

# DNA methylation and schizophrenia – the role in pathogenesis and the diagnosis of the disease

## *Metylacja DNA a schizofrenia – potencjalna rola w patogenezie i diagnostyce choroby*

Olga Płaza, Agata Szulc

Department of Psychiatry, Medical University of Warsaw, Poland;  
Klinika Psychiatryczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

### ABSTRACT

**Objective.** Schizophrenia is a neurodevelopmental disorder associated with deficits in cognition, affect, and social functioning. Despite its high heritability, there are known external risk factors, the presence of which substantially increases the likelihood of developing schizophrenia. Epigenetic modifications seem to play a key role in the multifactorial pathogenesis of the disease, linking genetic and environmental components through mechanisms that cause reversible changes in

gene expression in response to specific external factors. DNA methylation is an example of such a mechanism. This work aims to review the current research regarding its potential role in the development, diagnosis, and treatment of schizophrenia.

**Review of the literature.** This article reviews the literature related to the issue of DNA methylation in schizophrenia. Articles in English have been selected from the PubMed database, using the following search terms: “DNA methylation,” “schizophrenia,” and “markers.” As the basis for further analysis, reviews devoted directly to epigenetic modifications, including DNA methylation, in schizophrenia, published between 2017 and 2022, were chosen from the results. A summary of the collected data is presented below.

**Conclusions.** Characteristic changes in the methylation pattern of specific genes appear in tissues collected from patients with schizophrenia or from corresponding animal models. The goal of further research should be to create a database of specific DNA methylation patterns, the presence of which could act as a biomarker or an indicator of the effectiveness of a therapeutic process. It is crucial to standardise the genome methylation analysis system and to validate other tissues to be used as substitutes for the brain tissue.

### STRESZCZENIE

**Cel.** Schizofrenia jest zaburzeniem neurorozwojowym, które wiąże się z deficytami w aspekcie poznawczym



Received: 23.04.2022  
Accepted: 2.06.2022

### KEY WORDS:

- epigenetics
- DNA methylation
- schizophrenia
- biomarker

### SŁOWA KLUCZOWE:

- epigenetyka
- metylacja DNA
- schizofrenia
- biomarker

### CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Olga Płaza  
Mazowieckie Specjalistyczne Centrum Zdrowia  
im. prof. Jana Mazurkiewicza  
Oddział 2DE Oddział II DE  
2/4 Partyzantów Str., 05–802 Pruszków, Poland  
email: [olga.w.plaza@gmail.com](mailto:olga.w.plaza@gmail.com)

i afektywnym oraz w funkcjonowaniu społecznym. Zaburzenie to charakteryzuje się wysokim stopniem dziedziczności. Za rozwój choroby w znacznym stopniu odpowiadają jednak zewnętrzne czynniki ryzyka – ich pojawienie się zasadniczo zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania. Kluczową rolę w wieloczynnikowej patogenie schizofrenii, łączącej komponentę genetyczną z komponentą środowiskową, zdają się odgrywać modyfikacje epigenetyczne – mechanizmy warunkujące odwracalne zmiany ekspresji genów w odpowiedzi na określone czynniki zewnętrzne. Jednym z najlepiej poznanych mechanizmów epigenetycznych jest metylacja DNA. Celem pracy jest przegląd aktualnych kierunków badań dotyczących potencjalnej roli tego mechanizmu w rozwoju, diagnostyce i terapii schizofrenii.

**Przegląd literatury.** W artykule dokonano przeglądu literatury związanej z zagadnieniem metylacji DNA w schizofrenii. Z bazy naukowej PubMed wyszukane zostały kluczowe hasła: „DNA methylation”, „schizophrenia”, „markers”. Jako podstawa do dalszej analizy spośród

otrzymanych wyników wybrane zostały prace poglądowe poświęcone bezpośrednio modyfikacjom epigenetycznym (z uwzględnieniem metylacji) w schizofrenii, opublikowane w latach 2017–2022. Poniżej przedstawiono podsumowanie zebranych danych.

**Wnioski.** Charakterystyczne zmiany wzorca metylacji określonych genów pojawiają się znamienne często w tkankach pobranych od osób ze schizofrenią bądź w odpowiednich modelach zwierzęcych. Celem dalszych badań powinno być stworzenie bazy specyficznych wzorców metylacji DNA, których obecność mogłaby odgrywać rolę biomarkerów choroby bądź stanowić wyznacznik skuteczności procesu terapeutycznego. Kluczowa jest jednak standaryzacja systemu analizy stopnia metylacji genomu, uwzględniająca dodatkowe modyfikowalne i niemodyfikowalne czynniki wpływające na wzorec metylacji, różne metody analiz i technik oraz walidacja innych tkanek możliwych do wykorzystania w badaniach jako zastępczych dla tkanki mózgowej.

## Introduction

Epigenetics is the study of reversible changes in gene expression associated with DNA methylation, histone modifications, and regulatory mechanisms involving non-coding RNA (Kuehner *et al.*, 2019). These hereditary mechanisms, which are not accompanied by a concomitant change in the sequence of nucleotides in DNA, are influenced, *inter alia*, by the organism's exposure to external factors – not only in the prenatal period but also in early childhood and adolescence (Kundakovic *et al.*, 2013; Cavalli and Heard, 2019; Meaney, 2001). Since epigenetic modifications are crucial for the proper development of the central nervous system, factors that can potentially influence this process are of interest to researchers dealing with the pathogenesis and pathophysiology of neurological and psychiatric diseases with a multifactorial aetiology, in which both genetic and environmental factors are assumed to be of importance (Hauser and Dmitrzak-Węglarz, 2009).

Schizophrenia is a neurodevelopmental disorder that is associated with deficits in cognition, affect, and social functioning. The estimated prevalence of schizophrenia in the world is about 0.5–1% in the general population (McGrath *et al.*, 2008); however, the risk of its occurrence is much greater in relatives of those diagnosed with schizophrenia. Children with one ill parent have a 17% chance of getting sick in their lifetime, and when both parents are ill, the risk rises to 35% (Lichtermann *et al.*, 2000). Still, in identical and fraternal twins, the risk is 33% and 7%, respectively (Hilker *et al.*, 2017). The overall

heredity of the disease is estimated at 79% (Hilker *et al.*, 2017; Sullivan *et al.*, 2003).

Due to the importance of the genetic component in schizophrenia development, research is being carried out to define its molecular basis. Initial studies examining the role of previously selected single genes – most often associated with neurobiological pathways used in the treatment of schizophrenia or characteristically often present in families with frequent occurrence of the disease (Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee *et al.*, 2009) – allowed to identify the first genes with alleles related to the development of schizophrenia (Haraldsson *et al.*, 2011). However, since the candidate gene hypothesis allows for testing of only pre-selected genomic loci, the findings regarding genetic markers have not been extensive enough (Henriksen *et al.*, 2017; Gejman *et al.*, 2011).

Only genome-wide association studies (GWAS) allowed the identification of hundreds of specific loci and alleles associated with the development of schizophrenia, thus demonstrating a polygenic model in the development of the disease (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium *et al.*, 2014). As of now, whole-genome sequencing (WGS) – a comprehensive method for analysing entire genomes and not just polymorphisms related to previously selected microarrays – is becoming a more commonly used technique and is expected to become the basic method of genome research in the coming years (Uffelmann *et al.*, 2021).

Many of the loci associated with the higher chance of schizophrenia development are located in non-coding

parts of the gene, such as introns and promoter regions. This suggests that it is not genes themselves but their regulation that plays a key role in the development of the disease, thus implying epigenetics as a mediator of genetic risk in the pathogenesis of schizophrenia (Mendizabal *et al.*, 2019).

The arguments supporting this thesis include the possibility of lack of concordance in schizophrenia presence in monozygotic twins – the analysis of genomic DNA of monozygotic twins incompatible with schizophrenia showed discrepancies in the methylation patterns of some genes (Tsuji *et al.*, 1998). Additionally, there are known environmental risk factors for schizophrenia, such as childhood experiences of violence (Sahin *et al.*, 2013) or the use of cannabinoids, which are simultaneously analysed as potential factors influencing epigenetic modification (Parade *et al.*, 2021; Osborne *et al.*, 2020).

DNA methylation is one of the most thoroughly analysed epigenetic mechanisms. The addition of the methyl group to the C5 position of the cytosine in the DNA chain to form 5-methylcytosine changes the spatial structure of DNA, preventing the attachment of transcription factors, which most often results in silencing or limiting the gene expression (Dmitrzak-Węglarz *et al.*, 2009). Due to the extensive literature on the potential role of methylation in the etiopathogenesis of schizophrenia, this work will be devoted exclusively to this type of epigenetic modification to discuss the current analyses as fully as possible.

### Objective

This article aims to review the literature on genome methylation in patients with schizophrenia. The specific goals are as follows:

- listing genes in which particular patterns of methylation could be considered a potential biomarker of schizophrenia;
- determining factors impacting the effectiveness of testing specific tissues in terms of methylation patterns characteristic of schizophrenia;
- demonstrating the benefits of continuing research on genome methylation changes and other epigenetic modifications in patients with schizophrenia.

### Methods

Articles that meet the following criteria have been selected from PubMed, the largest biomedical scientific database, where the following was searched for:

- the presence of the keywords “DNA methylation,” “schizophrenia,” and “markers” in both the full text of the article and its abstract;
- publication date for the period between 2017 and 2022;
- review works published in English.

Twenty seven articles met the criteria. After listing according to relevance, the works meeting the following criteria were selected as the basis for further analysis:

- a topic directly devoted to epigenetic modifications in schizophrenia or a wider group of neuropsychiatric diseases, including schizophrenia;
- analysed studies carried out exclusively or mainly on tissues of human origin;
- extensive discussion and conclusions, taking into account the above-mentioned objectives.

