negr1*^{-/-} mouse as compared to the wildtype mouse. It appears that social relationships and hierarchy could be not as important to *Negr1*^{-/-} mice as it is for WT mice.

Thus, the IgLON genes are relevant loci in the development of schizophrenia and the changes in their expression may be one of the reasons for the development of schizophrenia. Also, the changes in the expression level of the IgLON genes may be related to the suicidal tendencies of the schizophrenia patients. Switching off the *Negr1* gene in the mouse model causes significant changes in the social behaviour, which is considered to be one of the most relevant symptoms of schizophrenia. And it seems that the *Negr1*^{-/-} mice is a suitable model for studying social behaviour changes of schizophrenia patients.

In the future, there is a plan to find out whether the genotype affects gene expression. For this, we plan to carry out the whole-genome genotyping of this cohort. As in the current study we found that three of the IgLON genes are located less than 500 kb upstream from the most significant risk loci for schizophrenia, next it is needed to study whether these loci have impact on the regulation of these IgLON genes and if it is possible to find certain regulatory sequences from these loci. Also experiments with cell cultures are already taking place to investigate the effect of IgLON genes on neuronal development and neurites outgrowth. There is also a plan to examine brain pathway of IgLON deficient mice and see if there is any abnormalities. In addition, we plan to explore further the *Negr1*^{-/-} mouse model that was also used in this thesis.

TÄNUSÕNAD

Ma sooviksin tänada oma juhendajaid Mari-Anne Philipsit ja Tambet Tõnissood huvitava lõputöö teema ja igakülgse abi eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Kasutatud artiklid

1. Abu-Amro, K., Kondkar, A. A., Chalam, K. V. (2015). An Updated Review on the Genetics of Primary Open Angle Glaucoma. *Int J Mol Sci.* 16(12): 28886–28911.
2. Akeel, M., McNamee, C. J., Youssef, S., Moss, D. (2011). DIgLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via an IgLON-containing receptor complex. *Brain Research.* 1374: 27–35.
3. Athanasiu, L., Mattingdal, M., Kähler, A. K., ... Andreassen, O. A. (2010). Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genomwide study are replicated in a large European cohort. *J Psychiatr Res.* 44(12): 748–753.
4. Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium (2017). Meta-analysis og GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Molecular Autism.* 8(21): doi.org/10.1186/s13229-017-0137-9.
5. Behan, A. T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., Cotter, D. R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol Psychiatry* 14(6): 601–613.
6. Below, J. E., Gamazon, E. R., Morrison, J. V, ... Hanis, C. L. (2011). Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diapietes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia.* 54(8): 2047–2055.
7. Brevik, E. J., van Donkelaar, M. M. J., Weber, H., ... Zayats, T. (2015). Genome-Wide Analyses of Agressiveness in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Genet B Neuropsychiatr Genet.* 171(5): 733–747.
8. Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., Babulas, V. P., Susser, E. S. (2004). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 61(8): 774–780.
9. Brown, A. S., Hooton, J., Schaefer, C. A., Zhang, H., Petkova, E., ... Babulas, V. (2004). Elevated maternal interleukin-8 levels and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psichiatri.* 161: 889–895.

10. Buka, S. L., Tsuang, M. T., Torrey, E. F., Klebanoff, M. A., Wagner, R. L., Yolken, R. H. (2001). Maternal cytokine levels during pregnancy and adult psychosis. *Brain Behav Immun.* 15: 411–420.
11. Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science.* 358(6362): 478–482.
12. Chang, L.-C., Jamain, S., Lin, C.-W., Rujescu, D., Tseng, G. C., Sibille, E. (2014). A conserved BDNF, Glutamate- and GABA-Enriched Gene Module Related to Human Depression Identified by Coexpression Meta-Analysis and DNA Variant Genome-Wide Association Studies. *PloSOne.* 9(3): e90980.
13. Chen, J., Lui, W. O., ... Vos, M. D. (2003). The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell.* 4: 405–413.
14. Chen, X., Long, F., Cai., Chen, X., Chen, G. (2017). A novel relationship for schizophrenia, bipolar and major depressive disorder Part 3: Evidence from chromosome 3 high density association screen. *J Comp Neurol.* 526: 59–79.
15. Cheng, T. H. T., Thompson, D., Painter, J., ... Tomlinson, I. (2015). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common susceptibility polymorphisms for colorectal and endometrial cancer near SH2B3 and TSHZ1. *Sci Rep.*
16. Chiang, M.-C., Barysheva, M., McMahon, K. L., ... Thompson, P. M. (2012). Gene Network Effects on Brain Microstructure and Intellectual Performance Identified in 472 Twins. *J Neurosci.* 32(25): 8732–8745.
17. Cho, M. H., Castaldi, P. J., Hersh, C. P., ... Silverman, E. K. (2015). A Genome-Wide Association Study of Emphysema and Airway Quantitative Imaging Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 192(5): 559–569.
18. Comuzzie, A. G., Cole, S. A., Laston, S. L., Voruganti, V. S., Haack, K., Gibbs, R. A., Butte, N. F. (2012). Novel Genetic Loci Identified for the Phenophysiology of Childhood Obesity in the Hispanic Population. *PloS One.* 7(12).
19. Cornelis, M. C., Flint, A., Field, A. E., Kraft, P., Han, J., Rimma, E. B., van Dam, R. M. (2016). A genome-wide investigation of food addiction. *Obesity (Silver Spring).* 24(6): 1336–1341.
20. Costain, G., Bassett, A.S. (2012). Clinical applications of schizophrenia genetics: genetic diagnosis, risk, and counseling in the molecular era. *Appl. Clin. Genet.* 5:1–18.
21. Cox, D. A., Gottschalk, M. G., Wesseling, H., Ernst, A., Cooper, J. D., Bahn, S. (2016). Proteomic systems evaluation of the molecular validity of preclinical

- psychosis models compared to schizophrenia brain pathology. *Schizophrenia Research*. 177(1–3): 98–107.
22. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorder: a genome-wide analysis. *Lancet*. 381(9875): 1371–1379.
 23. Cui, Y., Ying, Y., van Hasselt, A., ... Tao, Q. (2008). *OPCML* Is a Broad Tumor Suppresso for Multiple Carcinomas and Lymphomas with Frequently Epigenetic Inactivation. *PloS One*. 3(8): e2990.
 24. de Kovel. C. G. F., Trucks, H., Helbig, I., Mefford, H. C., Baker, C., Leu, C., Kluck, C., Muhel, H., von Spiczak, S., ... Ostertag, P. (2010). Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain*. 133: 23–32.
 25. Doi, N., Hoshi, Y., Itokawa, M., Usui, C., Yoshikawa, T., Tachikawa, H. (2009). Persistence Criteria for Susceptibility Genes for Schizophrenia: a Discussion from an evolutionary Viewpoint. *PloS One*. 4(11).
 26. Donoghue, K., Doody, G. A., Murray, R. M., Jones, P. B., Morgan, C., Dazzan, P., Hart, J., Mazzoncini, R., MacCabe, J. H. (2014). Cannabis use, gender and age of onset of schizophrenia: Data from the ÆSOP study. *Psychiatry Research*. 215(3): 528–532.
 27. Dungan, J. R., Hauser, E. R., Qin, X., Kraus, W. E. (2013). The genetic basis for survivorship in coronary artery disease. *Front Genet*.
 28. Flagstad, P., Mørk, A., Glenthøj, B. Y., van Beek, J., Michael-Titus, A. T., Didriksen, M. (2004). Disruption of Neurogenesis on Gestational Day 17 in the Rat Causes Behavioral Changes Relevant to Positive and Negative Schizophrenia Symptoms and Alters Amphetamine-Induced Dopamine Release in Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmacology*. 29: 2052–2064.
 29. Fox, C. S., Liu, Y., White, C. C., ... Borecki, I. B. (2012). Genome-Wide Association for Abdominal Subcutaneous AND Visceral Adipose Reveals a Novel Locus of Visceral Fat in Women. *PloS Genet*. 8(5).
 30. Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B. (2006). A Common Variant in the *FTO* Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*. 316.

31. Franzek, E. J., Sprangers, N., Janssens, A. C. J. W., Van Duijn, C. M., Van De Wetering, B. J. M. (2008). Prenatal exposure to the 1944–45 Dutch „hunger winter” and addiction later in life. *Addictions*. 103(3): 433–438.
32. Fromer, M., Roussus, P., Sieberts, S. K., Sklar, P. (2016). Gene Expression Elucidates Functional Impact of Polygenic Risk for Schizophrenia. *Nat Neurosci*. 19(11): 1442–1453.
33. Funahashi, S. (2017). Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sci*. 7(5): doi: 10.3390/brainsci7050049.
34. Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., Maekawa, S. (1999). Characterization of a Novel Rat Brain Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein (Kilon), a Member of the IgLON Cell Adhesion Molecule Family. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 8224–8230.
35. Fung, H. C., Scholz, S., Matarin, M., ... Singleton, A. (2006). Genome-wide genotyping in Parkinson’s disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol*. 5(11): 911–916.
36. Gamero-Villarroel, C., C’Gonzales, L. M., Gordillo, I., Carrillo, J. A., Garcia-Herraiz, A., Flores, I., Rodriguez-Lopez, R., Gervasini, G. (2014). Impact of Negr1 genetic variability on psychological traits of patsients with eating disorders. *The Pharmacogenomics Journal*. 15(3): 278–283.
37. Genovese, A., Cox, D. M., Butler, M. G. (2015). Partial Deletion of Chromosome 1p31.1 Including only the Neuronal Growth Regulator 1 Gene in Two Siblings. *J Pediatr Genet*. 4(1): 23–28.
38. Gil, O. D., Zanazzi, G., Struky, A. F. and Salzer, J. L. (1998). Neurotrimin Mediates Bifunctional Effects on Neurite Outgrowth via Homophilic and Heterophilic Interactions. *The Journal of Neuroscience* 18(22): 9312–9325.
39. Gimelli, S., Massimiliano, L., Di Rocco, M., Caridi, G., Porta, S., Cuoco, C., Gimelli, G., Tassano, E. (2013). A rare 3q13.31 microdeletion including *GAP43* and *LSAMP* genes. *Mol Cytogenet*. 6: doi: 10.1186/1755-8166-6-52.
40. Goes, F. S., McGarth, J., Avramopoulos, D., ... Pulver, A. E. (2015). Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews. *American Journal of Medical Genetics. Part B. Neuropsychiatric Genetics: the Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 168(8): 649–659.
41. Gogos, A., Sbisà, A. M., Sun, J., Gibbons, A., Udawela, M., Dean, B. (2015). A Role for Estrogen in Schizophrenia: Clinical and Preclinical Findings. *Int J Endocrinol*. 10.1155/2015/615356.

42. Gottlieb, D. J., O'Connor, G T., Wilk, J. B. (2007). Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet*.
43. Grimwood, J., Gordon, L. A., Olsen, A., ... Lucas, S. M. (2004). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*. 428(6982): 529–535.
44. Gut-Fayand, A., Dervaux, A., Olié, J.-P., Lôo, H., Poirier, M.-F., Krebs, M.-O. (2001). Substance abuse and suicidality in schizophrenia: a common risk factor for linked to impulsivity. *Psychiatry Research*. 102(1): 65–72.
45. Hashimoto, T., Yamada, M., Maekawa, S., Nakashima, T., Miyata, S. (2008). IgLON cell adhesion molecule Kilon is a Crucial modulator for synapse number in hippocampal neurons. *Brain Research*. 1224: 1–11.
46. Hashimoto, T., Maekawa and Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem Funct*. 27(7): 996–8.
47. Helbig, I., Mefford, H. C., Sharp, A. J., Guipponi, M., Fichera, M., Franke, A., Muhle, H., de Kovel, C., Baker, C., von Spczak, S. (2009). 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet*. 41: 160–162.
48. Hirono, N., Mega, M. S., Dinov, I. D., Mishkin, F., Cummings, J. L. (2000). Left Frontotemporal Hypoperfusion Is Associated With Agression in Patients With Dementia. *Arch Neurol*. 57(6): 861–866.
49. Holliday, E. G., Nyholt, D. R., Tirupati, S., ... Mowry, B. J. (2009). Strong Evidence for a Novel Schizophrenia Risk Locus on Chromosome 1p31.1 in Homogeneous Pedigrees From Tamil Nadu, India. *The American Journal of Psychiatry*. 166(2): 206–215.
50. Hom, G., Graham, R. R., Modrek, B., ... Behrens, T. W. (2008). Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *The New England Journal of Medicine*. 358(9): 900–909.
51. Hor, K., Taylor, M. (2010). Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J Psychopharmacol*. 24: 81–90.
52. Horton, H. L., Levitt, P. (1988). A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *Journal of Neuroscience*. 8(12): 4653–4661.
53. Hosak, L., Silhan, P., Hosakova, J. (2012). Genome-wide association studies inschizophrenia, and potential etiological and functional implications of their results. *ActaMedica (Hradec Kralove)* 55(1): 3-11. doi: 10.14712/18059694.2015.67.

54. Huang, R. S., Duan, S., Bleibel, W. K., ... Dolan, M. E. (2007). A genome-wide approach to identify genetic variants that contribute to etoposide-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(23): 9758–9763.
55. Hyde, C- L-, Nagel, M. W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S. A., Wendland, J. R., Tung, J. Y., Hinds, D. A., Perlis, R. H., Winslow, A. R. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. *Nature Genetics*. 48: 1031–1036.
56. Innos, J., Philips, M.-A., Leidmaa, E.,... Vasar, E. (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour on *Lsamp*-deficient mice. *Behavioural Brain Research*. 217(1): 21–31.
57. Innos, J., Koido, K., Philips, M.-A., Vasar, E. (2013). Limbic system associated membrane protein as a potential target for neuropsychiatric disorders. *Front Pharmacol*. 4(32).
58. Jin, L., Guangtao, L., Xiaozhong, P., Bingyan, L., Bin, Y., Xinyu, T., Ming, F., Wenhong, F., Boqin, Q, and Jiangang, Y. (2003). The cloning and preliminarily functional analysis of the human neurotrimin gene. *Science in China Series C: Life Sciences* 47(2): 158–164.
59. Jones, C. A., Watson, D. J. G., Fone, K. C. F. (2011). Animal models of schizophrenia. *Br J. Pharmacol*. 164(4): 1162–1194.
60. Juhász, C., Behen, M. E., Muzik, O., Chugani, D. C., Chugani, H. T. (2001). Bilateral Medial Prefrontal and Temporal Neurocortical Hypometabolism in Children with Epilepsy and Agression. *Epilepsia*. 42(8): 991-1001.
61. Kalueff, A. V., Minasyan, A., Keisala, T., Shah, Z. H., Tuohimaa, P. Hair barbering in mice: Implications for neurobehavioural research. *Behavioural Processes*. 71(1): 8–15.
62. Kapoor, M., Wang, J.-C., Wetherill, L., ... Goate, A. (2014). Genome-wide survival analysis of age at onset of alcohol dependence in extended high-risk COGA families. *Drug Alcohol Depend*. 142: 56–62.
63. Karis, K, Eskla, K. L., Kaare, M., ... Philips, M.-A. (2018). Altered Expression Profile of IgLON Family of Neural Cell Adhesion Molecules in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients. *Front Mol Neurosci*. doi: 10.3389/fnmol.2018.00008.
64. Karol. S. E, Yang, W., Van Driest, S. L., ... Basford, M. (2015). Genetics of glucocorticoid-associated osteonecrosis in childrn with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 126(15): 1770–1776.

65. Kasckow, J., Felmet, K., Zisook, S. (2011). Managing Suicide Risk in Patients with Schizophrenia. *CNS Drugs*. 25(2): 129–143.
66. Kempton, M. J., Stahl, D., Williams, S. C. R., DeLisi, L. E. (2010). Progressive lateral ventricular enlargement in schizophrenia: A meta-analysis of longitudinal MRI studies. *Schizophrenia Research*. 120(1–3): 54–62.
67. Kim, D. K., Cho, M. H., Hersh, C. P., ... Silverman, E. K. (2012). Genome-Wide Association Analysis of Blood Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 186(12): 1238–1247.
68. Kirov, G., Pocklington, A. J., Holmans, P., ... Georgieva, L. (2012). De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 17(2): 142–153.
69. Kirov, G., Rees, E., Walters, J. T. R., ... Owen, M. J. (2014). The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay. *Biological Psychiatry*. 75(5): 378–385.
70. Koido, K., Traks, T., Balõtšev, R., ... Vasar, E. (2012) Associations between LSAMP gene polymorphism and major depressive disorder and panic disorder. *Trans Psychiatry*. 2(8).
71. Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü., Veiksaar, P., Must, A., Shlik, J., Vasar, V., Vasar, E. (2014). Associations between polymorphism of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Res*. 215(3): 797–798.
72. Large, M., Sharma, S., Compton, M. T., Slade, T., Nielssen, O. (2011) Cannabis use and earlier onset of psychosis. *Archives of General Psychiatry*. 68: 555–561.
73. Lee, A. W. S., Hengstler, H., Schwald, K., Berriel-Diaz, M., Loreth, D., ... Kirsch, M. (2012). Functional inactivation of the genome-wide association study obesity gene neuronal growth regulator 1 in mice causes a body mass phenotype. *PLoS One* 7:e41537.
74. Leeson, V. C., Harrison, I., Ron, M. A., Barnes, T. R. E., Joyce, E. M. (2012). The effect of cannabis use and cognitive reserve on age of onset and psychosis outcomes in first-episode schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 38: 873–880.
75. Levitt, P. (1984). A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*. 223: 299–301.
76. Leyboldt, F., Armangue, T. and Dalmau, J. (2015). Autoimmune encephalopathies. *Ann N Y Acad Sci*. 1338: 94–114.