### Methylation and schizophrenia

In mammals, DNA methylation involves almost exclusively the cytosine located in the CpG dinucleotide sequence (Bird, 1980). The areas of the genome with a large number of such groupings are called CpG islands (CGI) and are often located in the promoter region of genes. As research indicates such islands occur in the promoter regions of 70% of genes (Saxonov *et al.*, 2006), including virtually all housekeeping genes (Zhu *et al.*, 2008).

There is a relationship between the location of the CpG sequence in the genome and its methylation. The aforementioned promoter islands are almost exclusively unmethylated in all tissue types, with a maximum density of unmethylated CpG groups at the transcription start site. The regions of the genome containing single-copy sequences of moderate CpG density, which include most exons, introns and intergenic regions, show different levels of methylation, depending on the cell type, while CpGs present on scattered repeating sequences, such as transposons, tend to be methylated the strongest (Bestor *et al.*, 2015).

In any given cell, the genome methylation pattern consists of a universal methylation model in genes related to the universal cell functions and cell-type-specific methylation developed in coordination with cell line differentiation and organogenesis (Dor and Cedar, 2018). The correct pattern of methylation is crucial for the proper development of the nervous system (Khavari and Cairns, 2020); any disturbance of this process is associated with a higher incidence of neurological and psychiatric diseases. As methylation depends on external factors affecting the body, this mechanism is of interest to researchers dealing with diseases with a recognised multifactorial aetiology, including schizophrenia.

The most important pathogenetic concept of schizophrenia is the neurodevelopmental theory, according to which the disease is a consequence of disturbed brain development in people with a pre-existing genetic predisposition to schizophrenia (Owen *et al.*, 2011). According to this theory, the occurrence of the disease requires the coexistence of specific genetic factors and factors causing abnormal brain development.

The assumption that disturbance of the methylation mechanism of certain genes plays a key role in the aetiology of schizophrenia stays in line with this theory; in people with specific alleles of certain genes, the occurrence of factors disturbing their proper methylation will result in a disturbance of brain development and, consequently, in an increased risk of schizophrenia. Moreover, the dynamic nature of the methylation mechanism and its modifiability, depending on external factors, such as specific pharmacotherapy (Goud *et al.*, 2018), seems to further emphasise its role in the pathogenesis of schizophrenia.

Thus, it seems crucial to distinguish specific methylation patterns that occur significantly frequently in patients with schizophrenia, taking into account the differences in cell methylation depending on the source tissue. Methods allowing multi-level analysis of the methylation profile – used both when comparing methylation patterns in cells of different tissues and in the analysis of differences in the methylation pattern in a given tissue in sick patients and the control group – include, among others, sequencing with bisulfite or with the use of specific restriction enzymes (Kato and Iwamoto, 2014).

Research carried out using these methods allowed to document repetitive changes in the DNA methylation pattern of specific genes in the cells of given tissues, thus making it possible to begin the attempts to catalogue the results in hopes of creating a list of potential biomarkers of schizophrenia.

### Modification of methylation patterns in candidate genes in schizophrenia

Dozens of potential genes have been analysed over the last several decades in search for those most strongly associated with the development of schizophrenia. The following review is devoted to 9 genes which, due to their key role in either proper development of the nervous system or normal nerve conduction, are most often described in the literature.

A summary of the results of methylation analyses of individual genes carried out on tissues of human origin can be found in Table 1.

#### RELN

##### Gene function and potential role in aetiopathology

The RELN gene encodes reelin, a protein that plays a key role in regulating migration processes and the location of neurons in the developing brain (Sharaf *et al.*, 2015). Additionally, this protein stimulates the growth of dendrites (Niu *et al.*, 2008), determines synaptic plasticity by inducing and maintaining long-term synaptic enhancement (Weeber *et al.*, 2002), and regulates the migration of newly formed neuroblasts (Niu *et al.*, 2004).

The role of RELN gene variants in the development of schizophrenia remains the subject of numerous analyses, distinguishing alleles associated with impaired cognitive functioning and more severe symptoms of schizophrenia, and alleles increasing the risk of developing the disease (Wedenoja *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015). In animal models, where RELN expression was lowered to 50% of the expected value, decreased dendritic spine density was observed, as well as a deficit of long-term synaptic enhancement and a defective synaptic composition with accompanying anxiety, learning disorders, motor impulsivity, including cognitive and executive deficits (Guidotti *et al.*, 2016).

##### Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue

In studies using post-mortem tissue samples taken from the occipital and prefrontal cortex, Grayson *et al.* documented increased methylation in the promoter area of the reelin gene (Grayson *et al.*, 2005). In other another study using the same type of tissue, the result was replicated. Additionally, the mathematical dependence of the RELN gene silencing scale and the consistent reduction of the RELN protein level on the degree of promoter methylation was proved (Abdolmaleky *et al.*, 2005).

At the same time, there are analyses which indicate that there are no clear differences in methylation of RELN promoters in the genetic material obtained from samples of the prefrontal cortex of patients with schizophrenia compared to the healthy control group (Tochigi *et al.*, 2008). However, researchers note that the differences in the study protocols, including the different places in the brain from which the analysed tissues were collected, could have influenced the differences in the obtained results.

##### Observed modifications of the methylation pattern in peripheral tissues

Zhou *et al.* demonstrated increased levels of RELN promoter methylation in DNA obtained from blood samples collected from a group of patients with schizophrenia compared to genetic material obtained from control group samples. However, this study did not demonstrate a correlation between the level of methylation and the clinical manifestation of the disease (Zhou *et al.*, 2022).

In previous studies using genetic material isolated from the blood of four groups, i.e. a healthy control group, a group of patients with schizophrenia, twins non-concordant in regard to the disease presence, and twins both diagnosed with schizophrenia, no differences in both total and corrected levels of methylation of the reelin gene promoter were found. However, a significantly greater difference in the gene methylation pattern was observed in dizygotic twins compared to pairs of monozygotic twins, suggesting a key influence of heritability on the regulation of this particular promoter region (Bönsch *et al.*, 2012).

**Table 1.** A summary of the results of methylation analyses of individual genes carried out on tissues of human origin

Analysed gene [protein coded]	Function of the protein	Source of the analysed tissue	Obtained results	Source
<b>RELN</b> [relin]	Regulation of migration processes and the final location of neurons in the developing brain Induction and maintenance of long-term synaptic enhancement Regulation of dendrite development and neuroblast migration	frontal cortex, prefrontal cortex (post mortem)	Hypermethylation of the <i>RELN</i> promoter in the group of patients with schizophrenia	Grayson <i>et al.</i> , 2005 Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2005
		prefrontal cortex (post mortem)	No differences in <i>RELN</i> promoter methylation between the test group and the control group	Tochigi <i>et al.</i> , 2008
		peripheral blood	Hypermethylation of the <i>RELN</i> promoter in the group of patients with schizophrenia	Zhou <i>et al.</i> , 2022
		peripheral blood	No differences in <i>RELN</i> promoter methylation between the test group and the control group	Bönsch <i>et al.</i> , 2012
<b>GAD67 (GAD1)</b> [glutamate decarboxylase 1]	Decarboxylation of glutamate to gamma-aminobutyric acid and carbon dioxide	prefrontal cortex (post mortem)	<i>GAD1</i> promoter hypomethylation in the group of patients with schizophrenia	Huang i Akbarian, 2007
		frontal cortex (post mortem)	Increased <i>DNMT1</i> expression and decreased <i>GAD67</i> expression – presumed increased <i>GAD67</i> promoter methylation in a group of patients with schizophrenia	Veldic <i>et al.</i> , 2005
<b>COMT</b> [catechol-O-methyltransferase]	Catecholamine degradation	prefrontal cortex (post mortem)	Hypomethylation of the MB-COMT promoter in a group of patients with schizophrenia	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2006
		cerebellum (post mortem)	There were no differences in <i>COMT</i> promoter methylation between the test group and the control group	Dempster <i>et al.</i> , 2006
		saliva	Hypomethylation of the MB-COMT promoter in a group of patients with schizophrenia	Nohesara <i>et al.</i> , 2011
		peripheral blood	No differences in S-COMT methylation between the test group and the control group	Murphy <i>et al.</i> , 2005
<b>SOX10</b> [sex-determining region Y-box transcription factor 10]	Activator of transcription processes crucial for the development of the nervous crest and the CNS	prefrontal cortex (post mortem)	Hypermethylation within the <i>SOX10</i> gene in a group of patients with schizophrenia	Iwamoto <i>et al.</i> , 2005
<b>BDNF</b> [brain-derived neurotrophic factor]	Nerve growth factor determining the functioning and proper differentiation of retinal, cholinergic and dopaminergic neurons	brain tissue (post mortem)	No differences in <i>BDNF</i> gene methylation between the test group and the control group	Mill <i>et al.</i> , 2008
		peripheral blood	Hypermethylation of the <i>BDNF</i> promoter in a group of patients with schizophrenia	Ikegame <i>et al.</i> , 2013
<b>EGR1</b> [early growth response protein 1]	Participation in the processes of memory, learning and regulation of brain plasticity	peripheral blood	No significant differences in promoter methylation between the test group and the control group	Hu <i>et al.</i> , 2019
<b>5HT1A</b> [5-hydroxytryptamine receptor 1A]	Serotonin receptors and serotonin transporters	frontal lobes (post mortem)	<i>HTR2A</i> promoter hypomethylation and hypomethylation of a distal gene region in a group of patients with schizophrenia	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2011
<b>HTR2A</b> [5-hydroxytryptamine receptor 2A]		frontal lobes (post mortem)	Hypermethylation of the promoter of the <i>5-HTT</i> gene in a group of patients with schizophrenia	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2014
<b>5-HTT</b> [5-hydroxytryptamine]		leukocytes	Hypermethylation of the <i>5HT1A</i> gene promoter in a group of patients with schizophrenia	Carrard <i>et al.</i> , 2011

**GAD67 (GAD1) – glutamate decarboxylase 1****Gene function and potential role in aetiopathology**

The glutamate decarboxylase 67 (*GAD67*) gene, also known as glutamate decarboxylase 1 (*GAD1*), encodes an enzyme involved in the production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), the major neurotransmitter of inhibitory

neurons (Nishioka *et al.*, 2012; Asada *et al.*, 1997). The correct synthesis of GABA is crucial for the proper transmission in the prefrontal cortex; its disturbance causes the dysfunction of glutamatergic pyramidal neurons and the loss of synchronous cortical activity, crucial for the proper cognitive functioning (Lewis *et al.*, 2012).