77. Li, P., Fan, T. T., Zhao, R. J., Han, Y., Shi, L., Sun, H. Q., Chen, S. J., Shi, J., Lin, X., Lu, L. (2017). Altered Brain Network Connectivity as a Potential Endophenotype of Schizophrenia. *Sci Rep.* 7(1): 5483.
78. Lin, M., Eng, C., Hawk, E. T., Huang, M., Lin, J., Gu, J., Ellis, L. M., Wu, X. (2012). Identification of polymorphism in ultraconserved elements associated with clinical outcomes in locally advanced colorectal adenocarcinoma. *Cancer.* 118(24): 6188–6198.
79. Lim, C.-S., Nam, H. J., Lee, J., ... Kaang, B.-K. (2017). PKC α -mediated phosphorylation of LSD1 is required for presynaptic plasticity and hippocampal learning and memory. *Scientific Reports.* 7: doi:10.1038/s41598-017-05239-7.
80. Lin, M., Eng, C., Hawk, E. T., Huang, M., Lin, J., Gu, J., Ellis, L. M., Wu, X. (2012). Identification of polymorphism in ultraconserved elements associated with clinical outcomes in locally advanced colorectal adenocarcinoma. *Cancer.* 118(24): 6188–6198.
81. Lin, M., Eng, C., Hawk, E. T., Huang M., Greisinger, A. J., Gu, J., Ellis, L. M., Wu, X., Lin, J. (2012). Genetic variants within ultraconserved elements and susceptibility to right-and left-side colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 33(4): 841–847.
82. Liu, C.-T., Monda, K. L., Taylor, K. C., ... Fox, C. S. (2013). Genome-Wide Association of Body Fat Distribution in African Ancestry Populations Suggests New Loci. *PloS Genet.* 9(8).
83. Liu, J., Li, G., Peng, X., Yin, B., Tan, X. (2004). The cloning and preliminary functional analysis of the human neurotrimin gene. *Sci. China C. Life Sci.* 47(2): 158–164.
84. Liu, F., Arias-Vasques, A., Slegers, K., Aulchenko, Y.S., Kayser, M., Sanchez-Juan, P. (2007). A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population. *Am. J. Hum. Genet.* 81(1): 17–31.
85. Long, S. Y. (1972). Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Animal Behaviour.* 20(1): 11–12.
86. Lowther, C., Costain, G., Melvin, R., Stavropoulos, D. J., Lionel, A. C., Marshall, C. R., Scherer, S. W., Bassett, A. S. (2014). Adult expression of a 3q13.31 microdeletion. *Molecular Cytogenetics.* 7:23.
87. Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A., Forster, G. L. (2009). Consequences of Post-Weaning Social Isolation on Anxiety Behavior and Related Neural Circuits in Rodents. *Front Behav Neurosci.* doi: 10.3389/neuro.08.018.2009.

88. Lunetta, K. L., D'Agostino, R. B., Karasik, D., ... Murabito, J. M. (2007). Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Medical Genetics*.
89. Ma, L., Wu, D. D., Ma, S. L., Tan, L., Chen, X., Tang, N. L., Yao, Y. G. (2014). Molecular evolution in the CREB1 signal pathway and a rare haplotype in CREB1 with genetic predisposition to schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 57: 84–89.
90. Magri, C., Sacchetti, E., Traversa, M., Valsecchi, P., Gardella, R., Bonvicini, C., Minelli, A., Genarelli, M., Barlati, S. (2010). New Copy Number Variations in Schizophrenia. *PloS One*. 5(10): e13422.
91. Malaspina, D., Corcoran, C., Fahim, C., Berman, A., Harkavy-Friedman, J., ... Yale, S. (2002). Paternal age and sporadic schizophrenia:evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet*. 114: 299–303.
92. Malhi, G. S., Green, M., Fagiolini, A., Peaselow, E. D., Kumari, V. (2008). Schizoaffective disorder: diagnostic issues and future recommendations. *Bipolar Disord*. 10: 215–230.
93. Manes, F., Sahakian, B., Clark, L., Rogers, R, Aitken, N. A. M., Robbins, T. (2002). Decision-making processes following damage to prefrontal cortex. *Brain*. 125(3): 624–639.
94. Marauni, A., Huguet, G., Beggiato, A., ... Delorme, R. (2015). 11q24.2-25 micro-rearrangments in autism spectrum disorders: Relation to brain structures. *AJMG*. 167(12): 3019–3030.
95. McCarley, R. W., Wible, C. G., Furmin, M., Hirayasu, Y., Levitt, J. J., Fischer, I. A., Shenton, M. E. (1999). MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 45: 1099–1119.
96. McGrath, J., Saha, S., Welham, J., El Saadi, O., MacCauley, C., Chant, D. (2004). A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med*. 2(13): 1741–7015.
97. McGue, M., Zhang, Y., Miller, M. B., Basu, S., Vrieze, S., Hicks, B., Malone, S., Oetting, W. S., Iacono, W. G. (2013). A Genome-Wide Association Study of Behavioral Disinhibition. *Behav Genet*. 43(5).
98. Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E., Väli, M. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Med Genet*.

99. Mägi, R., Manning, S., Yousseif, A., Pucci, A., Santini, F., Karra, E., Querci, G., Pelosini, C., McCarthy, M. I., Lindgren, C. M., Batterham, R. L. (2013). Contribution of 23 GWAS-Identified Common Variants to Severe Obesity in European Adults Referred for Bariatric Surgery. *PloS One*. 8(8).
100. Mäki, P., Veijola, J., Jones, P. B., Murray, G. K., Koponen, H., Tienari, P., Miettunen, J., Tanskanen, P., Wahlberg K.-E., ... Koskinen, J. (2005). Predictors of schizophrenia – a review. *British Medical Bulletin*. 73–74(1): 1–15.
101. Nascimento, J. M., Martins-de- Souza, D. (2015). The proteome of schizophrenia. *NPJ Schizophr* 1:14003. doi: 10.1038/npjschz.2014.3. eCollection 2015. Review.
102. Naseer, M. I., Chaudhary, A. G., Sogaty, S., Rasool, M., Karim, S., Schulten, H. J., Bibi, F., Pushparaj, P. N., Algahtani, H. A., Al-Qahtani, M. H. (2017). Chromosomal micro-aberration in Saudi familuy with Juvenile myoclonic epilepsy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* doi: 10.2174/1871527316666170731103509.
103. Need, A. C., Ge, D., Weale, M. E., ... Goldstein, D. B. (2009). A Genome-Wide Investigation of SNPs and CNVs in Schizophrenia. *PloS Genet*. 5(2): e1000373.
104. Ntougkos, E., Rush, R., Scott, D., Frankenberg, T., Gabra, H., Smyth, J. F., Sellar, G. C. (2005). The IgLON Family in Epithelial Ovarian Cancer: Expression Profiles and Clinicopathologic Correlates. *Human Cancer Biology*. 11(16): 5764–5768.
105. O'Donovan, M. C., Craddock, N., Norton, N., Owen, M. J. (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nature Genetics*. 40: 1053–1055.
106. Okbay, A., Beauchamp, J. P., Fontana, M. A., Lee, J. J., Pers, T. H., Rietveld, C. A., Turley, P. (2016). Genome-wide association study identifies 74 loci associated with educational attainment. *Nature*. 533(7604): 539–542.
107. Okbay, A., Baselmans, B. M., De Neve, J. E., ... Cesarini, D. (2016). Genetic variants associated with subjective well-being, depressive symptoms and neuroticism identified trough genome-wide analyses. *Nature Genetics*. 48(6): 624–633.
108. Pan, Y., Wang, K.-S., Aragam, N. (2011). NTM and NR3C2 polymorphisms infuencing intelligence: Family-based association studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 35(1): 154–160.
109. Panicheron, B., Nakayama, K., Thurakitwannakarn, W., Iwamoto, S., Sukhumsirichart, W. (2012). *OPCML* Gene as a Schizophrenia Susceptibility Locus in Thai Population. *Journal of Molecular Neuriscience*. 46(2): 373–377.
110. Pappa, I., St Pourcain, B., Benke, K., ... Tiemeier, H. (2015). A genome-wide approach to children's aggressive behavior: The EAGLE consortium. *American Journal*

- of Medical Genetics. PaerB, Neuropsychiatric Genetics: the Official Publication of the Society of Psychiatric Genetics. 171(5): 562–572.
111. Perry, J. R. B., Voight, B. F., Yengo, L., ... Stéphane, C. (2012). Stratifying Type 2 Diabetes Cases by BMI Identifies Genetic Risk Variants in LAMA1 and Enrichment for Risk Variants in Lean Compared to Obese Cases. *PloS Genetics*. 8(5).
 112. Petanjek, Z., Judaš, M., Šimic, G., Rašin, R. M., Uylings, H. B. M., Rakic, P., Kostovic, I. (2011). Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *PNAS*. 108(32): 13281–13286.
 113. Pimenta, A. F., Zhukareva, V., Barbe, M. F., Reinoso, B. S., Grimley, C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. (1995). The Limbic System-Associated Membrane Protein Is an Ig Superfamily Member That Mediates Selective Neuronal Growth and Axon Targeting. *Neuron*. 15: 287–297.
 114. Pimenta, A. F., Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (*Lsamp*) gene. *Genomics*. 83(5): 790–801.
 115. Pischedda, F., Szczurkowska, J., Cirnaru, M. D., Giesert, F., Vezzoli, E., ... Ueffing, M. (2014). A cell surface biotinylation assay to reveal membrane-associated neuronal cues: *negr1* regulates dendritic arborization. *Mol Cell Proteomics* 13, 733–748. doi:10.1074/mcp.M113.031716
 116. Pischedda, F., Piccoli, G. (2016). The IgLON Family Member *Negr1* Promotes Neuronal Arborization Acting as Soluble Factor via FGFR2. *Front Mol Neurosci* 8:89. doi:10.3389/fnmol.2015.00089.
 117. Pompili, M., Amador, X. F., Girardi, P., ... Tatarelli, R. (2007). Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future. *Ann Gen Psychiatry*. doi: 10.1186/1744-859X-6-10.
 118. Power, R. A., Verweij, K. J. H., Zuhair, M., Montgomery, G. W., Henders, A. K., Heath, A. C., Madden, P. A. F., Medland, S. E., Wray, N. R., Martin, N. G. (2015). Genetic predisposition to schizophrenia associated with increased use of cannabis. *Mol Psychiatry*. 19(11): 1201–1204.
 119. Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., ... Sullivan, P. F. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460: 748–752. doi: 10.1038/nature08185
 120. Raud S., Sütt S., Luuk H., Plaas M., Innos J., Kõks S. and Vasar E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in *Wfs1*-deficient mice. *Neurosci Lett*, 460(2): 138-142.

121. Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J. and Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and Diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cell. *Journal of Cell Science* 117:3961–3973.
122. Reed, J. E., Dunn, J. R., Du Plessis, D. G., Shaw, E. J., Reeves, P., Gee, A. L., Warnke, P. C., Sellar, G. C., Moss, D. J., Walker, C. (2007). Expression of cellular adhesion molecule *OPCML* is down-regulated in gliomas and other brain tumours. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 33(1): 77–85.
123. Rietveld, C. A., Esko, T., Davies, G., Koellinger, P. D. (2014). Common genetic variants associated with cognitive performance identified using the proxy-phenotype method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(38): 13790–13794.
124. Ripke, S., O’Dushlaine, C., Chambert, K., Moran, J. L., Kahler, A. K., Akterin, S., Bergen, S. E., Collins, A. L., Crowley, J. J., ... Fromer, M. (2013). Genome-wide association analysis identifies 13 risk loci for schizophrenia. *Nat Genet*. 45: 1150–1159.
125. Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., O’Donovan, M. C. (2014). Biological Insight From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature*. 511(7510): 421–427. https://data.broadinstitute.org/mpg/ricopili/PGC_SCZ52_may13.
126. Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L., Lewerenz, J., Torres-Vega, E., Contreras, A., Giometto, B., Compa, Y., Embid, C., Vilaseca, I., Iranzo, A., Santamaria, J., Dalmau, J. and Graus, F. (2014). A novel NREM and REM parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies against IgLON5: a case series, pathological features, and characterization of the antigen. *Lancet Neurol*. 13(6): 575–586.
127. Sanz, R., Ferraro G. B. and Fournier, A. E. (2015). IgLON cell adhesion molecules are shed from the cell surface of cortical neurons to promote neuronal growth. *The Journal of biological chemistry* 290(7): 4330–4342.
128. Salyakina, D., Ma, D. Q., Jaworski, J. M., Konidari, I., Whitehead, P. L., Henson, R., Martinez, D., Robinson, J. L., Sacharow, S., Wright, H. H., Abramson, R. K., Gilbert, J. R., Cuccaro, M. L. and Pericak-Vance, M. A. (2010). Variants in Several Genomic Regions Associated with Asperg Disorder. *Autism Res*. 3(6): 303-310.
129. Sarkar, S., Hillner, K. and Velligan, D. I (2015). Conceptualization and treatment of negative symptoms in schizophrenia. *World Journal of Psychiatry* 5(4):352–361.
130. Schneider, F., Habel, U., Kessler, C., Posse, S., Grodd, W., Müller-Gärtner, H.-W. (2000). Functional Imaging of Conditioned Aversive Emotional Responses in Antisocial Personality Disorder. *Neuropsychology*. 42: 192–201.

131. Schofield, P. R., McFarland, K. C., Hayflick, J. S., Wilcox, J. N., Cho, T. M., Roy, S., Lee, N. M., Loh, H. H., Seeburg, P. H. (1989). Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J.* 8(2): 489–495.
132. Schol-Gelok, S., Janssens, A. C. J. W., Tiemeier, H., van Duijn, C. M. (2010). A Genome-Wide Screen for Depression in Two Independent Dutch Populations. *Biological Psychiatry.* 68(2): 187–196.
133. Selemon, L. D., Zecevic, N. (2015). Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Translational Psychiatry.* 5: e623.
134. Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, G. J., ... Gabra, H. (2003). *OPCML* at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature Genetics.* 34: 337–343.
135. Serafini, J. L., Pompili, M., Innamorati, M., Rihmer, Z., Sher, L., Girardi, P. (2012). Can cannabis increase the suicide risk in psychosis? a critical review. *Curr Pharm Des.* 18: 5165–5187.
136. Singh, K., Loreth, D., Pöttker, B., ... Schäfer, M. K. E. (2018). Neuronal Growth and Behavioral Alteration in Mice Deficient for the Psychiatric Disease-Associated *Negr1* Gene. *Front Mol Neurosci.* doi: 10.3389/fnmol.2018.00030
137. Sipos, A., Rasmussen, F., Harrison, G., Tynelius, P., Lewis, G., Leon, D. A., Gunnell, D. (2004). Paternal age and schizophrenia: a population based cohort study. *BMJ.* 329(7474): 1070.
138. Siris, S. G. (2001). Suicide and schizophrenia. *J Psychopharmacol.* 15:127–135.
139. Sniekers, S., Stringer, S., Watanabe, K., ... Posthuma, D. (2017). Genome-wide association meta-analysis of 78,308 individuals identifies new loci and genes influencing human intelligence. *Nature Genetics.* 49: 1107–1112.
140. Sokolowski, M., Wasserman, J., Wasserman, D. (2016). Polygenic associations of neurodevelopmental genes in suicide attemp. *Molecular Psychiatry.* 21: 1381–1390.
141. Soraes, J. C., Mann, J. J. (1997). The anatomy of mood disorders-review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry.* 41: 86–106.
142. Speliotes, E. K., Willer, C. J, Berndt, S. I., Loos, R. J. F. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nature Genetics.* 42: 937–948.
143. Stefanis, N. C., Dragovic, M., Power, B. D., Jablensky, A., Castle, D., Morgan, V. A. (2013). Age at initiation of cannabis use predicts age of onset of psychosis. *Schizophrenia Bulletin.* 39(2): 251–254.

144. Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu D et al. (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460(7256): 744–747. doi: 10.1038/nature08186
145. Stolp, H. B., Turnquist, C., Dziegielewska, K. M., Saunders, N. R., Anthony, D. C., Molnár, Z. (2011). Reduced ventricular proliferation in the foetal cortex following maternal inflammation in the mouse. *Brain*. 134(11): 3236–3248.
146. Strozik, E., Festing, M. F. W. (1981). Whisker trimming in mice. *Lab Anim*. 15(4): 309–312.
147. Struyk, A. F., Canoll, P. D., Wolfgang, M. J., Rosen, C. L., D'Eustachio, P., Salzer, J. L. (1995). Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *Journal of Neuroscience*. 15(3): 2141–2156.
148. Sullivan, P. F., Kendler, K. S., Neale, M. C. (2003). Schizophrenia as a Complex Trait Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry*. 60(12): 1187–1192.
149. Sung, Y. J., de las Fuentes, L., Schwander, K. L., Simino, J., Rao, D. C. (2015). Gene-Smoking Interactions Identify Several Novel Blood Pressure Loci in the Framingham Heart Study. *Am J Hypertens*. 28(3):343–354.
150. Zammit, S., Allebeck, P., Andreasson, S., Lundberg, I., Lewis, G. (2002). Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscript of 1969: historical cohort study. *BMJ*. 325(7374): 1199.
151. Zeng, Z., Shaffer, J. R., Wang, X., ... Marazita, M. L. (2013). Genome-wide Association Studies of Pit-and-Fissure- and Smooth-surface Caries in Permanent Dentition. *J Dent Res*. 92(5): 432–437.
152. Zhang, M., Song, F., Liang, L., ... A. A., Han, J. (2013). Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. *Hum Mol Genet*. 22(14): 2948–2959.
153. Tassano, E., Gamucci, A., Celle, M. E., Ronchetto, P., Cuoco, C., Gimelli, G. (2015). Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of a de novo Interstitial 1p31.1p31.3 Deletion in a Boy with Moderate Intellectual Disability and Severe Language Impairment. *Cytogenet Genom Res*. 146: 39–43.
154. The International Schizophrenia Consortium. (2008). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature*. 455(7210): 237–241.
155. Throbleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Stefansson, K. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature genetics*. 41: 18–24.

156. Ulmer, M., Li, J., Yaspan, B. L., Ozel, A. B., Richards, J. E., Moroi, S. E. (2012). Genome-wide analysis of central corneal thickness in primary open-angle glaucoma cases in the NEIGHBOR and GLAUGEN consortia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53(8): 4468–4474.
157. Umeda-Yano, S., Hashimoto, R., Yamamori, H., Weickert, C. S., Yasuda, Y., Ohi, K., Fujimoto, M., Ito, A., Takeda, M. (2014). Expression analysis of the genes identified in GWAS of the postmortem brain tissues from patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters*. 568: 12–16.
158. Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J., ... Vasar, E. (2017). Promoter-Specific Expression and Genomic Structure of IgLON Family Genes in mouse. *Front Neurosci* 11, 38. doi: 10.3389/fnins.2017.00038
159. Veerappa, A. M., Saldanha, M., Padakannaya, P., Ramachandra, N. B. (2013). Family-based genome-wide copy number scan identifies five new genes of dyslexia involved in dendritic spine plasticity. *Journal of Human Genetics*. 58: 539–547.
160. Velásquez, E., Nogueira, F. C. S., Velásquez, I., Schmitt, A., Falkai, P., Domont, G. B., Martins-de-Souza, D. (2017). Synaptosomal Proteome of the Orbitofrontal Cortex from Schizophrenia Patients Using Quantitative Label-Free and iTRAQ-Based Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* 16(12): 4481–4494.
161. Völlm, B., Richardson, P., Stirling, J., Elliott, R., Dolan, M., Chaudhry, I., Ben, C. D., Mckier, S., Anderson, I., Deakin, B. (2004). Neurobiological substrates of antisocial and borderline personality disorder: preliminary results of a functional fMRI study. *Criminal Behaviour and Mental Health*. 14(1): 39–54.
162. Wang, L., Hauser, E. R., Shah, S. H., Seo, D., Sivashanmugam, P., Exum, S. T., Gregory, S. G. et al. (2009). Polymorphism of the Tumor Suppressor Gene LSAMP are Associated with Left Main Coronary Artery Disease. *Ann Hum Genet.* 72: 443–453.
163. Wang, K.-S., Liu, X.-F., Aragam, N. (2010). A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophrenia Research*. 124(1–3): 192–199.
164. Weickert, C. S., Sheedy, D., Rothmond, D. A., Garrick, T. (2010). Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *Aust. N. Z. J. Psychiatry*. 44: 59–70.
165. Wheeler, E., Huang, N., Bochukova, E., ... Farooqi, I. S. (2013). Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. *Nat Genet.* 45(5): 513–517.

166. Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J., Hirschhorn, J. N. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet.* 41(1): 25–34.
167. Williams, N. M., Zaharieva, I., Martin, A., Langley, K., Mantripragada, K., Fossdal, R., Stefansson, H., Stefansson, K., Magnusson, P., Gudmundsson, O. O., et al. (2010). Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet.* 376: 1401–1408.
168. Wilson, W., Mathew, R., Turkington, T., Hawk, T., Coleman, R. E., Provenza, J. (2000). Brain morphological changes and early marijuana use: a magnetic resonance and positron emission tomography study. *J Addict Dis.* 19: 1–22.
169. Xie, T., Deng, L., Mei, P., Wang, B., Zhang, J., Lin, J., Wei, W., Zhang, X., Xu, R. (2014). Genome-wide association study combining pathway analysis for typical sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Chinese Han population. *Neurobiology of Aging.* 35(7).
170. Yamada, M., Hashimoto, T., Hayashi, N., Higuchi, M., Murakami, A., Nakashima, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2007). Synaptic adhesion molecule OBCAM; synaptogenesis and dynamic internalization. *Brain Research.* 1165: 5–14.
171. Yang, Y., Raine, A. (2009). Prefrontal Structural and Functional Brain Imaging findings in Antisocial, Violent, and Psychopathic Individuals: A Meta-Analysis. *Psychiatry Res.* 174(2): 81-88.
172. Yang, Q., Kathiresan, S., Lin, J.-P., Tofler, G. H., O'Donnell, C. J. (2007). Genome-wide association and linkage analyses of hemostatic factors and hematological phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.*
173. Ye, T., Lipska, B. K., Tao, R., Hyde, T. M., Wang, L., Li, C., Choi, K. H., Straub, R. E., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R. (2012). Analysis of CNVs in Brain DNA from Patients with Schizophrenia and Other Psychiatric Disorders. *Biol Psychiatry.* 72(8): 651–654.
174. Yu, B., Barbalic, M., Brautbar, A., ... Boerinkle, E. (2013). Association of Genome-Wide Variation with Highly Sensitive Cardiac Troponin-T (hs-cTnT) Levels in European- and African-Americans: A Meta-Analysis from the Atherosclerosis Risk in Communities and the Cardiovascular Health Studies. *Circ Cardiovasc Genet.* 6(1): 82–88.
175. Yu, D., Mathew, C. A., Scharf, J. M., ... Pauls, D. L. (2015). Cross-Disorder Genome-Wide Analyses Suggest a Complex Genetic Relationship Between Tourette Syndrome and Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry.* 172(1): 82–93.

176. Yue, W., Yu, X., Zhang, D. (2017). Progress in genome-wide association studies of schizophrenia in Han Chinese populations. NPJ Schizophr 3(1):24. doi: 10.1038/s41537-017-0029-1

Kasutatud õpikud

1. Squire, L. R. (2009). Prefrontal Cortex: Structure and Anatomy, lk 909–918. Barbas, H. Encyclopedia of Neuroscience. Elsevier Ltd.
2. Ellenbroek, B. A. (2010). Schizophrenia, lk 188–195. Koob, G. F., le Moal, M., Thompson, R. F. Encyclopedia of Behavioral Neuroscience. Elsevier Ltd.

Kasutatud veebilehed

1. <https://www.kliinikum.ee/psychhiaatrikliinik/lisad/ravi/RHK/RHK10-FR17.htm>, külastuse kuupäev 17.02.2018.
2. NCBI 1 – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4045>, külastatud 02.05. 2018.
3. NCBI 2 – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4978>, külastatud 02.05. 2018.
4. NCBI 3 – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50863>, külastatud 02.05. 2018.
5. NCBI 4 – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/257194>, külastatud 02.05. 2018.
6. NCBI 5 – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/210094>, külastatud 02.05. 2018.
7. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>, külastatud 26.05.2018

Bakalaureusetöö

1. Kaare, M. (2016). IgLON valke kodeerivate geenide ekspressiooni muutused skisofreeniapatsientide dorsolateraalses frontaalkoores. Tartu Ülikool.

LISAD

Lisa 1

Assotsiatsiooniuringutes inimese IgLON geenides asuvate SNP-dega seostunud fenotüübid

Kr: kromosoom; Eur: sagedus Euroopas; Maj/min: major/minor

SNP	Kr	Geen	Asendus	Maj/min	Eur	SNP asukoht	Fenotüüp	P-väärtus	Viide
rs4937664	11	NTM	C→G	G/C	85%	Intron, geeni esimeses pooles	Intelligentsus	9.95E-04	Pan jt., 2010
rs411280	11	NTM	A→T	A/T	35%	Intron, geeni esimeses pooles	Intelligentsus	7.64E-04	Pan jt., 2010
rs1546587	11	NTM	G→A	G/A	4%	Intron, geeni esimeses pooles	Intelligentsus	3.41E-04	Pan jt., 2010
rs7943905	11	NTM	G→A	G/A	14%	Intron, geeni keskosas	Intelligentsus	7.02E-04	Pan jt., 2010
rs7933020	11	NTM	G→A	G/A	96%	Intron, geeni esimeses pooles	Intelligentsus	6.27E-04	Pan jt., 2010
rs7943322	11	NTM	T→G	T/G	37%	Intron, geeni teises pooles	Intelligentsus	5.22E-04	Pan jt., 2010
rs4937672	11	NTM	A→T	A/T	41%	Intron, geeni teises pooles	Intelligentsus	2.75E-04	Pan jt., 2010
rs1036433	11	NTM	C→T	C/T	49%	Intron, geeni keskosas	Intelligentsus	9.27E-04	Pan jt., 2010
rs4937665	11	NTM	T→C	T/C	15%	Intron, geeni keskosas	Intelligentsus, söömissõltuvus	6.97E-04	Pan jt., 2010; Cornelis jt., 2016
rs12576852	11	NTM	C→T	C/T	4%	Intron, geeni esimeses pooles	Intelligentsus	5.99E-04	Pan jt., 2010
rs992564	11	NTM	G→T	G/T	7%	Intron, geeni esimeses pooles	Bipolaarne või käitumishäire, skisofreenia	4.06E-06	Wang jt., 2010
rs1550976	11	NTM	C→T	C/T	42%	Intron, geeni esimeses pooles	Aspergeri sündroom	2.30E-06	Salyakina jt., 2010
rs1448363	11	NTM	C→T	C/T	29%	Intron, geeni esimeses pooles	Aspergeri sündroom	2.30E-06	Salyakina jt., 2010
rs7925908	11	NTM	C→T	C/T	43%	ca 100 kb ülesvoolu	Glükokortikoididest indutseeritud osteonekroos	1.47E-06	Karol jt., 2015
rs75038630	11	NTM	C→A	C/A	6%	Intron, geeni keskosas	Söömissõltuvus	5.00E-06	Cornelis jt (2016)
rs1550973	11	NTM	A→G	G/A	68%	Intron, geeni alusosas	Hariduslikud saavutused	1.998E-09	Okbay jt., 2016
rs4468361	11	NTM	C→T	C/T	43%	Intron, geeni teises pooles	Krooniline obstruktiivne kopsuhaigus	8.00E-06	Kim jt., 2012
rs35974940	11	NTM	C→T	G/T	3%	Intron, geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	1,26E-06	Brevik jt., 2016
rs34807050	11	NTM	T→C	T/C	3%	Intron, geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	1.84E-06	Brevik jt., 2016
rs34547019	11	NTM	C→T	C/T	3%	Geeni alguse regulaatorpiirkond	ADHD-ga seotud agressiivsus	2.67E-06	Brevik jt., 2016
rs35042821	11	NTM	A→C	A/C	3%	ca 10 kb ülesvoolu	ADHD-ga seotud agressiivsus	3.20E-06	Brevik jt., 2016
rs35665773	11	NTM	C→T	C/T	3%	Geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	3.25E-06	Brevik jt., 2016
rs34588147	11	NTM	G→A	G/A	3%	Geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	3.59E-06	Brevik jt., 2016

SNP	Kr	Geen	Asendus	Maj/min	Eur	SNP asukoht	Fenotüüp	P-väärtus	Viide
rs12804059	11	NTM	C→T	C/T	3%	Geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	3.81E-06	Brevik jt., 2016
rs35385808	11	NTM	C→T	C/T	3%	Intron, geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	5.28E-06	Brevik jt., 2016
rs7119590	11	NTM	G→C	G/C	3%	Geeni alguses	ADHD-ga seotud agressiivsus	5.89E-06	Brevik jt., 2016
rs11222869	11	NTM	A→G	A/G	44%	Intron, geeni teises pooles	Etoposiidide indutseeritud tsütotoksilisus	9.00E-05	Huang jtk., 2007
rs7481514	11	NTM	G→A	G/A	32%	Intron, geeni algusosas	Primaarne avatudnurga glaukoom	1.03E10-5	Abu-Amero jt., 2015
rs6590611	11	NTM	G→T	G/T	33%	Intron, geeni teises pooles	Kolorektaalne adenokartsinoom	2.00E-02	Lin jt., 2012
rs12098973	11	NTM	A→G	A/G	82%	Intron, geeni teises pooles	Südame Troponin-T tase	1.15E-06	Yu jt., 2013
rs12421680	11	NTM	A→G	G/A	69%	Intron, geeni esimeses pooles	Päikesepõletused (nahavähi risk)	5.6E-06	Zhang jt., 2013
rs11603690	11	NTM	T→C	T/C	3%	Intron, geeni esimeses pooles	Rasvumisega seotud tunnused	9.20E-06	Comuzzie jt., 2012
rs11601906	11	NTM	T→C	T/C	3%	Intron, geeni esimeses pooles	Rasvumisega seotud tunnused	2.00E-06	Comuzzie jt., 2012
rs3099797	11	NTM	C→T	C/T	43%	Intron, geeni lõpuosas	Tüüp 2 diabeet	3.38E-05	Below jt., 2011
rs1993709	1	NEGR1	G→A	G/A	18%	ca 100 kb ülesvoolu	Varajase algusega rasvumine/ BMI	5.09E-13	Wheeler jt., 2013;
rs2815752	1	NEGR1	G→A	A/G	64%	Vähem kui 100 kb ülesvoolu	Ülekaalulisus/BMI	3.6E-04	Mägi jt., 2013
rs2568958	1	NEGR1	G→A	A/G	64%	Vähem kui 50 kb ülesvoolu	Ülekaalulisus/BMI	1.00E-11	Thorleifsson jt., 2008
rs3101336	1	NEGR1	T→C	C/T	64%	vähem kui 10 kb ülesvoolu	Varajase algusega ülekaalulisus	2.21E-08	Wheeler jt., 2013
rs2815752	1	NEGR1	G→A	A/G	64%	Vähem kui 50 kb ülesvoolu	Ülekaalulisus	6.00E-08	Willer jt., 2008
rs11209948	1	NEGR1	T→G	T/G	36%	Vähem kui 50 kb ülesvoolu	MDD	1.71E-08	Hyde jt., 2016
rs1432639	1	NEGR1	C→A	A/C	64%	Vähem kui 50 kb ülesvoolu	MDD	1.28E-08	Hyde jt., 2016
rs2422321	1	NEGR1	G→A	G/A	47%	ca 500 kb ülesvoolu	MDD	2.69E-06	Hyde jt., 2016
rs12141391	1	NEGR1	C→A	C/A	6%	Intron, geeni keskosas	Süsteemne erütematoosne luupus	7.00E-06	Hom jt., 2008
rs12134600	1	NEGR1	C→A	C/A	12%	Intron, geeni esimeses pooles	Hariduslikud saavutused	6.00E-08	Rietveld jt., 2014
rs10493485	1	NEGR1	A→T	A/T	30%	Intron, geeni teises pooles	Hemostaatiline/ hematoloogiline fenotüüp	1.60E-06	Yang jt., 2007
rs12740031	1	NEGR1	G→A	G/A	37%	Intron, geeni teises pooles	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs10789322	1	NEGR1	G→A	G/A	37%	Intron, geeni teises pooles	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs6659202	1	NEGR1	T→A	T/A	28%	Intron, geeni keskosas	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs591540	1	NEGR1	G→T	G/T	50%	Intron, geeni keskosas	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs954299	1	NEGR1	C→A	C/A	50%	Intron, geeni teises pooles	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs2422021	1	NEGR1	T→C	T/C	50%	Intron, geeni teises pooles	Söömishäired		Gamero-Villarroel jt., 2015
rs35998080	1	NEGR1	G→T	G/T	47%	ca 500 kb ülesvoolu	Skisofreenia	8.00E-11	Goes jt., 2015
rs7531932	1	NEGR1	A→G	A/G	45%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	4.00E-06	Goes jt., 2015
rs34305371	1	NEGR1	G→A	G/A	9%	Intron, geeni alguses	Hariduslikud saavutused	4.00E-12	Okbay jt 2016
rs12143094	1	NEGR1	G→C	G/C	4%	Intron , geeni teises pooles	Hariduslikud saavutused	3.00E-09	Rietveld jt., 2014