### **Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue**

As in the case of the *RELN* gene, *GAD1* gene expression is reduced in patients with schizophrenia, which, according to researchers, is associated with its excessive methylation in the frontal cortex and other areas of the brain (Guidotti *et al.*, 2002; Fatemi *et al.*, 2005). In studies that involved determining the level of S-adenosylmethionine (SAM), the most important substrate of methylation processes used by DNMT1 in the methylation of CGI-rich promoters, it was shown that in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia, the SAM level is significantly elevated and the level of *GAD67* mRNA – reduced. Previous studies on animal models have shown that with increased methionine supply in mice, there is an increase in the SAM levels with subsequent hypermethylation of the *GAD67* promoter and reelin and, consequently, reduced *GAD67* expression (Tremolizzo *et al.*, 2005), which suggests that an analogous process occurs in human (Guidotti *et al.*, 2007).

In addition, in post-mortem tissues from the area of the frontal cortex, increased expression of the gene encoding DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) was found with simultaneous decreased expression of *GAD67*, which researchers associate with the enzyme catalysing the processes of methylation of the decarboxylase gene promoter, and thus a decrease in its activity (Veldic *et al.*, 2005).

At the same time, there are studies according to which hypomethylation of the *GAD1* gene promoter can be observed in neurons taken from the prefrontal cortex of patients with schizophrenia; invariably, however, the level of *GAD1* mRNA remained reduced in this group of respondents (Huang and Akbarian, 2007).

### **Animal model**

Studies on animal models have shown that the presence of an infection in the mother during pregnancy causes in offspring a disturbed expression of enzymes necessary for GABA synthesis; in the offspring of mice that underwent viral infection during pregnancy, increased levels of 5-methylated cytosines and 5-hydroxymethylated cytosines were observed in the *GAD1* promoter region, which resulted in the decreased expression of *GAD67* mRNA. Moreover, a correlation has been demonstrated between epigenetic modification of the *GAD1* promoter and impairment of working memory and social interactions caused by prenatal infection (Labouesse *et al.*, 2015).

### **COMT (catechol-O-methyltransferase)**

#### **Gene function and potential role in aetiopathology**

The *COMT* gene determines the synthesis of catechol-O-methyltransferase – an enzyme involved in the

metabolism of dopamine. The dopamine theory of the genesis of schizophrenia attributes the symptoms of schizophrenia to impaired dopaminergic signal transmission; excessive dopaminergic activity in the mesolimbic system is associated with the presence of psychotic symptoms, while the presence of negative symptoms is associated with reduced dopaminergic activity in the mesocortical pathway (Gałecki and Szulc, 2018). Fifteen percent of the total dopamine turnover in the striatum and nucleus accumbens depends on the activity of the *COMT* enzyme, while more than 60% – in the prefrontal cortex (Tylec *et al.*, 2007). The microdeletion of the 22q11 region, in which the gene is located, has shown a strong correlation with schizophrenia (Karayiorgou *et al.*, 2010). This deletion is one of the strongest factors in the development of psychosis (Schneider *et al.*, 2014) and up to a third of people with this deletion in late adolescence and early adulthood develop schizophrenia or schizoaffective disorder (Gothelf *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009).

### **Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue**

Studies of *COMT* promoter methylation in post-mortem samples from the frontal lobe of the brain of schizophrenia patients have shown that the promoter of the gene encoding the membrane-associated isoform (MB-COMT) is significantly hypomethylated, which in turn results in the increased expression of this enzyme (Abdolmaleky *et al.*, 2006).

At the same time, in studies of post-mortem samples from the cerebellum of patients with schizophrenia, it was not possible to show a change in *COMT* expression and differences in the promoter methylation of this gene between the group of patients with schizophrenia and the control group (Dempster *et al.*, 2006).

### **Observed modifications of the methylation pattern in peripheral tissues**

In the determination of the methylation level of the *MB-COMT* promoter in salivary samples from schizophrenia patients, hypomethylation of the *MB-COMT* promoter was also observed compared to the control group (Nohesara *et al.*, 2011).

It is worth noting that in the studies on methylation of the S-COMT isoform (soluble isoform) using the blood of sick patients and representatives of the control group, no differences in the promoter methylation of this isoform were found. Additionally, the DNA methylation patterns obtained from the blood of the study participants were compared to the DNA methylation patterns from 31 brain tissue samples taken from one healthy patient representing specific regions of the brain; interestingly, they were practically the same (Murphy *et al.*, 2005).

### **SOX10 (Sex-determining region Y-box transcription factor 10)**

#### ***Gene function and potential role in aetiopathology***

The *SOX10* gene is responsible for the transcription factor specific for oligodendrocytes and plays a key role in neural crest development and the subsequent differentiation of oligodendrocytes (Stolt *et al.*, 2002). The consequence of the abnormal course of these processes is a disturbance in the development of these cells and myelin, which is associated with the subsequent dysfunction of cognitive functions, such as attention, learning, and memory (Fields, 2008).

#### ***Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue***

In studies with the use of post-mortem tissue fragments from the prefrontal cortex of patients with schizophrenia, increased CGI methylation in the *SOX10* gene was shown, which directly correlated not only with reduced *SOX10* protein expression, but also with other genes related to the proper functioning of oligodendrocytes, including *OLIG2*, *MAG*, or *PLP1* (Iwamoto *et al.*, 2005).

### **BDNF (brain-derived neurotrophic factor)**

#### ***Gene function and potential role in aetiopathology***

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is a nerve growth factor and is a protein that determines the functioning and proper differentiation of retinal, cholinergic, and dopaminergic neurons. It is highly concentrated in the forebrain, hypothalamus, brainstem, cerebellum, and basal forebrain.

The decreased gene expression observed in the cortical regions of the brain influenced the disturbance of neuronal growth and synaptic density, which is associated with the development of schizophrenia (Causing *et al.*, 1997; Kato-Semba *et al.*, 1997).

#### ***Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue***

In the epigenomic analysis of the whole genome of brain tissues obtained post-mortem from patients with schizophrenia, no significant difference was found in the level of methylation in the *BDNF* gene compared to the control group; however, a relationship was found between methylation of the *BDNF* gene and the simultaneous presence of a specific genotype associated with psychosis (Mill *et al.*, 2008).

#### ***Observed modifications of the methylation pattern in peripheral tissues***

Increased methylation of the *BDNF* promoter was demonstrated in the study of genetic material obtained from blood collected from patients with schizophrenia

and control patients. It should be noted, however, that the CpGs showed relatively low levels of DNA methylation in all of the sites tested; mean values were less than 5%, regardless of diagnosis (Ikegame *et al.*, 2013). In addition, in the same study, the researchers indicated that the results could be influenced, among others, by prior pharmacotherapy, medical history, and lack of gender and leukocyte subpopulation standardisation.

It is worth mentioning that in studies devoted to the relationship between the experience of childhood abuse and *BDNF* gene methylation in patients with schizophrenia or schizoaffective disorders, a statistically significant relationship was also shown between hypermethylation – both in the area of the gene promoter and in its further areas – and childhood trauma. This relationship was demonstrated in the DNA isolated from blood from research and control groups. Although researchers point to the need to expand the research group to confirm the results, the obtained results are in line with the theory that environmental and genetic factors together influence the development of schizophrenia (Barker *et al.*, 2020).

### **EGR1 (early growth response protein 1)**

#### ***Gene function and potential role in aetiopathology***

*EGR1* (early growth response protein) is a protein which plays a crucial role in cell proliferation, immune response, and memory processes (Amoli *et al.*, 2019). In patients with schizophrenia, decreased expression of the *EGR1* gene was observed in the prefrontal cortex and peripheral blood (Ramaker *et al.*, 2017; Pérez-Santiago *et al.*, 2012), which, given *EGR1* role in processes regulating memory, learning ability and brain plasticity, researchers link to the onset of the disease.

#### ***Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue***

In patients with schizophrenia, decreased expression of the *EGR1* gene has been observed in the prefrontal cortex (Ramaker *et al.*, 2017; Pérez-Santiago *et al.*, 2012). However, there are no studies devoted to epigenetic modifications of the *EGR1* gene that would be carried out on genetic material obtained from the brain tissues of patients with schizophrenia.

#### ***Observed modifications of the methylation pattern in peripheral tissues***

In studies using DNA obtained from peripheral blood collected from patients and a healthy control group, no statistically significant difference was found in the methylation of the *EGR1* gene promoter. Interestingly, however, a clear, although statistically insignificant, the difference was observed when comparing

the levels of EGR1 promoter methylation in the population of men with schizophrenia compared to other groups, which is in line with the previous research on gender differences in brain development, gene expression, and epigenomic profile in schizophrenia (Hu *et al.*, 2019).

**5HTR1A (5-hydroxytryptamine receptor 1A),  
HTR2A (5-hydroxytryptamine receptor 2A),  
5-HTT (5-hydroxytryptamine)**

#### **Gene function and potential role in aetiopathology**

Hypermethylation of genes regulating the expression of the serotonin 1A receptor, serotonin 2A receptor and the serotonin transporter, respectively, has been associated with the presence of schizophrenia (Abdolmaleky *et al.*, 2014; Carrard *et al.*, 2011). Additionally, the presence of both positive and negative symptoms may be associated with an increased density of 5-HT1A receptors and a decreased density of HTR2A receptors in the prefrontal cortex (Ngan *et al.*, 2000).

#### **Observed modifications of the methylation pattern in the brain tissue**

Post-mortem studies on DNA obtained from the frontal lobes of patients with schizophrenia confirmed hypermethylation of the HTR2A promoter with simultaneous hypomethylation of one of the further regions of the gene compared to the control group. As a result, lower gene expression was found, which researchers have linked to earlier onset of the disease (Abdolmaleky *et al.*, 2011).

In another study, also using DNA obtained from post-mortem samples from the frontal lobe of patients with schizophrenia, Abdolmaleky *et al.* demonstrated hypermethylation of the 5-HTT gene promoter, especially evident in previously untreated patients (Abdolmaleky *et al.*, 2014).

#### **Observed modifications of the methylation pattern in peripheral tissues**

In DNA obtained from leukocytes of patients with schizophrenia, hypermethylation of the promoter of the 5HTR1A gene was confirmed in comparison with the healthy control group. The obtained results were independent of the age or sex of the respondents (Carrard *et al.*, 2011).

## **Conclusions**

An undoubted challenge in analysing the role of gene methylation in the pathogenesis of schizophrenia is the multitude of variables that additionally affect the methylation pattern of the human genome. These include, but are not limited to, gender, age, the use of antipsychotic drugs, duration of illness, smoking, body weight, and age

at onset. The key seems to be to create a system allowing to distinguish primary changes in the methylation of the patient's genome from specific artefacts, both modifiable (e.g. related to pharmacotherapy) and immutable (e.g. origin).

Meta-analyses devoted to research on epigenetic modifications in schizophrenia also indicate a multitude of types and techniques used in tissue analyses, which additionally make it difficult to reproduce the research and re-verify its results (Smigielski *et al.*, 2020). Due to the ease of sampling, most of the tests are carried out using post-mortem samples of the brain or peripheral blood. There are considerations regarding the stability and biological implications of epigenetic measurements in post-mortem tissues (Sjöholm *et al.*, 2018). It should, however, be remembered that the results of analyses of post-mortem tissues are influenced by many additional factors, such as the time elapsed since sampling or related to death by metabolic processes (Tomita *et al.*, 2004).

In addition, it has been shown that different cell types have different epigenetic patterns; hence the use of mixed tissue and cell samples may limit the identification of epigenetic changes in schizophrenia as these changes may be masked by epigenetic modifications specific to the tissue. The solution may be the final validation of blood and saliva as replacement tissues. The mirror image model, according to which factors influencing brain processes leave biomarker signatures in the blood and the methylation status of many places in the blood reflects that in the brain, has been confirmed by research (Aberg *et al.*, 2013).

Researchers also point to the need to extend the research method used as gene-specific approaches are by definition limited, but even GWAS analyses use specific probes to detect methylation, which results in certain subjectivity of the results obtained. An objective picture of DNA methylation in patients with schizophrenia will be possible only after conducting tests using techniques that take into account other sites of attachment of methyl groups, which will allow a complete analysis of the patient's genome (Mendizabal *et al.*, 2019).

One of the main goals of epigenetic research on genome modification in patients with schizophrenia is the discovery of specific biomarkers that would facilitate an earlier diagnosis of schizophrenia and the initiation of a personalised therapeutic process. It seems that conducting comprehensive genome studies with a clearly defined protocol offers an opportunity to identify specific DNA methylation patterns that are early biomarkers of the disease and to create treatment standards tailored to the presence of alleles and modifications in a given patient (Hu *et al.*, 2019). So far, it has been shown that some of the antipsychotic drugs affect the methylation status of selected genes (Guidotti and Grayson, 2014; Tang *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2016). Therefore, it can be suspected that the knowledge of a patient's genomic profile could allow the introduction of targeted antipsychotic



therapy, and in a wider perspective, the introduction of new therapeutic methods.

It should also be remembered that methylation is one of many epigenetic mechanisms and it is not possible to compile a complete list of potential schizophrenia

biomarkers without considering the role played by histone modifications or non-coding RNAs. Only a collective analysis of all these factors will enable further understanding of the mechanisms of the formation of schizophrenia. ■

## Wstęp

Epigenetyka jest nauką poświęconą badaniu odwracalnych zmian ekspresji genów, związanych z metylacją DNA, modyfikacjami histonów oraz mechanizmami regulacyjnymi z udziałem niekodującego RNA (Kuehner *et al.*, 2019). Na te dziedziczne mechanizmy, którym nie towarzyszy współlistniejąca zmiana w sekwencji nukleotydów w DNA, wpływa między innymi ekspozycja organizmu na czynniki zewnętrzne nie tylko w okresie prenatalnym, ale także we wczesnym dzieciństwie oraz w młodości (Kundakovic *et al.*, 2013; Cavalli and Heard, 2019; Meaney, 2001). Ponieważ modyfikacje epigenetyczne są kluczowe dla prawidłowego rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, czynniki, które mogą potencjalnie wpłynąć na ten proces, stanowią przedmiot zainteresowania badaczy zajmujących się patogenezą oraz patofizjologią chorób neurologicznych i psychiatrycznych o wieloczynnikowej etiologii, zakładającej współdziałanie czynników genetycznych i środowiskowych (Hauser i Dmítrzak-Węglarz, 2009).

Schizofrenia jest zaburzeniem neurorozwojowym, które wiąże się z deficytami w zakresie poznania, afektu i funkcjonowania społecznego. Szacunkowa częstość występowania schizofrenii na świecie wynosi około 0,5–1% w populacji ogólnej (McGrath *et al.*, 2008) – ryzyko jej wystąpienia jest znacznie większe u krewnych osób dotkniętych chorobą. Dzieci z jednym chorym rodzicem mają 17-proc. szansę na zachorowanie w ciągu swojego życia, a gdy choruje oboje rodziców, ryzyko to wzrasta do 35% (Lichtermann *et al.*, 2000); u bliźniąt jednojajowych i dwujajowych ryzyko to wynosi odpowiednio 33% i 7% (Hilker *et al.*, 2017). Ogólna dziedziczność choroby szacowana jest na sięgającą 79% (Hilker *et al.*, 2017; Sullivan *et al.*, 2003).

W związku z istotnością dla rozwoju choroby komponenty genetycznej prowadzone są badania mające na celu zdefiniowanie jej molekularnych podstaw. Początkowe prace badawcze, sprawdzające rolę wcześniej wyselekcjonowanych pojedynczych genów – najczęściej związanych ze szlakami neurobiologicznymi wykorzystywanymi w leczeniu schizofrenii bądź wyróżnionych podczas badań rodzin o częstym występowaniu choroby (Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee *et al.*, 2009) – pozwoliły na zidentyfikowanie pierwszych genów, których allele związane są z jej rozwojem (Haraldsson *et al.*,

2011). Ponieważ jednak hipoteza genów kandydujących zakłada testowanie wcześniej zdefiniowanych loci genomowych, poczynione odkrycia dotyczące markerów genetycznych okazały się niedostatecznie wyczerpujące (Henriksen *et al.*, 2017; Gejman *et al.*, 2011). Dopiero badania asocjacyjne całego genomu (*genome-wide association studies*, GWAS) umożliwiły zidentyfikowanie setek konkretnych loci i powiązanych alleli mających związek z rozwojem schizofrenii oraz wykazały poligeniczny model w rozwoju choroby (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium *et al.*, 2014). Obecnie popularność zdobywają także badania sekwencjonowania całego genomu (*whole genome sequencing*, WGS), które pozwalają natychmiastowo poznać cały genom pacjenta, a nie tylko polimorfizmy powiązane z wcześniej wybranymi mikromacierzami. Dostępność tej metody rośnie i przypuszcza się, że to WGS stanie się w najbliższych latach podstawową metodą badań genomu (Uffelmann *et al.*, 2021).

Wiele loci genetycznego ryzyka schizofrenii zlokalizowanych jest w regionach niekodujących, takich jak introny i regiony promotorowe. Pozwala to sądzić, że nie tyle geny, ile ich regulacja odgrywa kluczową rolę dla rozwoju choroby, co implikuje epigenetykę jako mediatora ryzyka genetycznego w patogenezie schizofrenii (Mendizabal *et al.*, 2019).

Do argumentów popierających tę tezę zaliczyć można fakt występowania schizofrenii u jednego z bliźniąt monozygotycznych – analiza genomowego DNA bliźniąt jednojajowych niezgodnych pod względem zachorowania na schizofrenię wykazała rozbieżności we wzorcach metylacji niektórych genów (Tsujita *et al.*, 1998). Co więcej, znane są środowiskowe czynniki ryzyka schizofrenii – takie jak dziecięce doświadczenia przemocy (Sahin *et al.*, 2013) czy stosowanie kannabinoidów – które są równocześnie analizowane pod kątem bycia potencjalnymi czynnikami wpływającymi na modyfikacje epigenetyczne (Parade *et al.*, 2021; Osborne *et al.*, 2020).

Metylacja DNA jest jednym z najdokładniej opisanych mechanizmów epigenetycznych. Dodanie grupy metylowej do węgla 5 cytozyny w łańcuchu DNA zmienia strukturę przestrzenną DNA, uniemożliwiając przyłączenie się czynników transkrypcyjnych, co najczęściej skutkuje wyciszeniem bądź ograniczeniem ekspresji genu (Dmítrzak-Węglarz and Hauser, 2009). Z uwagi na obszerność literatury dotyczącej potencjalnej roli metylacji

w etiopatogenezie schizofrenii poniższa praca poświęcona będzie wyłącznie temu rodzajowi modyfikacji epigenetycznej – by możliwie najbardziej wyczerpującego omówić dotychczasowe analizy.