SNP	Kr	Geen	Asendus	Maj/min	Eur	SNP asukoht	Fenotüüp	P-väärtus	Viide
rs10493495	1	NEGR1	A→G	A/G	1%	Intron, geeni alguses	Mentaalne kompetentsus	8.90E-08	Lunetta jt., 2007
rs988421	1	NEGR1	C→T	C/T	49%	Intron, geeni esimeses pooles	Parkinsoni tõbi	2.00E-05	Fung jt 2006
rs9787796	11	OPCML	C→T	C/T	13%	Intron, geeni teises pooles	Varase noorukiea agressiivne käitumine	2.00E-06	Pappa jt., 2015
rs7104871	11	OPCML	C→T	T/C	57%	Intron, geeni esimeses pooles	Vererõhk (seoses suitsetamisega)	7.00E-08	Sung jt., 2015
rs4379857	11	OPCML	G→A	G/A	5%	Intron, geeni esimeses pooles	Skisofreenia	9.00E-03	Ma jt., 2014
rs2078454	11	OPCML	A→C	C/A	21%	Intron, geeni esimeses pooles	Kaaries	6.05E-06	Zeng jt., 2013
rs1793257	11	OPCML	T→C	C/T	96%	Intron, geeni teises pooles	Alkoholism	7.00E-06	McGue jt., 2013
rs1567127	11	OPCML	A→G	A/G	17%	Intron, geeni keskosas	Vistseraalse rasvkoe/nahaaluse rasvkoe suhe	1.30E-06	Fox jt., 2012
rs1940013	11	OPCML	T→C	C/T	71%	Geeni lõpus	Uni ja ööpäevane rütm	6.00E-06	Gottlieb jt., 2007
rs897102	11	OPCML	T→C	T/C	17%	Regulaator piirkonnas	Intelligentsus	8.00E-09	Chiang jt., 2012
rs11238009	11	OPCML	C→A	C/A	20%	Geenide vahelises piirkonnas	Intelligentsus	4.00E-08	Chiang jt., 2012
rs10894606	11	OPCML	A→C	A/C	5%	Intron, geeni teises pooles	Intelligentsus	2.00E-08	Chiang jtk., 2012
rs10844932	12	OPCML	G→A	A/G	98%	Geenide vahelises piirkonnas	Intelligentsus	2.00E-08	Chiang jt., 2012
rs11829528	12	OPCML	G→A	A/G	98%	Geenide vahelises piirkonnas	Intelligentsus	2.00E-09	Chiang jt., 2012
rs137852691	11	OPCML	C→G				Munasarja kasvaja		Sellar jt., 2003
rs3016384	11	OPCML	C→T	T/C	50%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	2.64E-04	Doi jt. 2009
rs1784519	11	OPCML	G→A	G/A	24%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	3.60E-04	Panichareon jt. 2012
rs7117082	11	OPCML	T→G	G/T	91%	Intron, geeni alguses	Amüotroofiline lateraalskleroos (sporaadiline)	8.00E-09	Xie jt., 2014
rs10894604	11	OPCML	G→T	G/T	30%	Ekson, geeni teises pooles	Vöökoha/puusaümbermõõdu suhe	3.80E-07	Liu jt., 2013
rs1939498	11	OPCML	G→A	G/A	50%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	1.30E-02	Panichareon jt., 2012
rs1894193	11	OPCML	T→C	T/C	46%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	2.30E-02	Panichareon jt., 2012
rs2917569	11	OPCML	T→C	T/C	50%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia	4.00E-07	Goes jt., 2015
rs1941213	11	OPCML	A→C	A/C	28%	Intron, geeni esimeses pooles	Skisofreenia	3.41E-10	Athanasu jt., 2010
rs12276491	11	OPCML	T→C	T/C	7%	Intron, geeni keskosas	MDD	5.00E-05	Schol-Gelok jt., 2010
rs1793257	11	OPCML	T→C	C/T	96%	Intron, geeni teises pooles	Alkoholism	7.00E-06	McGue jt., 2013
rs2918213	3	LSAMP	A→G	G/A	62%	Intron 6, geeni lõpuosas	Lõpuleviidud suitsiid	4.60E-02	Must jt., 2008
rs2918215	3	LSAMP	C→T	C/T	13%	Intron 6, geeni lõpuosas	Lõpuleviidud suitsiid	4.30E-02	Must jt., 2008
rs4831129	3	LSAMP	G→T	T/G	70%	Intron 1	Lõpuleviidud suitsiid	4.10E-02	Must jt., 2008
rs9874470	3	LSAMP	C→T	T/C	69%	Intron 1	Lõpuleviidud suitsiid	4.20E-02	Must jt., 2008
rs4831089	3	LSAMP	G→A	G/A	45%	Intron 1	MDD, paanikahäire	1.80E-02	Koido jt., 2012
rs16824691	3	LSAMP	A→T	T/A	81%	Intron 1	MDD, paanikahäire	4.00E-03	Koido jt., 2012

SNP	Kr	Geen	Asendus	Maj/min	Eur	SNP asukoht	Fenotüüp	P-väärtus	Viide
rs1461131	3	LSAMP	C→T	C/T	44%	Intron 1	MDD, paanikahäire	3.30E-02	Koido jt., 2012
rs9874470	3	LSAMP	C→T	T/C	69%	Intron 1	MDD, meeste enesetapud, paanikahäire	< 0.001	Koido jt., 2012
rs1543176	3	LSAMP		A/G	0%	ca 200 kb ülesvoolu (LSAMP-A53)	Skisofreenia, bipolaarne häire, MDD, paanikahäire	5.90E-15	Koido jt., 2014
ss70458782	3	LSAMP	G→A	A/G	78%	Geenide vahelise piirkonnas	Vasaku pärgarteri haigus	1.30E-02	Wang jt., 2008
rs45530132	3	LSAMP	T→G	G/T	85%	ca 1000 kb ülesvoolu	Vasaku pärgarteri haigus	1.50E-02	Wang jt., 2008
rs1875518	3	LSAMP	A→G	G/A	63%	ca 1000 kb ülesvoolu	Vasaku pärgarteri haigus	5.00E-03	Wang jt., 2008
rs1676232	3	LSAMP	A→G	G/A	68%	ca 1000 kb ülesvoolu	Vasaku pärgarteri haigus	2.20E-02	Wang jt., 2008
rs4404477	3	LSAMP	T→C	C/T	87%	Rohkem kui 1000 kb ülesvoolu	Vasaku pärgarteri haigus	3.00E-03	Wang jt., 2008
rs1462845	3	LSAMP	T→C	T/C	37%	ca 1000 kb ülesvoolu	Südamehaigus	3.20E-02	Dungan jt., 2013
rs6788787	3	LSAMP	C→T	C/T	14%	ca 800 kb ülesvoolu	Südamehaigus	2.00E-03	Dungan jt., 2013
rs1461131	3	LSAMP	G→A	G/A		Intron 1	MDD, paanikahäire	<0.001; 0,033	Koido jt., 2012
rs4831089	3	LSAMP	G→A	G/A	45%	Intron 1	MDD, paanikahäire	<0.001; 0.018	Koido jt., 2012
rs9874470	3	LSAMP	C→T	T/C	69%	Intron 1	MDD, paanikahäire	<0.001; 0.059	Koido jt., 2012
rs16824691	3	LSAMP	A→T	T/A	81%	Intron 1	MDD, paanikahäire	0.004; 0.210	Koido jt., 2012
rs16824395	3	LSAMP	A→G	A/G	14%	Intron 1	Alkoholism	6.00E-06	Kapoor jt., 2014
rs149183310	3	LSAMP	A→T	A/T	11%	Intron, geeni esimeses pooles	Obsessiiv-kompulsiivne häire ja Touretti sündroom	2.00E-06	Yu jt., 2015
rs4378954	3	LSAMP	C→T	T/C	8%	Intron, geeni teises pooles	Pärasoolevähk ja endomeetriumi vähk	4.00E-07	Cheng jt., 2015
rs111646341	3	LSAMP	G→A	G/A	7%	Intron, geeni esimeses pooles	Emfüseem	9.00E-07	Cho jt., 2015
rs57682148	3	LSAMP	A→C	A/C	0%	Intron, geeni teises pooles	Subjektiivne heaolu	3.00E-06	Okbay jt., 2016
rs9289034	3	LSAMP	A→G	G/A	64%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia, bipolaarne häire	6.20E-36	Chen jt., 2017
rs9869887	3	LSAMP	A→G	G/A	64%	Intron, geeni teises pooles	Skisofreenia, bipolaarne häire	1.40E-23	Chen jt., 2017

Lisa 2

Tabel 7. qPCR kasutatud praimerid ja sondid

Geen		Forward praimer	Sondi järjestus	Reverse praimer
<i>LSAMP</i>	1a	5'-TCCTGTCCCTCTTCTCATTGC-3'	5'-AACCGAGGCACGGACAAC-3'	5'-TTCTTGTCTTCTACAACGCACCTG-3'
	1b	5'-GATTGCTCTGCCTTCTTCCCAC-3'		
<i>NTM</i>	1a	5'-TGGCTGCTCTGTGTCTCTTCC-3'	5'-CGGAGATGCCACCTT-3'	5'-GGTGACCCGGTTGTCAATAGTG-3'
	1b	5'-TCTCAGGCTGCTGTTTCTTGTA-3'		
<i>OPCML</i>	1a	5'-TCGGCGACAACCTGCCCTGCT-3'		5'-GGTTACCCGGTCATCTATGGTA-3'
	1b	5'-TCTCAGGCTGCTGTTTCTTGTA-3'		
<i>NEGR1</i>		5'-TGCTCGAACCAGTGGCTGGC-3'	5 TGGGCGGCCGTGGACAA-3'-	5'-CCCTTTGAAGCTCCATCTTCCA-3'
<i>IgLON5</i>		5'-TGGCCGTCATCAGCCGAG-3'	5'-ACGCCACCCTCAGCTGCT-3'	5'-TGGAGCGGTTTCTAGCCAGGC-3'
<i>HPRT1</i>		5'-GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3'	5'-TTTCACCAGCAAGCTTGCGACCTTGA-3'	5'-AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'

LSAMP1aCDS	-----ATGAGGACCTA-CTGGCTGCACAGCGTCTGGGTGCTGGG
LSAMP1bCDS	-----ATGGTCAGGAGAGTTTCAGCCGGATCGGAAACAGTTGC-CACTGGT
NTM1aCDS	-----ATGAAAACCATCCAG---CCAAAAATGCAC-AATTCTATCTCTTGGGCAAT
NTM1bCDS	-----ATGGGGGTCTGTGGGTACCTGTTCCCTGCCCTGGAAGTGCCTCGTGGTCTGTG
OPCML1aCDS	-----ATGTACCA--TCCTGCCT----ACTGGGTCTGCTTCTCTCG
OPCML1bCDS	-----ATGGGGGTCTGTGGGTACCTGTTCCCTGCCCTGGAAGTGCCTCGTGGTCTGTG
NEGR1CDS	ATGGACATGATGCTGTTGGTGCAGGGTGCTTGTGTGCTCGAACCAGTGGCTGG-CGGCGGT
IGLON5CDS	-----ATGCCCCCCTGCGCCCGGGGCCCGGCTC-----CGGCTTCTCGCCGCC

forward praimerid seondumissait

LSAMP1aCDS	CTTTTTCCTGTC-CCTCTTC--TCATTGCA---AGGACTGCCTGTT---CGCAGCGTGGA
LSAMP1bCDS	CCTACTGAGATT-GCTCTGCCTTCTTCCAC--AGGACTGCCTGTT---CGCAGCGTGGA
NTM1aCDS	CTTCACGGGGCTGGCTGCTCTGTGTCTCTTCCAAGGAGTGCCCGTG---CGCAGCGGAGA
NTM1bCDS	TCTCTCAGGCT--GCTGTTCTTGTATCCAC--AGGAGTGCCCGTG---CGCAGCGGAGA
OPCML1aCDS	GCGACAA--CT--GCCCTGCTCTTCATCC-C--AGGAGTGCCCGTG---CGCAGCGGAGA
OPCML1bCDS	TCTCTCAGGCT--GCTGTTCTTGTATCCAC--AGGAGTGCCCGTG---CGCAGCGGAGA
NEGR1CDS	GTCCTCAGCCT-GTGCTGCCTGCTACCCTC--CTGCCCTCCCGCTGGACAGAGTGTGGA
IGLON5CDS	GCCGCCCTGGCCGGCTTGGCCGT-CATCAGCCGAGGGCTGCTCTCC---CAGAGCCTGGA
	* * * * *

LSAMP1aCDS	TTTTAACCGAGG-----CACGGACAACATCACCGTGAGGCAGGGGGACACAGCCATCCT
LSAMP1bCDS	TTTTAACCGAGG-----CACGGACAACATCACCGTGAGGCAGGGGGACACAGCCATCCT
NTM1aCDS	TGCCACCTTCCCCAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGGAGAGCGCCACCCT
NTM1bCDS	TGCCACCTTCCCCAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGGAGAGCGCCACCCT
OPCML1aCDS	TGCCACCTTCCCCAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGGAGAGCGCCACCCT
OPCML1bCDS	TGCCACCTTCCCCAAAGCTATGGACAACGTGACGGTCCGGCAGGGGGAGAGCGCCACCCT
NEGR1CDS	CTTCCCCCTGGGCG---GCCGTGGACAACATGATGGTCAGAAAAGGGGACACGGCGGTGCT
IGLON5CDS	GTTCAACTCTCC-----TGCCGACAACATACACAGTGTGTGAAGGTGACAACGCCACCCT
	* * * * *

Ekson 1-2

ühenduskoht

reverse praimerid seondumissait

LSAMP1aCDS	CAG GTGCGTTGTAGAAGACAAGAACTCAAAGGTGGCCTGGTTGAACCGTTCTGGCA-
LSAMP1bCDS	CAG GTGCGTTGTAGAAGACAAGAACTCAAAGGTGGCCTGGTTGAACCGTTCTGGCA-
NTM1aCDS	CAG GTGCACTATTGACAACCGGGTCACCCGGGTGGCCTGGCTAAACCGCAGCACCA-
NTM1bCDS	CAG GTGCACTATTGACAACCGGGTCACCCGGGTGGCCTGGCTAAACCGCAGCACCA-
OPCML1aCDS	CAG GTGTACCATAGATGACCGGGTAACCCGGGTGGCCTGGCTAAACCGCAGCACCA-
OPCML1bCDS	CAG GTGTACCATAGATGACCGGGTAACCCGGGTGGCCTGGCTAAACCGCAGCACCA-
NEGR1CDS	TAG GTGTTATTTGGAAGATGGAGCTTCAAAGGGTGCCTGGCTGAACCGGTCAAGTA-
IGLON5CDS	CAG CTGCTTCATCGACGACGACGTGACCCGCGTGGCCTGGCTGAACCGGTCCAACA-
	** ** * * *

Joonis 15. Reverse praimerid, forward praimerid ning sonid seondumissaidid. Halliga on märgitud unikaalsed 5'-regioonid, mis on 1a/1b isovormidel erinevad. * – konserveerunud nukleotiidid. (modifitseeritud Karis jt., 2018 järgi)



Altered Expression Profile of IgLON Family of Neural Cell Adhesion Molecules in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients

Karina Karis^{1,2}, Kattri-Liis Eskla^{1,2}, Maria Kaare^{1,2}, Karin Täht³, Jana Tuusov^{4,5}, Tanel Visnapuu^{1,2}, Jürgen Innos^{1,2}, Mohan Jayaram^{1,2}, Tõnis Timmusk⁶, Cynthia S. Weickert^{7,8}, Marika Väli^{4,5}, Eero Vasar^{1,2} and Mari-Anne Philips^{1,2*}

¹ Department of Physiology, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia, ² Centre of Excellence for Genomics and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia, ³ Institute of Psychology, University of Tartu, Tartu, Estonia, ⁴ Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia, ⁵ Estonian Forensic Science Institute, Tallinn, Estonia, ⁶ Department of Chemistry and Biotechnology, Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia, ⁷ Faculty of Medicine, School of Psychiatry, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia, ⁸ Schizophrenia Research Institute, Neuroscience Research Australia, Randwick, NSW, Australia

OPEN ACCESS

Edited by:

Giovanni Piccoli,
University of Trento, Italy

Reviewed by:

Enrico Doménici,
University of Trento, Italy
Gianluca Serafini,

San Martino Hospital, University of
Genoa, Italy

*Correspondence:

Mari-Anne Philips
marianne.philips@ut.ee;
maphilips@gmail.com

Received: 26 October 2017

Accepted: 08 January 2018

Published: 29 January 2018

Citation:

Karis K, Eskla K-L, Kaare M, Täht K, Tuusov J, Visnapuu T, Innos J, Jayaram M, Timmusk T,

Weickert CS, Väli M, Vasar E and Philips M-A (2018) Altered Expression Profile of IgLON Family of Neural Cell Adhesion Molecules in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients.