## Cel

Celem artykułu jest przegląd piśmiennictwa dotyczącego badań nad metylacją genomu u pacjentów ze schizofrenią. Szczegółowe cele są następujące:

- omówienie przykładów genów, których metylacja uważana jest za potencjalny biomarker schizofrenii;
- określenie czynników wpływających na efektywność badań określonych tkanek pod kątem wzorów metylacji charakterystycznych dla schizofrenii;
- wskazanie korzyści wynikających z kontynuacji badań poświęconych zmianom metylacji genomu oraz innym modyfikacjom epigenetycznym u pacjentów ze schizofrenią.

## Metodyka

Z największej biomedycznej bazy naukowej PubMed wyselekcjonowane zostały artykuły spełniające następujące kryteria:

- obecność słów kluczowych „DNA methylation”, „schizophrenia”, „markers”, z zastrzeżeniem, że występują w abstrakcie;
- data publikacji w przedziale lat 2017–2022;
- praca przeglądowa opublikowana w języku angielskim.

Otrzymano 27 abstraktów. Po uporządkowaniu zgodnie z trafnością jako podstawy do dalszej analizy wybrane zostały prace spełniające następujące kryteria:

- temat bezpośrednio poświęcony modyfikacjom epigenetycznym w schizofrenii bądź w szerszej grupie chorób neuropsychiatrycznych, z uwzględnieniem schizofrenii;
- analizowane badania przeprowadzane wyłącznie lub w większości na tkankach pochodzenia ludzkiego;
- obszerna i wyczerpująca dyskusja i wnioskowanie, uwzględniająca wyżej wymienione cele.

## Metylacja a schizofrenia

U ssaków metylacja DNA dotyczy niemal wyłącznie cytozyny zlokalizowanej w dinukleotydowej sekwencji CpG. (Bird, 1980). Obszary genomu o dużej liczbie takich ugrupowań nazywane są wyspami CpG (*CpG islands*, CGI) i często umiejscowione są w regionie promotorowym genów – badania wskazują, że takie wyspy występują w regionach promotorowych 70% genów (Saxonov *et al.*; 2006), w tym praktycznie we wszystkich genach

metabolizmu podstawowego (tzw. *housekeeping genes*), (Zhu *et al.*, 2008).

Istnieje zależność między lokalizacją sekwencji CpG w genomie a jej metylacją. Wspomniane wyspy promotorowe są prawie wyłącznie niemetylowane we wszystkich typach tkanek, z maksimum gęstości niemetylowanych grup CpG w miejscu startu transkrypcji. Obszary genomu zawierające jednokopiowe sekwencje o umiarkowanej gęstości CpG, do których zalicza się większość eksonów, intronów i regionów międzygenowych, prezentują różne poziomy metylacji w zależności od typu komórki, natomiast CpG obecne na rozproszonych powtarzających się sekwencjach, jak na przykład transpozony, mają tendencję do najsilniejszego metylowania (Bestor *et al.*, 2015).

Na wzór metylacji genomu w danej komórce składa się uniwersalny dla wszystkich tkanek wzór metylacji dotyczący genów związanych z podstawowymi procesami zachodzącymi we wszystkich komórkach oraz specyficzny dla danego typu komórki wzór metylacji powstający w korelacji z różnicowaniem linii komórkowych i organogenezą (Dor i Cedar, 2018). Prawidłowy wzór metylacji jest kluczowy dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego (Khavari i Cairns, 2020) – zaburzenie tego procesu powiązane jest z częstszym występowaniem chorób neurologicznych i psychiatrycznych. Ponieważ metylacja zależna jest od czynników zewnętrznych wpływających na organizm, mechanizm ten stanowi obiekt zainteresowania badaczy zajmujących się chorobami o uznanej wieloczynnikowej etiologii, do których zaliczana jest schizofrenia.

Najważniejszą koncepcją patogenetyczną schizofrenii pozostaje teoria neurorozwojowa, według której zachorowanie jest następstwem zaburzenia rozwoju mózgu u osób z istniejącą wcześniej predyspozycją genetyczną do wystąpienia schizofrenii (Owen *et al.*, 2011). Według tej teorii dla wystąpienia choroby niezbędne jest współistnienie swoistych czynników genetycznych i czynników powodujących nieprawidłowy rozwój mózgu.

W teorię tę wpisuje się założenie, które wskazuje na kluczową rolę zaburzenia mechanizmu metylacji w etiologii schizofrenii – u osób o określonych allelach danych genów wystąpienie czynników zaburzących prawidłową ich metylację skutkować będzie zaburzeniem rozwoju mózgu i co za tym idzie – zwiększonym ryzykiem wystąpienia schizofrenii. Co więcej, dynamiczny charakter mechanizmu metylacji i jego modyfikowalność, zależna od czynników zewnętrznych, w tym określonej farmakoterapii (Goud *et al.*, 2018), zdaje się dodatkowo podkreślać jego rolę w patogenezie schizofrenii.

Kluczowe tym samym zdaje się wyodrębnienie określonych wzorców metylacji występujących znamienne często u pacjentów ze schizofrenią, z uwzględnieniem różnic w metylacji komórek w zależności od źródłowej tkanki. Do metod pozwalających na wielopoziomową analizę profilu metylacji – stosowanych zarówno przy porównywaniu wzorów metylacji w komórkach różnych tkanek, jak i w analizie różnic wzorca metylacji w danej

tkance u chorych pacjentów i grupy kontrolnej, zalicza się między innymi sekwencjonowanie wodorosiarczynem bądź z wykorzystaniem specyficznych enzymów restrykcyjnych (Kato i Iwamoto, 2014).

Badania prowadzone z wykorzystaniem tych metod pozwoliły odnotować powtarzalne zmiany we wzorze metylacji DNA określonych genów w komórkach danych tkanek, i tym samym umożliwiły rozpoczęcie prób katalogowania wyników pod kątem stworzenia listy potencjalnych biomarkerów schizofrenii.

### Modyfikacje metylacji genów kandydujących w schizofrenii

Chociaż na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat poświęconych poszukiwaniom genów najsilniej związanych z rozwojem schizofrenii analizowane były dziesiątki potencjalnych genów, poniższy przegląd poświęcony jest 9 genom, które ze względu na kluczową rolę w prawidłowym rozwoju układu nerwowego bądź w prawidłowym przewodnictwie nerwowym są najczęściej opisywane w literaturze.

Zestawienie wyników analiz metylacji poszczególnych genów przeprowadzonych na tkankach pochodzenia ludzkiego znaleźć można w tabeli 1.

#### RELN

##### Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii

Gen *RELN* odpowiada za kodowanie reliny, białka pełniącego kluczową rolę dla regulacji procesów migracji i umiejscowienia neuronów w rozwijającym się mózgu (Sharaf *et al.*, 2015). Dodatkowo białko to stymuluje rozwój dendrytów (Niu *et al.*, 2008), warunkuje plastyczność synaps poprzez indukcję i utrzymanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Weeber *et al.*, 2002) oraz reguluje migrację nowopowstałych neuroblastów (Niu *et al.*, 2004).

Rola wariantów genu *RELN* w rozwoju schizofrenii pozostaje tematem licznych analiz, w których wyróżniono allele mające związek z upośledzonym funkcjonowaniem poznawczym oraz z cięższymi objawami schizofrenii oraz allele zwiększające ryzyko rozwoju choroby (Wedenoja *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015). W modelach zwierzęcych, w których ekspresja *RELN* została obniżona do 50% oczekiwanej wartości, obserwowano zmniejszoną gęstość kolców dendrytycznych, deficyt długotrwałego wzmocnienia synaptycznego i wadliwy skład struktury synaptycznej z towarzyszącym lękiem, zaburzeniami uczenia, impulsywnością ruchową i deficytami funkcji poznawczych i wykonawczych (Guidotti *et al.*, 2016).

##### Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu

W badaniach z wykorzystaniem próbek tkanki pobranej pośmiertnie z kory potylicznej i kory przedczołowej

Grayson wraz ze współpracownikami wykazał zwiększoną metylację na obszarze promotora genu reliny (Grayson *et al.*, 2005). Wynik ten znalazł potwierdzenie w innych badaniach z wykorzystaniem tej samej tkanki, w których dodatkowo wykazana została matematyczna zależność skali wyciszenia genu *RELN* i konsekwentnego obniżenia poziomu białka *RELN* od stopnia metylacji promotora (Abdolmaleky *et al.*, 2005).

Jednocześnie istnieją analizy, które wskazują na to, że nie istnieją wyraźne różnice w metylacji promotorów *RELN* w materiale genetycznym uzyskanym z próbek kory przedczołowej pacjentów ze schizofrenią w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną (Tochigi *et al.*, 2008). Badacze zwracają jednak uwagę na różnice w protokołach badań, w tym na różne miejsca w mózgu, z których pobierane były analizowane tkanki, co mogło wpłynąć na różnice w otrzymanych wynikach.

##### Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkankach obwodowych

Zhou wraz ze współpracownikami wykazał zwiększony poziom metylacji promotora *RELN* w DNA pozyskanym z krwi pobranej od grupy pacjentów ze schizofrenią w porównaniu z materiałem genetycznym uzyskanym od grupy kontrolnej. W tym badaniu nie została jednak wykazana korelacja między poziomem metylacji a obrazem choroby (Zhou *et al.*, 2022).

We wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem materiału genetycznego wyizolowanego z krwi czterech grup: zdrowej grupy kontrolnej, grupy pacjentów ze schizofrenią, bliźniąt różniących się obecnością choroby oraz bliźniąt, u których występuje choroba, nie zostały wykazane różnice w całkowitej i korygowanej metylacji promotora genu reliny. Zaobserwowana została jednak znacząco większa różnica we wzorcu metylacji genu u bliźniąt dwuzygotycznych w porównaniu z parami bliźniaków jednozajowych, co sugeruje kluczowy wpływ odziedziczalności na regulację tego konkretnego regionu promotora (Bönsch *et al.*, 2012).

#### GAD67 (*GAD1*) – glutamate decarboxylase 1

##### Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii

Gen dekarboksylazy glutaminianowej 67 (*GAD67*), znany również jako dekarboksylaza glutaminianowa 1 (*GAD1*), koduje enzym zaangażowany w produkcję kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), głównego neuroprzekaźnika neuronów hamujących (Nishioka *et al.*, 2012; Asada *et al.*, 1997). Prawidłowa synteza GABA jest kluczowa dla prawidłowego przekazywania w korze przedczołowej – jej zaburzenie powoduje zaburzenie funkcjonowania neuronów piramidowych glutaminergicznych i utratę synchronicznej aktywności korowej, kluczowej dla prawidłowego funkcjonowania poznawczego (Lewis *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Zestawienie wyników analiz metylacji poszczególnych genów przeprowadzonych na tkankach pochodzenia ludzkiego

Badany gen [kodowane białko]	Funkcja kodowanego białka	Źródło badanej tkanki	Uzyskane wyniki	Źródło
<b>RELN</b> [relina]	Regulacja procesów migracji i umiejscowienia neuronów w rozwijającym się mózgu Indukcja i utrzymanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego Regulacja rozwoju dendrytów i migracji neuroblastów	Kora potyliczna, kora przedczołowa (post mortem)	Hipermetylacja promotora <i>RELN</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Grayson <i>et al.</i> , 2005 Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2005
		Kora przedczołowa (post mortem)	Brak różnic w metylacji promotora <i>RELN</i> między grupą badaną a grupą kontrolną	Tochigi <i>et al.</i> , 2008
		Krew obwodowa	Hipermetylacja promotora <i>RELN</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Zhou <i>et al.</i> , 2022
		Krew obwodowa	Brak różnic w metylacji promotora <i>RELN</i> między grupą badaną a grupą kontrolną	Bönsch <i>et al.</i> , 2012
<b>GAD67 (GAD1)</b> [dekarboksylaza kwasu glutaminowego]	Dekarboksylacja glutaminy do kwasu gamma-aminomasłowego i dwutlenku węgla	Kora przedczołowa (post mortem)	Hipometylacja promotora <i>GAD1</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Huang i Akbarian, 2007
		Kora czołowa (post mortem)	Zwiększona ekspresja <i>DNMT1</i> i zmniejszona ekspresji <i>GAD67</i> – przypuszczalna zwiększona metylacja promotora <i>GAD67</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Veldic <i>et al.</i> , 2005
<b>COMT</b> [katecholo-O-metylotransferaza]	Degradacja katecholamin	Kora przedczołowa (post mortem)	Hipometylacja promotora <i>MB-COMT</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2006
		Mózdzek (post mortem)	Brak różnic metylacji promotora <i>COMT</i> między grupą badaną a grupą kontrolną	Dempster <i>et al.</i> , 2006
		Ślina	Hipometylacja promotora <i>MB-COMT</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Nohesara <i>et al.</i> , 2011
		Krew obwodowa	Brak różnic w metylacji <i>S-COMT</i> między grupą badaną a grupą kontrolną	Murphy <i>et al.</i> , 2005
<b>SOX10</b> [czynnik transkrypcji specyficzny dla oligodendrocytów]	Aktywator procesów transkrypcji kluczowych dla rozwoju grzebienia nerwowego i OUN	Kora przedczołowa (post mortem)	Hipermetylacja w obrębie genu <i>SOX10</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Iwamoto <i>et al.</i> , 2005
<b>BDNF</b> [neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego]	Czynnik wzrostu nerwów warunkujący funkcjonowanie i prawidłowe różnicowanie neuronów siatkówki, cholinergicznym i dopaminergicznym	Tkanka mózgowia (post mortem)	Brak różnic metylacji genu <i>BDNF</i> między grupą badaną a grupą kontrolną	Mill <i>et al.</i> , 2008
		Krew	Hipermetylacja promotora <i>BDNF</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Ikegame <i>et al.</i> , 2013
<b>EGR1</b> [białko odpowiedzi wczesnego wzrostu]	Uczestnictwo w procesach zapamiętywania, nauki i regulacji plastyczności mózgu	Krew obwodowa	Brak istotnych różnic w metylacji promotora między grupą badaną a grupą kontrolną	Hu <i>et al.</i> , 2019
<b>5HTT</b> [transporter serotoniny]	Receptory dla serotoniny oraz transportery serotoniny	Platy czołowe (post mortem)	Hipermetylacja promotora <i>HTR2A</i> , hipometylacja dalszego obszaru genu w grupie pacjentów ze schizofrenią	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2011
		Platy czołowe (post mortem)	Hipermetylacja promotora genu <i>5-HTT</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Abdolmaleky <i>et al.</i> , 2014
		Leukocyty	Hipermetylacja promotora genu <i>5HTT</i> w grupie pacjentów ze schizofrenią	Carrard <i>et al.</i> , 2011

### Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu

Podobnie jak w przypadku genu *RELN* ekspresja genu *GAD1* jest obniżona u pacjentów ze schizofrenią, co według badaczy powiązane jest z nadmierną jego metylacją w korze czołowej oraz innych obszarach mózgu (Guidotti

*et al.*, 2002; Fatemi *et al.*, 2005). W badaniach, które polegały na oznaczeniu poziomu S-adenozylometioniny (SAM) – najważniejszego substratu procesów metylacji, wykorzystywanego przez *DNMT1* w procesie metylacji promotorów bogatych w CGI – wykazano, że w korze przedczołowej pacjentów ze schizofrenią poziom SAM

jest znacznie podwyższony, a poziom mRNA *GAD67* obniżony. We wcześniej przeprowadzanych badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że przy zwiększonej podaży metioniny u myszy następuje wzrost poziomu SAM z następczą hipermetylacją promotora *GAD67* oraz reliny i w konsekwencji zmniejszoną ekspresją *GAD67* (Tremolizzo *et al.*, 2005), co pozwala przypuszczać, że analogiczny proces następuje u człowieka (Guidotti *et al.*, 2007).

Dodatkowo, w pobranych pośmiertnie tkankach z obszaru kory czołowej stwierdzona została zwiększona ekspresja genu kodującego metylotransferazę DNA 1 (*DNMT1*) przy równoczesnej zmniejszonej ekspresji *GAD67*, co badacze wiążą z katalizowaniem przez enzym procesów metylacji promotora genu dekarboksylazy, a tym samym zmniejszeniem jego aktywności (Veldic *et al.*, 2005).

Jednocześnie istnieją badania, według których w pobranych z kory przedczołowej pacjentów ze schizofrenią neuronach obserwować można hipometylację promotora genu *GADI*; niezmiennie jednak poziom mRNA *GADI* pozostawał obniżony i w tej grupie badanych (Huang i Akbarian, 2007).

#### **Model zwierzęcy**

Badania na modelach zwierzęcych pozwoliły wykazać, że obecność u matki zakażenia w trakcie ciąży powoduje u potomstwa zaburzoną ekspresję enzymów niezbędnych do syntezy GABA – u potomstwa myszy, które w okresie ciąży przeszły infekcję wirusową obserwowany był zwiększony poziom 5-metylowanych cytozyn i 5-hydroksymetylowanych cytozyn w regionie promotora *GADI*, co skutkowało zmniejszoną ekspresją mRNA *GAD67*. Co więcej, wykazana została korelacja między epigenetyczną modyfikacją promotora *GADI* i zaburzeniami pamięci roboczej i interakcji społecznych wywołanymi infekcją prenatalną (Labouesse *et al.*, 2015).

### **COMT (catechol-O-methyltransferase)**

#### **Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii**

Gen *COMT* warunkuje syntezę katecholo-O-metylotransferazy – enzymu biorącego udział w metabolizmie dopaminy. Teoria dopaminowa genezy schizofrenii przypisuje objawy schizofrenii zaburzonemu przekazywaniu sygnału dopaminergicznego – nadmierna aktywność dopaminergiczna w układzie mezo limbicznym wiąże się z obecnością objawów psychotycznych, natomiast ze zmniejszoną aktywnością dopaminergiczną w szlaku mezo kortykalnym związana jest obecność objawów negatywnych (Gałecki, Szulc, 2018). Od aktywności enzymu *COMT* zależy 15% całkowitego obrotu metabolicznego dopaminy w prążkowiu i jądrze półleżącym, podczas gdy w korze przedczołowej ponad 60% (Tylec *et al.*, 2007).

Mikrodelecja regionu 22q11, w którym znajduje się gen, wykazała silną korelację ze schizofrenią (Karayiorgou

*et al.*, 2010). Delecja ta jest jednym z najsilniejszych czynników rozwoju psychozy (Schneider *et al.*, 2014), i nawet u jednej trzeciej osób z tą delecją w późnym okresie dojrzewania i wczesnej dorosłości rozwija się schizofrenia lub zaburzenie schizoafektywne (Gothelf *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu**

Badania metylacji promotora *COMT* w pośmiertnych próbkach z płata czołowego mózgu pacjentów ze schizofrenią wykazały, że promotor genu kodującego izoformę związaną z błoną (*MB-COMT*) jest znamienne często hipometylowany, co w konsekwencji powoduje zwiększoną ekspresję tego enzymu (Abdolmaleky *et al.*, 2006).