Front. Mol. Neurosci. 11:8.
doi:10.3389/fnmol.2018.00008

Neural adhesion proteins are crucial in the development and maintenance of functional neural connectivity. Growing evidence suggests that the IgLON family of neural adhesion molecules LSAMP, NTM, NEGR1, and OPCML are important candidates in forming the susceptibility to schizophrenia (SCZ). IgLON proteins have been shown to be involved in neurite outgrowth, synaptic plasticity and neuronal connectivity, all of which have been shown to be altered in the brains of patients with the diagnosis of schizophrenia. Here we optimized custom 5'-isoform-specific TaqMan gene-expression analysis for the transcripts of human IgLON genes to study the expression of IgLONs in the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) of schizophrenic patients ($n = 36$) and control subjects ($n = 36$). Uniform 5'-region and a single promoter was confirmed for the human *NEGR1* gene by *in silico* analysis. IgLON5, a recently described family member, was also included in the study. We detected significantly elevated levels of the *NEGR1* transcript (1.33-fold increase) and the *NTM1b* isoform transcript (1.47-fold increase) in the DLPFC of schizophrenia patients compared to healthy controls. Consequent protein analysis performed in male subjects confirmed the increase in NEGR1 protein content both in patients with the paranoid subtype and in patients with other subtypes. In-group analysis of patients revealed that lower expression of certain IgLON transcripts, mostly *LSAMP* 1a and 1b, could be related with concurrent depressive endophenotype in schizophrenic patients. Additionally, our study cohort provides further evidence that cannabis use may be a relevant risk factor associated with suicidal behaviors in psychotic patients. In conclusion, we provide clinical evidence of increased expression levels of particular IgLON family members in the DLPFC of schizophrenic patients. We propose that

alterations in the expression profile of IgLON neural adhesion molecules are associated with brain circuit disorganization in neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia. In the light of previously published data, we suggest that increased level of *NEGR1* in the frontal cortex may serve as molecular marker for a wider spectrum of psychiatric conditions.

Keywords: schizophrenia, DLPFC, LSAMP, NTM, OPCML, *NEGR1*, *IGLON5*, alternative promoters

INTRODUCTION

Schizophrenia (SCZ) is a severe neuropsychiatric disorder with complex etiology, affecting approximately 1% of the world's population (van Os and Kapur, 2009; Costain and Bassett, 2012). Schizophrenic patients have a reduced quality of life, significant functional impairment and suicide rates among schizophrenic patients remain alarmingly high (Pompili et al., 2007). High heritability of schizophrenia has been consistently demonstrated by family studies (Mäki et al., 2005) and genome-wide association studies have identified numerous risk chromosome loci candidates for schizophrenia (O'Donovan et al., 2008; Purcell et al., 2009; Stefansson et al., 2009; Ripke et al., 2013, 2014; Yue et al., 2017) indicating many common gene variants providing subtle effects (Giusti-Rodríguez and Sullivan, 2013). Evidence from GWAS and studies revealing differentially expressed proteins in schizophrenia suggests that the majority of the pathophysiological processes underlying schizophrenia are involved in neuronal transmission, synaptic maturation and plasticity, neurite outgrowth and neurogenesis (Hosak et al., 2012; Nascimento and Martins-de-Souza, 2015; Singh et al., 2017).

A growing body of evidence suggests the existence of certain genetically transmitted intermediate phenotypes for psychiatric disorders such as schizophrenia that determine the molecular setup of the neuronal substrate (Gottesman and Gould, 2003). Disrupted functional brain connectivity, reflecting abnormal integrity of neural tracts, has been suggested to be an endophenotype for schizophrenia (Li et al., 2017). Cell membrane adhesion molecules, such as the IgLON proteins, are crucial for the correct assembly of neural circuits. The IgLON superfamily of neural cell adhesion molecules are Gpi-anchored neural cell surface glycoproteins (Salzer et al., 1996) in the neural cell membrane, including *Lsmp* (limbic system associated membrane protein), *NTM* (neurotrimin), *OPCML* (opioid-binding cell adhesion molecule), *Kilon/Negr1* (neuronal growth regulator 1) and *IgLon5* (Vanaveski et al., 2017). IgLON proteins form homophilic and heterophilic complexes along the cell surface (Reed et al., 2004) and regulate neurite outgrowth (Akeel et al., 2011), dendritic arborization (Pischedda et al., 2014; Pischedda and Piccoli, 2016) and synapse formation (Hashimoto et al., 2009) both in the developing and adult brain.

Polymorphisms in the human IgLON genes have been linked with a variety of psychiatric conditions, including schizophrenia. Based on Gwas meta-analysis from the Psychiatry Genomics Consortium (Ripke et al., 2014), there is strongest evidence for the association of *OPCML* and *NEGR1* genes with schizophrenia, compared to other IgLONs. The Gwas meta-analysis data from

Ripke et al. (2014) in the genomic regions of IgLONs has been visualized in Supplementary Figures S1–S3. In earlier studies, *OPCML* gene at 11q25 has been found to be a schizophrenia susceptibility locus in the European (O'Donovan et al., 2008) and Thai populations (Panichareon et al., 2012) and *NTM* has been significantly associated with schizophrenia in a genome-wide meta-analysis (Wang et al., 2010). Copy number variants in 11q25 where *NTM* and *OPCML* gene lie in close proximity have repeatedly been identified in patients with the diagnosis of schizophrenia (Magri et al., 2010; Ye et al., 2012). The most convincing evidence linking *Lsmp* with schizophrenia comes from protein studies in the post mortem brains: the level of the *LSAMP* protein is increased in the postmortem dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) (Behan et al., 2009) and in the synaptosome fraction of the orbitofrontal cortex (Velásquez et al., 2017) in patients with schizophrenia. Furthermore, *Lsmp* and *NEGR1* proteins are significantly upregulated in the post-mortem anterior prefrontal cortex of the patients with schizophrenia compared to healthy controls (Cox et al., 2016). An association between schizophrenia and polymorphisms in the *Lsmp* gene has been shown in the European (Koido et al., 2014) and Chinese (Chen et al., 2017) subjects.

In our previous study (Vanaveski et al., 2017) we have shown a twin-promoter structure in *NTM* and *OPCML*, similar to the genomic organization reported for *LSAMP* (Pimenta and Levitt, 2004), characterized by two alternative promoters 1a and 1b, whereas mouse *Negr1* and *IgLon5* transcripts have a uniform 5' region, suggesting a single promoter. As the human *NEGR1* gene has been expected to have putative alternative promoters in public databases, Ensembl¹ and NCBI-aceview², *in silico* analysis of the genomic structure of human *NEGR1* gene was performed before the experimental part of the current study for the optimal design of gene-expression assays.

The main focus of the study was to determine whether patients with schizophrenia express altered mRNA/protein levels of IgLON genes compared to controls in a well characterized cohort (Weickert et al., 2010). We examined the DLPFC (Brodmann area 46) as this region is important in the neuropathology of schizophrenia due to its role in executive cognitive functions (Harrison and Weinberger, 2005; Baumgartner et al., 2011; Catts et al., 2013). Alternative transcripts derived from 1a to 1b promoters of *LSAMP*, *NTM*, and *OPCML* were quantified separately by using a custom 5'-isoform-specific TaqMan gene-expression assay. As suicide is a major cause of death among patients with schizophrenia (Pompili et al., 2007), we also studied

¹ www.ensembl.org

² https://www.ncbi.nlm.nih.gov

gene expression changes and other significant factors, such as substance abuse, in patients who committed suicide attempts or completed suicide compared with patients with no suicidal behaviors.

MATERIALS AND METHODS

In Silico Analysis of Alternative First Exons of Human *NEGR1* Gene

Bioinformatic analysis of alternative first exons and respective upstream regions (5'UTR) of human *NEGR1* transcript was performed along with all ESTs present and with the *LSAMP* gene. All the alignments were performed with Clustal Omega Multiple sequence alignment service³. Alternative transcripts were further analyzed by mapping representative EST sequences to the *NEGR1* transcript and genome region. High quality ESTs spanning upstream of I or II exon were subsequently aligned to explore potential existence of alternative first exons. The available transcripts query was confirmed by BLAST search in NCBI Refseq and Non-Refseq databases. The putative transcriptional start site was analyzed using DBTSS database⁴. The sequences used in the current study were obtained from respective databases in Ensembl (release 89) or NCBI. The sequence identity numbers were obtained from Ensembl database and accession codes from NCBI RefSeq. The sequences for the multiple sequence alignment were procured from the NCBI site. The coding sequences in the FASTA format were used for the alignment. CLUSTALW multiple sequence alignment program was used for aligning the sequences for *OPCML1a* (NM_001012393.1), *OPCML1b* (NM_002545.3) *NTM 1a* (NM_001048209.1), *NTM 1b* (NM_016522.2), *LSAMP 1a* (AK299851.1), *LSAMP 1b* (NM_002338.3), *NEGR1* (NM_173808.2) and *IGLON5* (NM_001101372.2).

Human Postmortem Brain Samples

Human DLPFC tissues were obtained from the New South Wales Brain Bank Network (Sydney, Australia). The complete cohort consisted of 37 schizophrenia (including 7 schizoaffective) postmortem brain samples and 37 controls with no history of psychiatric diagnosis. Schizophrenia subjects were diagnosed according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV (DSM-4). A detailed clinical and demographic characterization of the cohort has previously been described by Weickert et al.(2010): "Detailed cohort demographic information" can be found in the Supplementary Table S5 and "Clinical characteristics of schizophrenia cohort" can be found in the Supplementary Table S6 (Weickert et al.,2010). The summary of postmortem subject demography for control and schizophrenia groups can be find in Matosin et al.(2015, **Table 1**). The anatomical identification and dissection of the tissue and preparation of total RNA and total protein has been described in detail in Weickert et al.(2010). Antipsychotic drug treatment premortem was standardized to lifetime

chlorpromazine equivalent for each patient. Antidepressant drug treatment history was also specified on a qualitative scale (yes/no). Sixteen patients had a history of drug abuse in the past, either cannabis ($n = 10$), amphetamines ($n = 4$), opiates ($n = 3$), LSD ($n = 5$) or undefined hallucinogen ($n = 1$). Many of the patients had multi-drug abuse history. The use of the New South Wales Brain Bank Network cohort was approved by the Human Research Ethics Committees at the University of Wollongong (HE99/222) and the University of New South Wales (HREC07261). For the inter-hemisphere analysis, brain samples were collected from 7 deceased subjects with no evidence of neuropathology and psychiatric diseases by the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, University of Tartu, Estonia and the Estonian Forensic Science Institute, Tallinn, Estonia. The DLPFC was bilaterally dissected from the rostro-caudal middle part of the middle frontal gyrus (Brodmann area 46 and lateral part of area 9) by qualified pathologists under the full ethical approval from the Research Ethics Committee of the University of Tartu (Approval no 223/T-4 from human research ethics committee).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) Analysis

IgLON transcript levels were determined by two-step RT-qPCR (qPCR). First strand cDNA was synthesized by the use of Random Hexamer (Applied Biosystems) and SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Quantitative TaqMan Assay with FAM-BHQ-probe was designed for the detection of human *LSAMP 1a/1b*, *OPCML 1a/1b*, *NTM 1a/1b*, *NEGR1*, and *IGLON5* transcripts (see **Table 1** for the primer and probe sequences). The general primer design schema was similar for the primer design for mouse IgLON transcripts described previously in Philips et al.(2015). In case of *OPCML*, *NTM*, and *LSAMP* universal reverse primer was combined with an alternative forward oligo specific for either 1a or 1b transcript. The primer sequences have been mapped on the 5'-region of the IgLON transcripts in **Figure 1**. The sequences for IgLON transcripts and housekeeping gene *HPRT1* have been listed in 5'-3' orientation in **Table 1**. TaqMan Universal PCR Master Mix was used according to the manufacturer's protocol as reaction buffer. Two micrograms of RNA was used in 20 μ l end reaction for cDNA synthesis from brain tissues. Each reaction mix was divided out in 10 μ l quadruplicates. ABI Prism 7900HT Sequence Detection System with ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 software (Applied Biosystems) was used for qPCR detection. qPCR data has been presented on linear scale, in form of $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) where ΔCT is the difference in cycle threshold (CT) between the gene of interest (FAM) and the housekeeper gene (VIC). The use of internal control gene, human *HPRT1*, has been optimized and used in our previous studies (Philips et al., 2010).

Western Blot

The protein extraction for New South Wales Brain Bank Network has been described in Matosin et al.(2015). For inter-hemisphere

³ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

⁴ <http://dbtss.hgc.jp/>

TABLE 1 | 1a/1b isoform specific primers for human IgLON gene transcripts optimized for the current study.

Gene		Forward primer	Probe sequence	Reverse primer
<i>LSAMP</i>	1a	5'-TCCTGTCCCTCTTCTCATTGC-3'	5'-AACCGAGGCACGGACAAC-3'	5'-TTCTTGTCTTCTACAACGCACCTG-3'
	1b	5'-GATTGCTCTGCCTTCTCCAC-3'		
<i>NTM</i>	1a	5'-TGGCTGCTCTGTGCTCTTCC-3'	5'-CGGAGATGCCACCTT-3'	5'-GGTGACCCGGTTGTCAATAGTG-3'
	1b	5'-TCTCAGGCTGCTGTTCTTGTGTA-3'		
<i>OPCML</i>	1a	5'-TCGGCGACAACGCCCTGCT-3'		5'-GGTTACCCGGTCATCTATGGTA-3'
	1b	5'-TCTCAGGCTGCTGTTCTTGTGTA-3'		
<i>NEGR1</i>		5'-TGCTCGAACCAGTGGCTGGC-3'	5'-TGGGCGGCCGTGGACAA-3'	5'-CCCTTTGAAGCTCCATCTTCCA-3'
<i>IgLON5</i>		5'-TGGCCGTCATCAGCCGAG-3'	5'-ACGCCACCCTCAGCTGCT-3'	5'-TGGAGCGTTTACGCCAGGC-3'
<i>HPRT1</i>		5'-GACTTTGCTTCTTGGTCAGG-3'	5'-TTTACCAGCAAGCTTGCACCTGA-3'	5'-AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG-3'

5' FAM-3' BHQ probe was used for the detection of IgLON transcripts and 5' VIC-3' TAMRA probe was used for the housekeeping gene HPRT1.

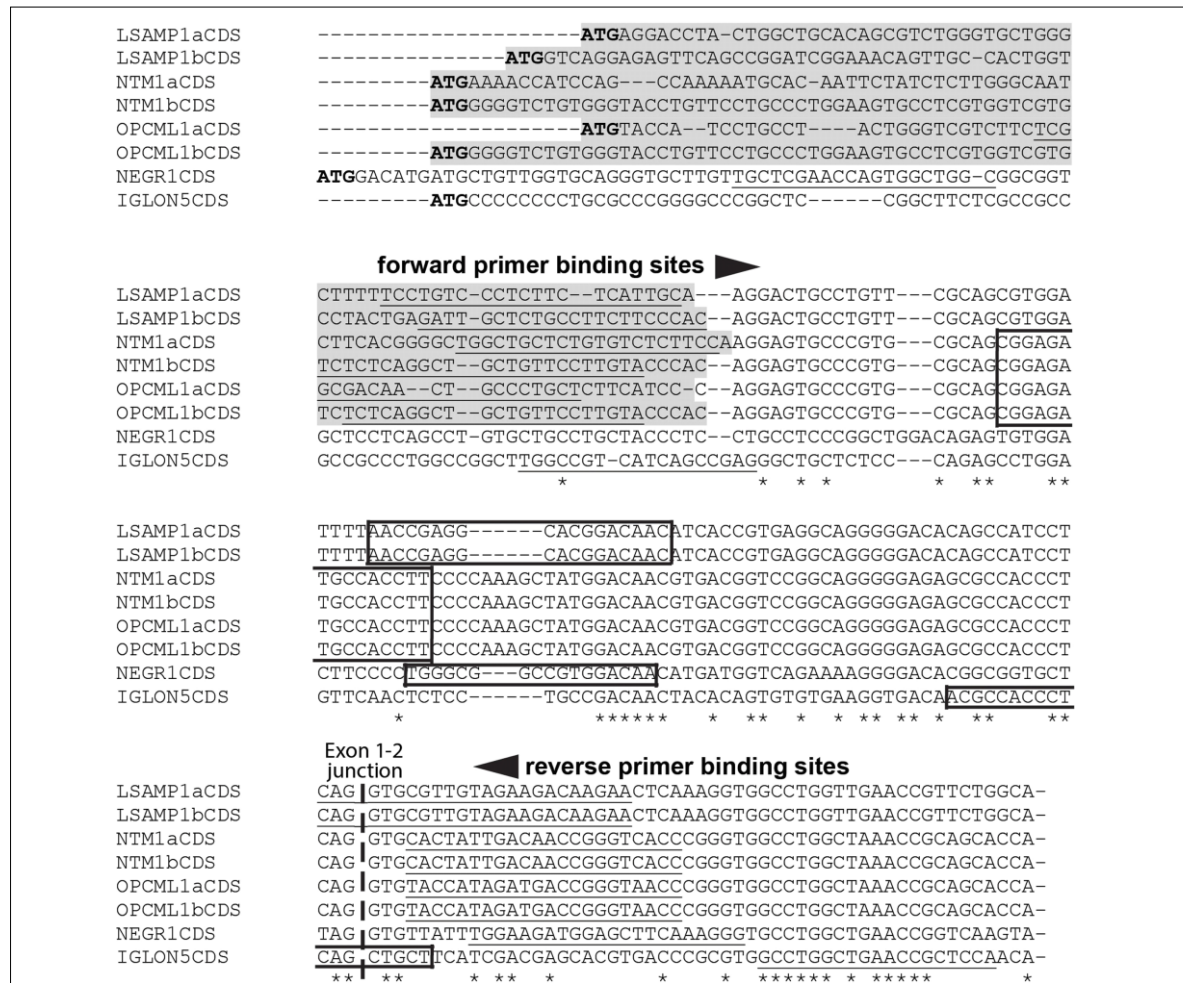


FIGURE 1 | Multiple sequence alignment of the 5' coding regions (CDS) of human IgLON gene family. The unique 5'-regions that are distinct in 1a/1b isoforms have been highlighted with gray shading. The binding sequences for FAM-BHQplus probes have been surrounded by a box. The binding sequences for 1a/1b isoform specific primers for human IgLON gene transcripts, have been underlined. The NCBI accession numbers of the human IgLON transcripts used as an input for CLUSTALW: *OPCML1a* (NM_001012393.1), *OPCML1b* (NM_002545.3) *NTM1a* (NM_001048209.1), *NTM1b* (NM_016522.2), *LSAMP1a* (AK299851.1), *LSAMP1b* (NM_002338.3), *NEGR1* (NM_173808.2) and *IGLON5* (NM_001101372.2). An * (asterisk) indicates positions which have a single, fully conserved nucleotide.

analysis, frozen tissues were sonicated in ice cold RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) supplemented with protease inhibitor (Life Technologies). Protein lysates were centrifuged for 10 min at 12,000 *g* at 4°C. Supernatant was collected and protein concentration was determined by BCA method (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Samples were frozen at 80°C for long-term storage. NuPAGE Electrophoresis System (Life Technologies) components and equipment were used according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of protein (20 µg) were loaded into the lanes of polyacrylamide gels. The gels were electrophoresed, followed by transfer of the protein to a nitrocellulose membrane using the NuPAGE Electrophoresis System (Life Technologies). The membranes were then blocked with 3% dry milk in PBS and probed with primary antibodies overnight at 4°C. Next day, immunoblots were incubated with fluorescent conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature, followed by visualization using a LI-COR Odyssey CLx system (LI-COR Biotechnologies). Images were converted to grayscale and data was analyzed using Image Studio Lite v 3.1.4 (LI-COR Biotechnologies). MILLIPORE Re-Blot Plus Western Blot Strong Antibody Stripping Solution (1x) was used to strip and re-probe membranes.

Primary antibodies used: mouse anti-NEGR1 (1:1,000) (sc-393293, Santa Cruz), mouse anti-Ntm (1:1,000) (sc-390941, Santa Cruz), rabbit anti-GAPDH antibody (1:10,000) (247002, Synaptic Systems). Secondary antibodies used: goat anti-rabbit antibody (1:40,000) (35569, Jackson ImmunoResearch) and goat anti-mouse antibody (1:5,000) (A21057, Invitrogen). Relative intensities for NEGR1 and NTM were obtained after normalization to GAPDH. Normalized values were divided by the lowest density value, so the lowest density value will be 1. The values were then normalized to control protein.

Statistical Analysis of Human Gene Expression Data

Statistical analyses were performed with environment for statistical computing R - 3.3.2 and IBM SPSS Statistics 23. Significance level was set to $p < 0.05$ and data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. For analyzing gene expression data, non-parametric tests were applied, because not all of the gene expression data sets were normally distributed according to the Shapiro Wilk's normality test. Mann-Whitney *U* test was used for comparing gene expression levels between two sample groups such as diagnostic groups (patient/control), as well as gender (male/female) and hemisphere (left/right). Additionally, Mann-Whitney *U* test was used for comparing gene expression levels within patient groups in case of binary categorical variables that were not applicable in the control group, such as antidepressant history (yes/no), concurrent major depression (yes/no), history of suicide attempts (yes/no) and death as a result of completed suicide (yes/no). Kruskal-Wallis test was used for comparing gene expression in more than two subgroups (diagnosis with and without schizoaffective disease vs. controls, agonal state, cause of death). *Post hoc* Tamhane's test was carried out in

order to determine the difference of groups averages more specifically. Spearman's correlations were used to determine whether sample characteristics (tissue pH and RIN, post mortem interval, brain weight and volume and age at death) were associated with gene expression measures. Additional measures of disease characteristics were correlated specifically with the schizophrenia group (lifetime chlorpromazine equivalent reflecting antipsychotic drug history, age of disease onset and duration of illness). Analysis of covariance (ANCOVA) for diagnostic effects on protein expression was performed, accounting for factors that were associated with gene transcript levels, as determined by the Spearman's correlations. Analyses of covariance were carried out only for *NTM 1b* expression data, which was distributed close to normal distribution (absolute values of skewness and kurtosis were less than 1) and the parametric approach was justified. A Chi-square test of independence was calculated, comparing the frequency of drug abuse in the groups of patients who committed suicide attempts or completed suicide and patients who did not. Binary logistic regression analysis was performed to assess the contribution of different gene expression levels to the model predicting the likelihood of being a patient. ROC analysis was performed to estimate predictive accuracy of the logistic regression model.

RESULTS

In Silico Analysis of Human *NEGR1* Gene and Protein

In silico analysis of the human *NEGR1* transcript with 5'UTR region and ESTs present in the database shows no evidence of twin promoter structure in *NEGR1*. Our analysis showed a single CpG island present in the human *NEGR1* gene corresponding to the 5'UTR region of annotated variants NM_173808 (ENST00000357731.9). Additional EST analysis confirmed uniform 5'UTR region indicating single promoter structure for the uniform 5'-region of human *NEGR1* transcript encoding for single N-terminal signal peptide. Multiple sequence alignment of the 5'-regions of human IgLON gene family has been presented in **Figure 1**.

Gene Expression Analysis in Patients in Comparison with Healthy Controls

The qPCR data from two subjects (one from the patient group and another from the control group) was excluded from the analysis due to insufficient quality of the reactions, therefore data from 36 patients to 36 control subjects was included in the gene expression studies. There was no effect of gender or hemisphere on the expression levels of IgLON transcripts according to the Mann-Whitney *U* test. The average gene expression values of patients were greater than averages of controls for all genes (except for *IGLON5*, **Table 2** and **Figure 2**). Mann-Whitney *U* test revealed statistically significant differences between patient and control groups only for *NTM 1b* and *NEGR1*. *NTM 1b* was significantly increased in schizophrenia subjects ($m = 0.94$)

compared to controls ($m = 0.64$) ($p < 0.001$) (Figure 2D), and *NEGR1* was also significantly increased in schizophrenia subjects ($m = 0.07$) compared to controls ($m = 0.57$) ($p < 0.001$) (Figure 2G).

When the patients with schizoaffective subtype ($n = 7$) of schizophrenia were separated from the patient group (Figure 2I), the Kruskal–Wallis test revealed a statistically significant difference in average expression values of *NTM 1b* between the groups ($H^2 = 9.11$, $df = 2$, $p = 0.011$). Tamhane's *post hoc* comparisons indicated that the mean score of patients with schizophrenia ($m = 0.93$, $sd = 0.48$) was statistically higher ($p < 0.05$) than the mean score of controls ($m = 0.65$, $sd = 0.39$). Although the mean score of patients with schizoaffective diagnosis ($m = 0.99$, $sd = 0.46$) was also higher than the mean of control subjects, the expression values of *NTM 1b* in the schizoaffective group were significantly different from neither controls ($p = 0.15$) nor the group of patients without the schizoaffective diagnosis ($p = 1$). Similarly, the Kruskal–Wallis test revealed a statistically significant difference in *NEGR1* levels between the groups when the patients with a schizoaffective subtype were separated from the patient group ($H^2 = 12.09$, $df = 2$, $p = 0.002$) (Figure 2J). *Post hoc* comparisons using Tamhane's test indicated that the mean score of patients with schizophrenia ($m = 6.09$, $sd = 2.24$) was statistically higher ($p < 0.01$) than the mean score of controls ($m = 4.57$, $sd = 1.47$), but the mean score of patients with a schizoaffective diagnosis ($m = 5.97$, $sd = 1.13$) did not differ significantly from the mean scores of patients without schizoaffective schizophrenia ($p = 1$); the difference between schizoaffective patients and controls showed a strong tendency toward statistical significance ($p = 0.06$).

Non-parametric correlation coefficient was used to determine whether sample characteristics were associated with gene expression measures. In the complete study group, the RIN of the sample was correlated with *LSAMP 1a* ($r = -0.40$, $p < 0.01$), *LSAMP 1b* ($r = -0.33$, $p < 0.01$), and *NTM 1a* ($r = -0.49$, $p < 0.01$) mRNA expression levels. Additionally, in the complete study group, pH of the tissue sample correlated with *LSAMP 1a* ($r = -0.50$, $p < 0.01$); *LSAMP 1b* ($r = -0.49$, $p < 0.01$), *NTM 1a* ($r = -0.43$, $p < 0.01$) and *NTM 1b* ($r = -0.26$, $p < 0.05$) mRNA expression levels. The ANCOVA analysis,

accounting for tissue pH that was found to be correlated with gene expression measures, revealed that a significant difference in *NTM 1b* average values (patients vs. controls) was maintained after covarying for pH in the prefrontal cortex. More specifically, the total ANCOVA model was statistically significant ($p < 0.01$, $\eta^2 = 0.16$), and the averages of *NTM 1b* in patients and controls differed significantly ($p < 0.01$); the value of tissue pH was also significant in the model ($p < 0.04$).

Logistic regression was performed in order to assess the contribution of variables to the model predicting the status of being a patient. The dichotomous variable of being or not being a patient was used as dependent variable (Table 3). According to the model, the log of the odds of being a schizophrenia patient was positively related to the expression levels of *NTM 1b* and *NEGR1* (in both cases $p < 0.05$). In other words, the higher the *NTM 1b* expression, the greater the odds for belonging to the patient group (3.65 times greater odds), and also, the higher the *NEGR1* expression level, the greater the odds of being a patient (1.61 times). We also computed size of the area under the ROC curve. It was 0.79 showing that predictive accuracy of our logistic regression model is good (ROC curve has been visualized on the Supplementary Figure S4).

Analysis within Patient Group

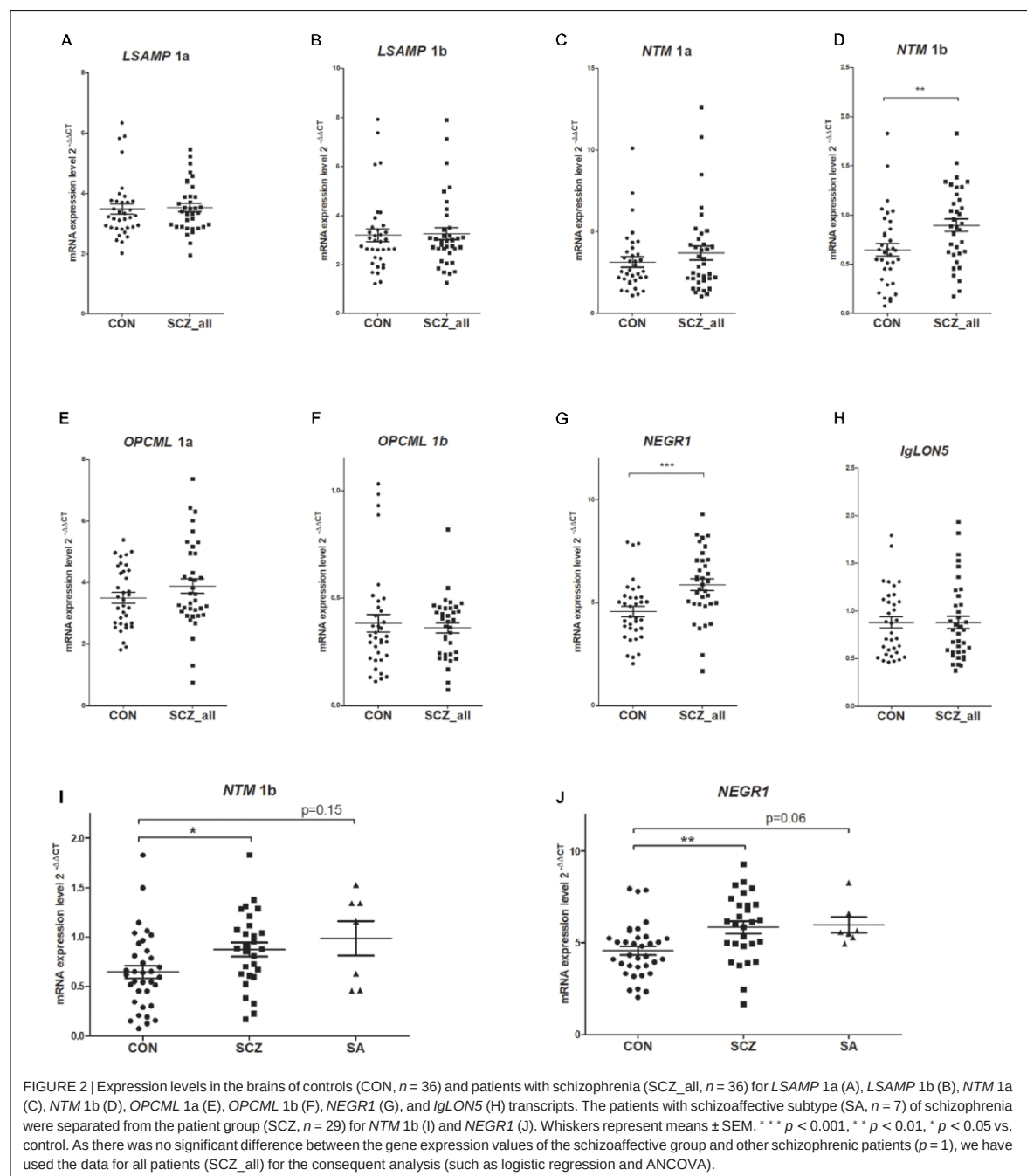
No significant correlations were found between gene expression values and measures of disease characteristics in the schizophrenia group, such as lifetime chlorpromazine equivalent reflecting antipsychotic drug history, age of disease onset and duration of illness. Analysis of gene expression levels within patient groups were performed in case of binary variables that were not applicable in the control group (Figure 3). Mann–Whitney *U* test revealed a significant difference in *LSAMP 1a* transcript expression levels in patients with antidepressant history ($n = 18$, $m = 3.25$, $sd = 0.53$) and patients with no antidepressant history ($n = 18$, $m = 3.83$, $sd = 0.96$); $w = 109$, $p < 0.05$; there were no other significant gene expression changes regarding antidepressant history of patients. The expression of *LSAMP 1a* transcript was significantly lower in patients who died as a result of completed suicide ($n = 8$, $m = 2.92$, $sd = 0.63$) than in patients who did not commit suicide ($n = 28$, $m = 3.87$, $sd = 1.12$) $w = 189$, $p < 0.01$. The expression of *LSAMP 1b* transcript was significantly lower in patients who committed a completed suicide ($n = 8$, $m = 2.21$, $sd = 0.86$) than in patients who did not commit suicide ($n = 28$, $m = 3.55$, $sd = 1.48$); $w = 91$, $p < 0.05$. The expression of *NTM 1b* transcript was significantly lower in patients who committed suicide ($n = 8$, $m = 0.62$, $sd = 0.27$) than in patients who did not commit suicide ($n = 28$, $m = 0.97$, $sd = 0.48$); $w = 171$, $p < 0.05$. The expression of *IgLON5* transcript was significantly lower in patients who committed suicide ($n = 8$, $m = 0.56$, $sd = 0.12$) than in patients who did not commit suicide ($n = 28$, $m = 0.95$, $sd = 0.41$); $w = 181$, $p < 0.01$; there were no other significant gene expression changes in patients who committed suicide compared with patients who did not commit suicide.