Równocześnie w badaniach próbek pobranych post mortem z mózdków pacjentów ze schizofrenią nie udało się wykazać zmiany w ekspresji *COMT* i różnic w metylacji promotora tego genu między grupą chorych na schizofrenię a grupą kontrolną (Dempster *et al.*, 2006).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkankach obwodowych**

W oznaczeniach poziomu metylacji promotora *MB-COMT* w próbkach śliny pobranych od pacjentów ze schizofrenią również zaobserwowano hipometylację promotora *MB-COMT* w porównaniu z grupą kontrolną (Nohesara *et al.*, 2011).

Warto zaznaczyć, że w badaniach poświęconych metylacji izoformy *S-COMT* (izoforma rozpuszczalna) z wykorzystaniem krwi chorych pacjentów i przedstawicieli grupy kontrolnej nie wykazano różnic w metylacji promotora tej izoformy. Dodatkowo, wzorce metylacji DNA uzyskanego z krwi uczestników badania porównane zostały do wzorców metylacji DNA z uzyskanych od jednego zdrowego pacjenta 31 próbek tkanki mózgowej reprezentujących określone regiony mózgu – co ciekawe, były one praktycznie takie same (Murphy *et al.*, 2005).

### **SOX10 (Sex-determining region Y-box transcription factor 10)**

#### **Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii**

Gen *SOX10* odpowiedzialny jest za czynnik transkrypcji specyficzny dla oligodendrocytów i odgrywa kluczową rolę w rozwoju grzebienia nerwowego oraz w późniejszym różnicowaniu oligodendrocytów (Stolt *et al.*, 2002). Konsekwencją nieprawidłowego przebiegu tych procesów jest zaburzenie rozwoju tych komórek i mieliny, co wiąże się z późniejszą dysfunkcją funkcji poznawczych, takich jak uwaga, uczenie się i pamięć (Fields, 2008).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu**

W badaniach z wykorzystaniem pośmiertnie pobranych fragmentów tkanki z kory przedczołowej pacjentów ze

schizofrenią wykazana została zwiększona metylacja CGI na obszarze genu *SOX10*, co bezpośrednio korelowało nie tylko ze zmniejszoną ekspresją białka *SOX10*, ale też innych genów powiązanych z prawidłowym funkcjonowaniem oligodendrocytów, w tym m.in. *OLIG2*, *MAG* czy *PLP1* (Iwamoto *et al.*, 2005).

### **BDNF (brain-derived neurotrophic factor)**

#### **Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii**

BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) należy do czynników wzrostu nerwów i jest białkiem warunkującym funkcjonowanie i prawidłowe różnicowanie neuronów siatkówki, cholinergicznymi i dopaminergicznymi. Wykazuje wysokie stężenie w przodomózgowiu, podwzgórz, pniu mózgu, mózdzku i części podstawnej kresomózgowia.

Zaobserwowana w obszarach korowych mózgu zmniejszona ekspresja genu miała wpływ na zaburzenia wzrostu neuronów i gęstości synaptycznej, co związane jest z rozwojem schizofrenii (Causing *et al.*, 1997; Katoh-Semba *et al.*, 1997).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu**

W analizie epigenomicznej całego genomu tkanek mózgu pobranych pośmiertnie od pacjentów ze schizofrenią nie stwierdzono istotnej różnicy poziomu metylacji w genie *BDNF* w porównaniu z grupą kontrolną – wykazano jednak zależność między metylacją genu *BDNF* a równoczesnym występowaniem określonego genotypu powiązanego z psychozą (Mill *et al.*, 2008).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkankach obwodowych**

W badaniach materiału genetycznego uzyskanego z krwi pobranej od pacjentów ze schizofrenią oraz pacjentów z grupy kontrolnej wykazano zwiększoną metylację promotora *BDNF*. Należy jednak zaznaczyć, że we wszystkich zbadanych miejscach CpG wykazały stosunkowo niski poziom metylacji DNA; wartości średnie były mniejsze niż 5%, niezależnie od diagnozy (Ikegame *et al.*, 2013). Dodatkowo w tym samym badaniu badacze wskazali, że na wyniki wpływ mogły mieć m.in. wcześniejsza farmakoterapia, historia medyczna oraz brak standaryzacji pod kątem płci i subpopulacji leukocytów.

Warto wspomnieć, że w badaniach poświęconych zależności między doświadczeniem przemocy w dzieciństwie a metylacją genu *BDNF* u pacjentów ze schizofrenią bądź zaburzeniami schizoafektywnymi również wykazana została istotna statystycznie zależność między hipermetylacją – zarówno w obszarze promotora genu, jak i na jego dalszych obszarach – a traumą w dzieciństwie; zależność tę wykazano w DNA wyizolowanym z krwi

z grup badawczej i kontrolnej. Chociaż badacze wskazują na potrzebę zwiększenia grupy badawczej celem potwierdzenia wyników, otrzymane rezultaty wpisują się w teorię, wedle której czynniki środowiskowe i genetyczne łącznie wpływają na rozwój schizofrenii (Barker *et al.*, 2020).

### **EGR1 (early growth response protein 1)**

#### **Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii**

*EGR1* (białko odpowiedzi wczesnego wzrostu) – jest białkiem ważnym dla proliferacji komórek, odpowiedzi immunologicznej i procesów zapamiętywania (Amoli *et al.*, 2019). U pacjentów ze schizofrenią obserwowana była zmniejszona ekspresja genu *EGR1* w korze przedczołowej oraz krwi obwodowej (Ramaker *et al.*, 2017; Pérez-Santiago *et al.*, 2012), co ze względu na funkcję pełnioną przez *EGR1* w procesach regulujących pamięć, zdolność nauki i plastyczność mózgu łączone jest przez badaczy z występowaniem schizofrenii.

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu**

U pacjentów ze schizofrenią zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genu *EGR1* w korze przedczołowej (Ramaker *et al.*, 2017; Pérez-Santiago *et al.*, 2012). Brakuje jednak badań poświęconych modyfikacjom epigenetycznym genu *EGR1*, które byłyby przeprowadzane na materiale genetycznym uzyskanym z tkanek mózgow pacjentów ze schizofrenią.

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkankach obwodowych**

W badaniach z wykorzystaniem DNA pozyskanego z krwi obwodowej pobranej od pacjentów i zdrowej grupy kontrolnej nie została wykazana istotna statystycznie różnica w metylacji promotora genu *EGR1*. Co ciekawe jednak, wyraźna, chociaż nieistotna statystycznie, różnica zaobserwowana została przy porównywaniu poziomów metylacji promotora *EGR1* w populacji mężczyzn ze schizofrenią w porównaniu z pozostałymi grupami, co wpisuje się w dotychczasowe badania poświęcone różnicom między płciami w zakresie rozwoju mózgu, ekspresji genów i profilu epigenomicznego schizofrenii (Hu *et al.*, 2019).

### **5HT<sub>1A</sub> (5-hydroxytryptamine receptor 1A), HTR<sub>2A</sub> (5-hydroxytryptamine receptor 2A), 5-HTT (5-hydroxytryptamine)**

#### **Funkcja genu i znaczenie w etiopatologii**

Hipermetylacja genów regulujących ekspresję odpowiednio receptora serotoninowego 1A, receptora serotoninowego 2A oraz transportera serotonininy powiązana została z obecnością schizofrenii (Abdolmaleky *et al.*, 2014; Carrard *et al.*, 2011). Dodatkowo obecność zarówno

pozytywnych, jak i negatywnych objawów może łączyć się ze zwiększoną gęstością receptorów 5-HT1A i zmniejszoną gęstością receptorów HTR2A w korze przedczołowej (Ngan *et al.*, 2000).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkance mózgu**

W badaniach przeprowadzonych na DNA uzyskanym post mortem z płatów czołowych pacjentów ze schizofrenią potwierdzono hipermetylację promotora HTR2A przy jednoczesnej hipometylacji jednego z dalszych obszarów genu w porównaniu z grupą kontrolną. W następstwie stwierdzona została mniejsza ekspresja genu, co badacze powiązali z wcześniejszym wystąpieniem choroby (Abdolmaleky *et al.*, 2011).

W innym badaniu, również z wykorzystaniem DNA uzyskanego z próbek pobranych post mortem z płata czołowego pacjentów ze schizofrenią, Abdolmaleky wraz ze współpracownikami wykazał hipermetylację promotora genu 5-HTT, szczególnie widoczną u pacjentów wcześniej nieleczonych (Abdolmaleky *et al.*, 2014).

#### **Obserwowane modyfikacje wzorca metylacji w tkankach obwodowych**

W DNA pozyskanym z leukocytów pacjentów ze schizofrenią potwierdzona została hipermetylacja promotora genu 5HTT1A w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Uzyskane wyniki były niezależne od wieku czy płci badanych (Carrard *et al.*, 2011).

### **Wnioski**

Niewątpliwym wyzwaniem w analizowaniu roli metylacji genów w patogenezie schizofrenii jest wielość zmiennych, które dodatkowo wpływają na wzór metylacji genomu człowieka. Zaliczają się do nich między innymi płeć, wiek, stosowanie leków przeciwpsychotycznych, czas trwania choroby, niktynizm, masa ciała czy wiek w chwili początku choroby. Kluczowym wydaje się stworzenie systemu pozwalającego na rozróżnienie pierwotnych zmian w metylacji genomu pacjenta od swoistych artefaktów, zarówno tych modyfikowalnych (np. związanych z farmakoterapią), jak i niezmiennych (jak np. pochodzenie).