From the 37 patients in the current study cohort, 17 patients had a history of suicide attempts and 8 patients died due to completed suicide. Sixteen patients had a history of drug abuse

TABLE 2 | Averages and standard deviations of groups of patients and controls.

	Average (standard deviation)		W	P-value
	Patients ($n = 36$)	Controls ($n = 36$)		
<i>LSAMP 1a</i>	3.66 (1.10)	3.48 (1.00)	548	ns
<i>LSAMP 1b</i>	3.25 (1.47)	3.19 (1.55)	598	ns
<i>NTM 1a</i>	3.70 (2.59)	3.16 (1.86)	574	ns
<i>NTM 1b</i>	0.94 (0.47)	0.64 (0.39)	377	$p < 0.01$
<i>OPCML 1a</i>	3.89 (1.42)	3.50 (0.99)	522	ns
<i>OPCML 1b</i>	0.41 (0.30)	0.38 (0.24)	567	ns
<i>NEGR1</i>	6.07 (2.07)	4.57 (1.45)	320	$p < 0.001$
<i>IgLON5</i>	0.87 (0.41)	0.87 (0.35)	658	ns

W statistic from Mann–Whitney test. ns: not significant ($p > 0.05$).



in the past with cannabis being the most common drug used ($n = 10$). A Chi-square test of independence was calculated, comparing the frequency of drug abuse in the groups of patients who committed suicide attempts or completed suicide and who did not. A significant link was found between completed suicide

and drug abuse when all drugs were included in the analysis: $\chi^2(1, n = 37) = 6.01, p < 0.05$. Namely, the patients who committed suicide were more likely to have a drug abuse history (7 drug abusers from a total of 8 suicide cases) than patients who did not commit suicide (9 drug abusers from a total of 29 subjects).

When only the use of cannabis was included in the analysis, again a significant association was found: $\chi^2(1, n=37)=9.01, p < 0.01$. Namely, the patients who committed suicide were more likely to have a history of cannabis use (6 cannabis users from a total of 8 suicide cases) than patients who did not commit suicide (4 cannabis users from a total of 29 subjects). No significant association was found between suicide attempts and drug abuse when all drugs were included in the analysis: $\chi^2(1, n=37)=2.05, p=0.15$ (10 drug abusers from a total of 17 patients who committed suicide attempts vs. 6 drug abusers from 20 patients who had no history of suicide attempts). When only the use of cannabis was included in the analysis, a significant interaction was found: $\chi^2(1, n=37)=4.65, p < 0.05$. Namely, the patients with a history of suicide attempts were more likely to have a history of cannabis use (8 cannabis users from a total of 17 attempters) than patients who did not commit suicide (2 users of cannabis from a total of 20 subjects). The amount of daily intake of ethanol showed no association with either suicidal behaviors or IgLON gene expression levels.

Western Blot

According to the Kruskal–Wallis test, there was a statistically significant difference in NEGR1 protein level between the control group and the two subgroups of schizophrenia patients ($H^2 = 8.01, df=2, p=0.01$) (Figures 4A,B). *Post hoc* comparisons using Tamhane’s test indicated that the mean NEGR1 protein expression score of schizophrenia patients with the paranoid subtype diagnosis ($m=1.72, sd=0.43$) was statistically higher than the mean score of controls ($m=1.24, sd=0.24, p < 0.05$). Additionally, the mean NEGR1 protein expression score of schizophrenia patients with another subtype diagnosis ($m=1.93, sd=0.57$) was statistically higher than the mean score of controls ($m=1.24, sd=0.24, p < 0.05$). As the hemispheres were randomly dissected in the complete study cohort, we performed inter-hemisphere analysis in the protein level by comparatively using left and right hemisphere-derived tissue samples in 7 subjects with no evidence of neuropathology and psychiatric diseases. Inter-hemisphere analysis revealed no obvious differences in protein expression; according to Mann–Whitney *U* test there were no significant differences in the NEGR1 and NTM proteins in the left and right hemisphere (Figures 4C–E).

DISCUSSION

Neural cell adhesion molecules, such as IgLON proteins, are critical in the formation of correct interactions between neural

cells that underlie normal brain function and behaviors. Here we provide evidence of altered IgLON expression profiles in the DLPFC of patients with schizophrenia. We found that elevated levels of *NEGR1* transcript in the DLPFC increased the likelihood of being a patient 1.61 times; furthermore, increased levels of *NTM* 1b transcript isoform predicted the likelihood to fall into the patient group even 3.65 times. Consequent protein analysis performed in more distinct subgroups of male subjects confirmed the increased level of NEGR1 protein both in patients with the paranoid subtype and in patients with other subtypes. Currently the largest human post mortem gene expression analysis provides supporting evidence for the upregulation of *NEGR1* gene in the DLPFC area of schizophrenic patients (Fromer et al.,2016). However, this effect ($p < 0.05$) is not significant after multiple test correction. The data is still in line with our results, as whole transcriptome studies must apply stricter cut-off criteria to avoid false positive results. No evidence for differential expression of other IgLON genes, including *NTM* promoter specific isoforms, was provided by Fromer et al.(2016).

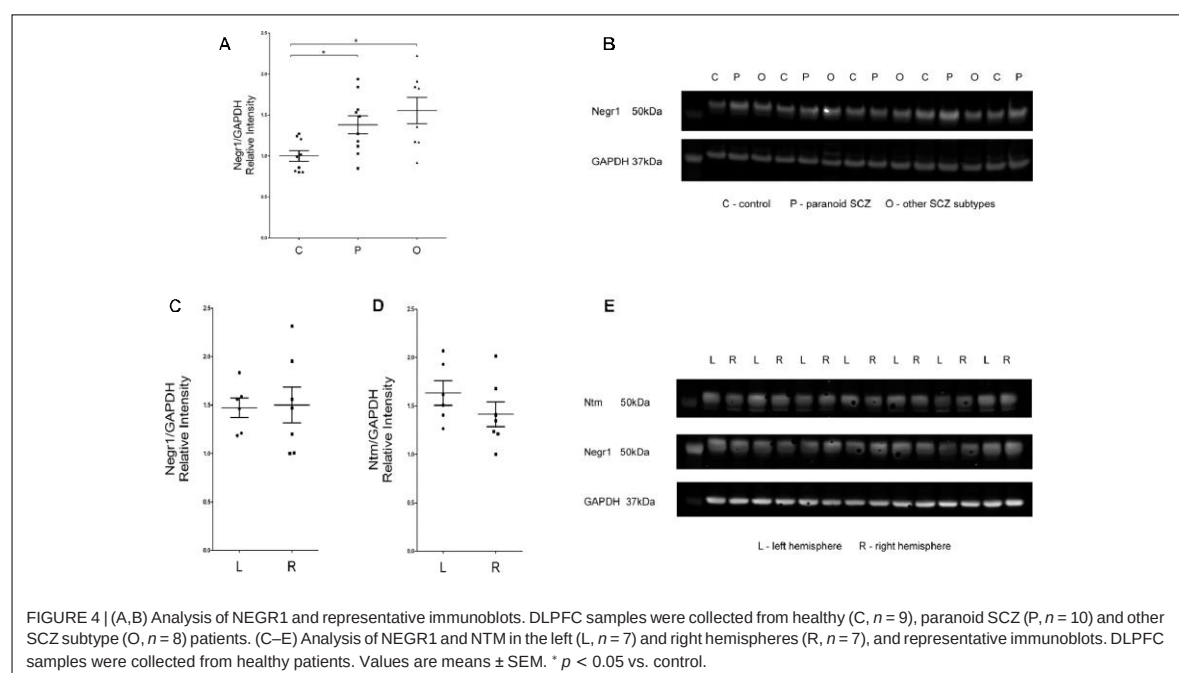
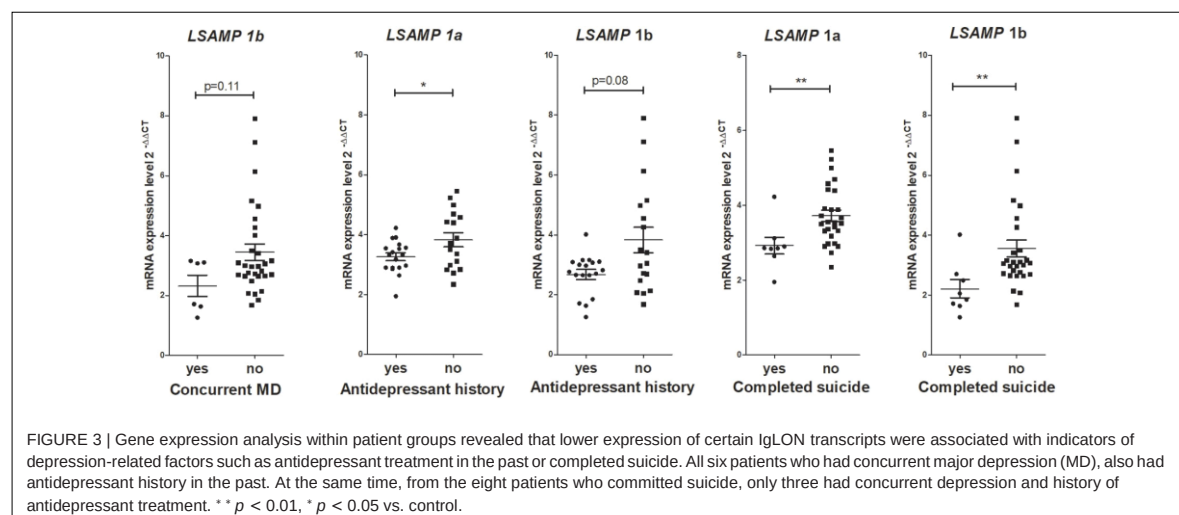
Interestingly, it has previously been shown that *NEGR1* transcript is significantly increased in the DLPFC of human subjects with major depressive disorder compared with non-psychiatric control subjects (Chang et al.,2014); another recent publication reports a strong association of polymorphisms in the *NEGR1* gene with major depression (Hyde et al.,2016). According to a genome-wide meta-analysis searching for common genetic variants influencing both schizophrenia and bipolar disorder, a polymorphism in the *NTM* gene (rs992564) accounts for the heritability of both disorders (Wang et al., 2010). A significant correlation between polygenic risk scores for bipolar disorder and the clinical dimension of mania in schizophrenia patients has been demonstrated recently (Ruderfer et al.,2014) expanding evidence that schizophrenia and bipolar disorder may share half of their genetic determinants (Wang et al.,2010). Elevated mean value of the *NEGR1* transcript in the DLPFC of schizoaffective patients did not meet statistical significance (Figure 2J) due to a small number of schizoaffective patients in the current study ($n=7$), however, our results together with previous evidence (Chang et al.,2014;Cox et al., 2016) suggest that increased level of NEGR1 in the frontal cortex may serve as a molecular marker for a wider spectrum of psychiatric conditions.

Our previous findings underline the importance of differentiating 1a and 1b promoter activities when studying the IgLON family (Philips et al.,2015;Vanaveski et al.,2017). Uniform 5’ region of the human *NEGR1* gene (Figure 1) was confirmed by *in silico* analysis in the current study, suggesting a single promoter similarly to the genomic structure of the mouse *Negr1* gene (Vanaveski et al.,2017). The existence of putative alternative promoters predicted in public databases was not confirmed and the qPCR expression assay was designed based on human *NEGR1* transcript variant NM_173808.2, which is compatible with protein variant NP_776169.2.

Surprisingly, we found no changes in the levels of *LSAMP* transcripts, although LSAMP protein has been found to be increased in schizophrenic patients in the DLPFC (Behan et al., 2009), anterior prefrontal cortex (Cox et al.,2016), and also

TABLE 3 | Results of logistic regression model.

	<i>B</i> (<i>SE</i>)	95% CI for odds ratio		
		Lower	Odds ratio	Upper
Constant	−3.49 (1.05)			
<i>NTM 1b</i>	1.29 (0.64)	1.13	3.65	14.38
<i>NEGR1</i>	0.49 (0.18)	1.16	1.61	2.38



the synaptosome fraction of the orbitofrontal cortex (Velásquez et al., 2017) compared to healthy controls. An explanation could be that we measured separately alternative 1a and 1b promoter related transcripts of *LSAMP* that are not equivalent to the summarized level of protein in the brain. Furthermore, the presence of a conserved long 8 kb transcript of *LSAMP* has been shown (Pimenta et al., 1996), suggesting a variant with long poly-A tail which indicates that the translation levels of *LSAMP* may not be regulated only with the amount of mRNA. There are other studies showing that the level of mRNA might

not always correspond to the level of protein, such as Matosin et al. (2015). At the same time, a significant increase of *NTM* 1b transcript in the DLPFC of schizophrenic patients indicates that distinguishing between alternative promoters is important and justified when studying the IgLON gene family. It is important to note that after cleavage of N-terminal 1a/1b-isoform specific signal peptides (encoded by 5' coding region, Figure 1), the mature IgLON proteins are identical regardless of the initial promoter from which the expression of particular molecule was triggered (Pimenta and Levitt, 2004). Therefore, neither *LSAMP*

nor NTM antibodies are able to discriminate between 1a and 1b isoforms that have highly different expressional distributions across the brain (Philips et al.,2015;Vanaveski et al.,2017) and supposedly differential roles. mRNA level analysis, such as qPCR, is the only possibility to separate promoter-specific isoforms in IgLONs.

The expression of *OPCML* uniform transcript has been explored in our cohort previously in a study which aimed to measure the expression levels of genes identified as schizophrenia susceptibility genes by GWASs (Umeda-Yano et al.,2014). No changes in the DLPFC of schizophrenic patients were found in the expression of *OPCML* uniform mRNA, similarly to our results, revealing no significant changes associated with schizophrenia in the expression of *OPCML* 1a and 1b isoforms. The work of Umeda-Yano et al.(2014) provides good evidence that genomic loci which have been detected as strong genetic determinants of a particular disease in GWASs might not necessarily give rise to expressional alterations in the closest gene, and important genomic regulatory areas may span over wider chromosomal region. Human *OPCML* and *NTM* genes lie approximately 68 kb apart on chromosomal locus 11q25, making it probable that these genes share regulatory mechanisms. One of the example is SNP rs11222692, located in the intronic area of the *NTM* gene, that is eQTL influencing the expression level of the *OPCML* gene in the DLPFC (Fromer et al.,2016). In our current study, we found significant alterations only in the *NTM* 1b transcript isoform. Alterations in 11q25 have already been associated with schizophrenia (Magri et al.,2010;Ye et al.,2012) and schizophrenia susceptibility has been associated with SNPs in both *OPCML* (O'Donovan et al.,2008;Panichareon et al., 2012) and *NTM* (Wang et al.,2010), making it a considerable risk locus for dysfunctional neural regulation (See also Supplementary Figure S3).

Post-psychotic depression, hopelessness, social isolation and a history of substance abuse, are the risk factors for suicide in patients with schizophrenia (Pompili et al.,2007). Interestingly, although the number of subjects was small in the current study, our study cohort provides support to the previously reported finding (Serafini et al.,2012) in that cannabis use may be a relevant risk factor associated with suicidal behaviors in psychotic patients. Further in-group analysis of patients revealed that lower expression of certain IgLON genes, mostly *LSAMP* transcripts, could be related with concurrent depression-related factors in schizophrenic patients (**Figure 4**). The expression of *LSAMP* 1b transcript was lower in patients with concurrent major depression than in patients with no major depression, but the difference was not significant due to a small number of patients with the diagnosis of concurrent major depression ($n = 6$). Both completed suicide and antidepressant episode can be interpreted as manifestations of the depressive endophenotype, however, in the current study we can only hypothesize that lower levels of IgLONs may be implicated in concurrent depressive traits and suicidality in schizophrenic patients as our study cohort is not including depressive patients and suicide victims without schizophrenia. Also, a notable shortcoming of the study is the significant correlation of *LSAMP* transcripts with the pH of the brain tissue, which may have an effect on the results. Still,

the *LSAMP* gene has been associated with suicide susceptibility earlier (Must et al.,2008;Sokolowski et al.,2016), and therefore IgLONs, especially *LSAMP*, remain important targets in suicide genetics.

The current study has several limitations which have to be pointed out. As is common for post-mortem samples, there are many variables making the samples highly heterogeneous (such as tissue pH, brain weight and volume, RIN), which may have impact on the results. The heterogeneity of the cohort is further increased due to subjects' individual history of drug abuse and the use of other psychoactive drugs, such as antidepressants. Additionally, our patient group was characterized by significant psychopathological differences which may also result in limited statistical power. Therefore especially the results derived from the subgroup analysis must be interpreted with caution.

We have shown alterations in the expression profile of IgLON transcripts in the frontal cortex of schizophrenic patients. IgLONs have been previously associated with different aspects of normal neural circuit formation. Specifically, *NEGR1* has recently been shown to regulate neuronal arborization, playing a crucial role in the proper formation of neuronal connectivity (Pischedda et al.,2014;Pischedda and Piccoli,2016). *NTM* has been shown to regulate the development of the thalamocortical and pontocerebellar projections (Struyk et al.,1995;Chen et al.,2001). Earlier studies have shown that the IgLON family functions collectively in a balanced manner by the formation of highly specific complexes and interactions between IgLON family members (Reed et al.,2004). We therefore propose that alterations in the expression profile of IgLON neural adhesion molecules are associated with brain network disorganization in neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia.

CONCLUSION

Our results provide clinical evidence beside numerous cell culture and animal experiments, confirming that certain members of the IgLON family of neural adhesion molecules, such as *NEGR1*, *NTM*, and *LSAMP*, are involved in fine-tuning of neuronal circuits underlying normal and pathological psychological/psychiatric conditions.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Human Research Ethics Committees at the University of Wollongong (HE99/222) and the University of New South Wales (HREC07261) (New South Wales Brain Bank Network cohort) and Research Ethics Committee of the University of Tartu (Approval no. 223/T-4 from human research ethics committee).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-AP, KK, and EV planned the study. KK and MK prepared cDNAs and performed qPCR, K-LE performed Western Blot.

KT and JI performed statistical analysis. MJ performed *in silico* analysis. CW, TT, TV, JT, and MV prepared and provided brain tissues, M-AP designed the qPCR assay. M-AP and KK wrote the paper. KK, MK, KT, JI, MJ, MV, TT, CW, and EV participated in data interpretation and revision of the paper and all authors approved the final version.

FUNDING

This study was supported by personal investigation grant from the Estonian Research Council PUT129 (M-AP) and institutional funding from the Estonian Research Council IUT20-41 (EV) and IUT19-18 (TT). This research was also supported by the

European Union through the European Regional Development Fund (Project No. 2014-2020.4.01.15-0012) and H2020-MSCA-RISE-2016 (EU734791). CW is funded by the NSW Ministry of Health, Office of Health and Medical Research. CW is a recipient of a National Health and Medical Research Council (Australia) Principal Research Fellowship (PRF) (#1117079).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00008/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Akeel, M., McNamee, C. J., Youssef, S., and Moss, D. (2011). DigLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons via an IgLON-containing receptor complex. *Brain Res.* 1374, 27–35. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.028
- Baumgartner, T., Knoch, D., Hotz, P., Eisenegger, C., and Fehr, E. (2011). Dorsolateral and ventromedial prefrontal cortex orchestrate normative choice. *Nat. Neurosci.* 14, 1468–1474. doi: 10.1038/nn.2933
- Behan, A. T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., and Cotter, D. R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol. Psychiatry* 14, 601–613. doi: 10.1038/mp.2008.7
- Catts, V. S., Fung, S. J., Long, L. E., Joshi, D., Vercammen, A., Allen, K. M., et al. (2013). Rethinking schizophrenia in the context of normal neurodevelopment. *Front. Cell Neurosci.* 7:60. doi: 10.3389/fncel.2013.00060
- Chang, L. C., Jamain, S., Lin, C. W., Rujescu, D., Tseng, G. C., and Sibille, E. A. (2014). Conserved BDNF, glutamate- and GABA-enriched gene module related to human depression identified by coexpression meta-analysis and DNA variant genome-wide association studies. *PLOS ONE* 9:e90980. doi: 10.1371/journal.pone.0090980
- Chen, S., Gil, O., Ren, Y. Q., Zanazzi, G., Salzer, L. J., and Hillman, E. D. (2001). Ntm expression during cerebellar development suggests roles in axon fasciculation and synaptogenesis. *J. Neurocytol.* 30, 927–937. doi: 10.1023/A:1020673318536
- Chen, X., Long, F., Cai, B., Chen, X., and Chen, G. (2017). A novel relationship for schizophrenia, bipolar and major depressive disorder Part 3: evidence from chromosome 3 high density association screen. *J. Comp. Neurol.* 526, 59–79. doi: 10.1002/cne.24311
- Costain, G., and Bassett, A. S. (2012). Clinical applications of schizophrenia genetics: genetic diagnosis, risk, and counseling in the molecular era. *Appl. Clin. Genet.* 5, 1–18. doi: 10.2147/TACG.S21953
- Cox, D. A., Gottschalk, M. G., Wesseling, H., Ernst, A., Cooper, J. D., and Bahn, S. (2016). Proteomic systems evaluation of the molecular validity of preclinical psychosis models compared to schizophrenia brain pathology. *Schizophr. Res.* 177, 98–107. doi: 10.1016/j.schres.2016.06.012
- Fromer, M., Roussos, P., Sieberts, S. K., Johnson, J. S., Kavanagh, D. H., Perumal, T. M., et al. (2016). Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 19, 1442–1453. doi: 10.1038/nn.4399
- Giusti-Rodríguez, P., and Sullivan, P. F. (2013). The genomics of schizophrenia: update and implications. *J. Clin. Invest.* 123, 4557–4563. doi: 10.1172/JCI66031
- Gottesman, I. I., and Gould, T. D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am. J. Psychiatry* 160, 636–645. doi: 10.1176/appi.ajp.160.4.636
- Harrison, P. J., and Weinberger, D. R. (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 10, 40–68. doi: 10.1038/sj.mp.4001558
- Hashimoto, T., Maekawa, S., and Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem. Funct.* 27, 496–498. doi: 10.1002/cbf.1600
- Hosak, L., Silhan, P., and Hosakova, J. (2012). Genome-wide association studies in schizophrenia, and potential etiological and functional implications of their results. *Acta Medica* 55, 3–11. doi: 10.14712/18059694.2015.67
- Hyde, C. L., Nagle, M. W., Tian, C., Chen, X., Paciga, S. A., Wendland, J. R., et al. (2016). Identification of 15 genetic loci associated with risk of major depression in individuals of European descent. *Nat. Genet.* 48, 1031–1036. doi: 10.1038/ng.3623
- Koido, K., Janno, S., Traks, T., Parksepp, M., Ljubajev, Ü, Veiksaar, P., et al. (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 215, 797–798. doi: 10.1016/j.psychres.2014.01.016
- Li, P., Fan, T. T., Zhao, R. J., Han, Y., Shi, L., Sun, H. Q., et al. (2017). Altered brain network connectivity as a potential endophenotype of schizophrenia. *Sci. Rep.* 7:5483. doi: 10.1038/s41598-017-05774-3
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Magri, C., Sacchetti, E., Traversa, M., Valsecchi, P., Gardella, R., Bonvicini, C., et al. (2010). New copy number variations in schizophrenia. *PLOS ONE* 5:e13422. doi: 10.1371/journal.pone.0013422
- Mäki, P., Veijola, J., Jones, P. B., Murray, G. K., Koponen, H., Tienari, P., et al. (2005). Predictors of schizophrenia—a review. *Br. Med. Bull.* 73-75, 1–15. doi: 10.1093/bmb/ldh046
- Matosin, N., Fernandez-Enright, F., Fung, S. J., Lum, J. S., Engel, M., Andrews, J. L., et al. (2015). Alterations of mGluR5 and its endogenous regulators Norbin, Tamalin and Preso1 in schizophrenia: towards a model of mGluR5 dysregulation. *Acta Neuropathol.* 130, 119–129. doi: 10.1007/s00401-015-1411-6
- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Köks, S., Maron, E., et al. (2008). Association of limbic system-associated membrane protein (LSAMP) to male completed suicide. *BMC Med. Genet.* 9:34. doi: 10.1186/1471-2350-9-34
- Nascimento, J. M., and Martins-de-Souza, D. (2015). The proteome of schizophrenia. *NPJ Schizophr.* 1, 14003. doi: 10.1038/npjshcz.2014.3
- O'Donovan, M. C., Craddock, N., Norton, N., Williams, H., Peirce, T., Moskvina, V., et al. (2008). Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat. Genet.* 40, 1053–1055. doi: 10.1038/ng.201
- Panichareon, B., Nakayama, K., Thurakitwanakarn, W., Iwamoto, S., and Sukhumsirichart, W. (2012). OPCML gene as a schizophrenia susceptibility locus in Thai population. *J. Mol. Neurosci.* 46, 373–377. doi: 10.1007/s12031-011-9595-2
- Philips, M. A., Kingo, K., Karelson, M., Rätsep, R., Aunin, E., Reimann, E., et al. (2010). Promoter polymorphism -119C/G in MYG1 (C12orf10) gene is related to vitiligo susceptibility and Arg4Gln affects mitochondrial entrance of Myg1. *BMC Med. Genet.* 11:56. doi: 10.1186/1471-2350-11-56
- Philips, M. A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C. A., Kongi, K., et al. (2015). Lsmp is implicated in the regulation of emotional and social

- behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Struct. Funct.* 220, 1381–1393.doi: 10.1007/s00429-014-0732-x
- Pimenta, A. F., Fischer, I., and Levitt, P. (1996). cDNA cloning and structural analysis of the human limbic-system-associated membrane protein (LAMP). *Gene* 170, 189–195.
- Pimenta, A. F., and Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics* 83, 790–801.doi:10.1016/j.ygeno.2003.11.013
- Pischedda, F., and Piccoli, G. (2016). The IgLON family member negr1 promotes neuronal arborization acting as soluble factor via FGFR2. *Front. Mol. Neurosci.* 8:89.doi: 10.3389/fnmol.2015.00089
- Pischedda, F., Szczurkowska, J., Cimarù, M. D., Giesert, F., Vezzoli, E., Ueffing, M., et al. (2014). A cell surface biotinylation assay to reveal membrane-associated neuronal cues: negr1 regulates dendritic arborization. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 733–748.doi: 10.1074/mcp.M113.031716
- Pompili, M., Amador, X. F., Girardi, P., Harkavy-Friedman, J., Harrow, M., Kaplan, K., et al. (2007). Suicide risk in schizophrenia: learning from the past to change the future. *Ann. Gen. Psychiatry* 6:10.doi: 10.1186/1744-859 X-6-10
- Purcell, S. M., Wray, N. R., Stone, J. L., Visscher, P. M., O'Donovan, M. C., Sullivan, P. F., et al. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460, 748–752.doi: 10.1038/nature08185
- Reed, J., McNamee, C., Rackstraw, S., Jenkins, J., and Moss, D. (2004). Diglons are heterodimeric proteins composed of IgLON subunits, and diglon-CO inhibits neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *J. Cell Sci.* 117, 3961–3973. doi: 10.1242/jcs.01261
- Ripke, S., Neale, B. M., Corvin, A., Walters, J. T., Farh, K. H., Holmans, P. A., et al. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427.doi: 10.1038/nature13595
- Ripke, S., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Moran, J. L., Kahler, A. K., Akterin, S., et al. (2013). Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat. Genet.* 45, 1150–1159.doi: 10.1038/ng.2742
- Ruderfer, D. M., Fanous, A. H., Ripke, S., McQuillin, A., Amdur, R. L., Schizophrenia Working Group of Psychiatric Genomics Consortium et al. (2014). Polygenic dissection of diagnosis and clinical dimensions of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 19, 1017–1024.doi: 10.1038/mp.2013.138
- Salzer, J. L., Rosen, C. L., and Struyk, A. F. (1996). “GPI-anchored proteins in neural cell adhesion,” in *Advances in Molecular and Cellular Biology, Cell adhesion*, ed. D. R. Colman (Greenwich, CT: JAI Press), 193–222.
- Serafini, G., Pompili, M., Innammati, M., Rihmer, Z., Sher, L., and Girardi, P. (2012). Can cannabis increase the suicide risk in psychosis? a critical review. *Curr. Pharm. Des.* 18, 5165–5187.doi: 10.2174/138161212802884663
- Singh, T., Walters, J. T. R., Johnstone, M., Curtis, D., Suvisaari, J., Torniainen, M., et al. (2017). The contribution of rare variants to risk of schizophrenia in individuals with and without intellectual disability. *Nat. Genet.* 49, 1167–1173. doi: 10.1038/ng.3903
- Sokolowski, M., Wasserman, J., and Wasserman, D. (2016). Polygenic associations of neurodevelopmental genes in suicide attempt. *Mol. Psychiatry* 21, 1381–1390. doi: 10.1038/mp.2015.187
- Stefansson, H., Ophoff, R. A., Steinberg, S., Andreassen, O. A., Cichon, S., Rujescu, D., et al. (2009). Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460, 744–747.doi: 10.1038/nature08186
- Struyk, A. F., Canoll, P. D., Wolfgang, M. J., Rosen, C. L., D'Eustachio, P., and Salzer, J. L. (1995). Cloning of Ntm defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *J. Neurosci.* 15, 2141–2156.
- Umeda-Yano, S., Hashimoto, R., Yamamori, H., Weickert, C. S., Yasuda, Y., Ohi, K., et al. (2014). Expression analysis of the genes identified in GWAS of the postmortem brain tissues from patients with schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 568, 12–16.doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.031
- van Os, J., and Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *Lancet* 374, 635–645.doi: 10.1016/S0140-6736(09)60995-8
- Vanaveski, T., Singh, K., Narvik, J., Eskla, K.-L., Visnapuu, T., Heinla, I., et al. (2017). Promoter-specific expression and genomic structure of IgLON family genes in mouse. *Front. Neurosci.* 11:38.doi: 10.3389/fnins.2017.00038
- Velásquez, E., Nogueira, F. C. S., Velásquez, I., Schmitt, A., Falkai, P., Domont, G. B., et al. (2017). Synaptosomal proteome of the orbitofrontal cortex from schizophrenia patients using quantitative label-free and iTRAQ-based shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* 16, 4481–4494.doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00422
- Wang, K. S., Liu, X. F., and Aragam, N. (2010). A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr. Res.* 124, 192–199.doi: 10.1016/j.schres.2010.09.002
- Weickert, C. S., Sheedy, D., Rothmond, D. A., Dedova, I., Fung, S., Garrick, T., et al. (2010). Selection of reference gene expression in a schizophrenia brain cohort. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 44, 59–70.doi: 10.3109/00048670903393662
- Ye, T., Lipska, B. K., Tao, R., Hyde, T. M., Wang, L., Li, C., et al. (2012). Analysis of copy number variations in brain DNA from patients with schizophrenia and other psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 72, 651–654.doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.014
- Yue, W., Yu, X., and Zhang, D. (2017). Progress in genome-wide association studies of schizophrenia in Han Chinese populations. *NPJ Schizophr.* 3:24. doi: 10.1038/s41537-017-0029-1

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer ED and the handling Editor declared their shared affiliation.

Copyright © 2018 Karis, Eskla, Kaare, Täht, Tuusov, Visnapuu, Innos, Jayaram, Timmusk, Weickert, Väli, Vasar and Philips. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maria Kaare

(sünnikuupäev: 06.03.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

IgLON perekonna adhesioonimolekulide ekspressiooni muutused seoses psüühikahäiretega ning *Negr1*^{-/-} hiire sotsiaalne fenotüüp

mille juhendajad on Mari-Anne Philips ja Tambet Tõnissoo

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 alates **05.28.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2018