Metaanalizy poświęcone badaniom modyfikacji epigenetycznych w schizofrenii wskazują także na mnogość rodzajów wykorzystywanych w analizach tkanek oraz technik, co dodatkowo utrudnia odtworzenie badań i powtórzną weryfikację ich wyników (Smigielski *et al.*, 2020). Większość badań przeprowadzana jest przy użyciu pośmiertnych próbek mózgu bądź krwi obwodowej – ze względu na łatwość pobrania próbek. Istnieją rozważania dotyczące stabilności i biologicznych implikacji pomiarów epigenetycznych w tkankach pośmiertnych

(Sjöholm *et al.*, 2018) – należy bowiem pamiętać, że na wyniki analiz tkanek pobranych pośmiertnie wpływa wiele dodatkowych czynników, jak choćby czas, który minął od pobrania próbki, czy związane ze śmiercią procesy metaboliczne (Tomita *et al.*, 2004).

Dodatkowo wykazane zostało, że różne typy komórek mają różne wzorce epigenetyczne – a co za tym idzie, stosowanie próbek mieszanych tkanek i komórek może ograniczać identyfikację zmian epigenetycznych w schizofrenii, ponieważ zmiany te mogą być maskowane przez epigenetyczne modyfikacje charakterystyczne dla danej tkanki. Rozwiązaniem może być ostateczna walidacja krwi i śliny jako tkanek zastępczych; model lustrzanego odbicia – według którego czynniki wpływające na procesy mózgowe pozostawiają sygnatury biomarkerów we krwi i stan metylacji wielu miejsc we krwi odzwierciedla stan w mózgu – znalazł potwierdzenie w badaniach (Aberg *et al.*, 2013).

Badacze wskazują także na potrzebę poszerzenia wykorzystywanej metody badawczej – podejścia ukierunkowane na określony gen są z definicji ograniczone, ale nawet analizy GWAS wykorzystują określone sondy do wykrywania metylacji, co skutkuje pewną subiektywnością uzyskanych wyników. Obiektywny obraz metylacji DNA u pacjentów ze schizofrenią możliwy będzie do uzyskania jedynie po przeprowadzeniu badań z wykorzystaniem technik uwzględniających inne miejsca przyłączania grup metylowych, co pozwoli na stworzenie pełnej analizy genomu pacjenta (Mendizabal *et al.*, 2019).

Jednym z głównych celów badań epigenetycznych modyfikacji genomu u pacjentów ze schizofrenią jest odkrycie swoistych biomarkerów, które pozwoliłyby na wcześniejsze diagnozowanie schizofrenii i rozpoczęcie personalizowanego procesu terapeutycznego. Wydaje się, że prowadzenie całościowych badań genomu o jasno zdefiniowanym protokole, daje szansę na określenie specyficznych wzorców metylacji DNA będących wczesnymi biomarkerami choroby oraz na stworzenie standardów leczenia dopasowanych do obecności alleli i modyfikacji u danego pacjenta (Hu *et al.*, 2019). Dotychczas udało się wykazać, że niektóre z leków antypsychotycznych wpływają na status metylacji wybranych genów (Guidotti i Grayson, 2014; Tang *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2016) – można zatem podejrzewać, że znajomość profilu genomowego pacjenta mogłaby pozwolić na wprowadzenie celowanej terapii antypsychotycznej, a w szerszej perspektywie, na wprowadzenie nowych metod terapeutycznych.

Należy także pamiętać, że metylacja jest jednym z wielu mechanizmów epigenetycznych – i nie jest możliwe stworzenie pełnej listy potencjalnych biomarkerów schizofrenii bez uwzględnienia roli odgrywanej przez modyfikacje histonów czy przez niekodujące RNA. Dopiero zbiorcza analiza wszystkich tych czynników pozwoli na dalsze poznawanie mechanizmów powstawania schizofrenii. ■

Authors declare no conflict of interest and financial support. / Autorzy deklarują brak konfliktu interesów oraz dofinansowania.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

OP – writing the first version of the article, literature search, making critical corrections, acceptance of the final article version / napisanie pierwszej wersji artykułu, zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy; AS – writing the first version of the article, literature search, making critical corrections, acceptance of the final article version / napisanie pierwszej wersji artykułu, zebranie piśmiennictwa, wniesienie krytycznych poprawek, akceptacja ostatecznej wersji pracy

## References / Piśmiennictwo

- Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F *et al.* Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2006; 15(21): 3132–3145; doi: 10.1093/hmg/ddl253.
- Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M *et al.* Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 134B(1): 60–66; doi: 10.1002/ajmg.b.30140. PMID: 15717292.
- Abdolmaleky HM, Yaqubi S, Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Sivaraman V, Thiagalingam S. Epigenetic dysregulation of HTR2A in the brain of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 2011; 129(2–3): 183–90; doi: 10.1016/j.schres.2011.04.007.
- Abdolmaleky HM, Nohesara S, Ghadirivasfi M, Lambert AW, Ahmadkhanhi H, Ozturk S *et al.* DNA hypermethylation of serotonin transporter gene promoter in drug naïve patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2014; 152(2–3): 373–380; doi: 10.1016/j.schres.2013.12.007.
- Aberg KA, Xie LY, McClay JL, Nerella S, Vunck S, Snider S *et al.* Testing two models describing how methylome-wide studies in blood are informative for psychiatric conditions. *Epigenomics* 2013; 5(4): 367–377; doi: 10.2217/epi.13.36.
- Amoli MM, Khatami F, Arzaghi SM, Enayati S, Nejatisafa AA. Over-expression of TGF- $\beta$ 1 gene in medication free Schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 2019; 99: 265–270; doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.009.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N *et al.* Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12): 6496–6499; doi:10.1073/pnas.94.12.6496.
- Barker V, Walker RM, Evans KL, Lawrie SM. Methylation of glucocorticoid receptor (NR3C1), BDNF and oxytocin receptor genes in association with childhood maltreatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Schizophr Res* 2020; 216: 529–531; doi: 10.1016/j.schres.2019.11.050.
- Bestor TH, Edwards JR, Boulard M. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; Jun 2; 112(22): 6796–9; doi: 10.1073/pnas.1415301111.
- Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(7): 1499–1504; doi: 10.1093/nar/8.7.1499.
- Bönsch D, Wunschel M, Lenz B, Janssen G, Weisbrod M, Sauer H. Methylation matters? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins. *Psychiatry Res* 2012; 198(3): 533–7; doi: 10.1016/j.psychres.2011.09.004.
- Carrard A, Salzmann A, Malafosse A, Karege F. Increased DNA methylation status of the serotonin receptor 5HT1A gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. *J Affect Disord* 2011; 132(3): 450–3; doi: 10.1016/j.jad.2011.03.018.
- Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J *et al.* Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron* 1997; 18(2): 257–67; doi: 10.1016/S0896-6273(00)80266-4.
- Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* 2019; 571, 489–499; doi: 10.1038/s41586-019-1411-0.
- Dempster EL, Mill J, Craig IW, Collier DA. The quantification of COMT mRNA in post mortem cerebellum tissue: diagnosis, genotype, methylation and expression. *BMC Med Genet* 2006; 7: 10; doi: 10.1186/1471-2350-7-10.
- Dmitrzak-Węglarz M, Hauser J. Epigenetic mechanisms in psychiatric disorders and cognitive functions. *Psychiatria* 2009; 6: 51–60.
- Dong E, Tueting P, Matrisciano F, Grayson DR, Guidotti A. Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Transl Psychiatry* 2016; 6(1): e711; doi: 10.1038/tp.2015.191.
- Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* 2018; Sep 1; 392(10149): 777–786; doi: 10.1016/S0140-6736(18)31268-6.
- Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. *Schizophr Res.* 2005 Jan 1; 72(2–3): 109–22; doi: 10.1016/j.schres.2004.02.017. Erratum in: *Schizophr Res.* 2005 May 1; 74(2–3): 287. Hossein Fatemi, S [corrected to Fatemi, S Hossein].
- Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 2008; 31(7): 361–370; doi:10.1016/j.tins.2008.04.001.
- Gałecki P, Szulc A. Psychiatria. In: Lis-Olszewska D, Szulc A. ed. *Schizofrenia, zaburzenia typu schizofrenii i urojeniowe (F20-F29)*. Edra Urban & Partner, Wrocław 2018: 160.
- Gejman PV, Sanders AR, Kendler KS. Genetics of schizophrenia: new findings and challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011; 12: 121–44; doi: 10.1146/annurev-genom-082410-101459.
- Gothelf D, Feinstein C, Thompson T, Gu E, Penniman L, Van Stone E *et al.* Risk factors for the emergence of psychotic disorders in adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 2007 Apr; 164(4): 663–9; doi: 10.1176/ajp.2007.164.4.663.
- Goud Alladi C, Etain B, Bellivier F, Marie-Claire C. DNA Methylation as a Biomarker of Treatment Response Variability in Serious Mental Illnesses: A Systematic Review Focused on Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Major Depressive Disorder. *Int J Mol Sci* 2018; Oct 4; 19(10): 3026; doi: 10.3390/ijms19103026.



25. Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma RP, Mitchell CP, Guidotti A *et al.* Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(26): 9341–9346; doi:10.1073/pnas.0503736102.
26. Green T, Gothelf D, Glaser B, Debbane M, Frisch A, Kotler M *et al.* Psychiatric disorders and intellectual functioning throughout development in velocardiofacial (22q11.2 deletion) syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2009; 48(11): 1060–1068; doi: 10.1097/CHI.0b013e3181b76683.
27. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR *et al.* Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(11): 1061–9; doi: 10.1001/archpsyc.57.11.1061. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59(1): 12. DiGiorgi Gerevini V [corrected to Di-Giorgi-Gerevini V].
28. Guidotti A, Grayson DR, Caruncho HJ. Epigenetic RELN Dysfunction in Schizophrenia and Related Neuropsychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 89; doi:10.3389/fncel.2016.00089.
29. Guidotti A, Grayson DR. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin Neurosci* 2014; 16(3): 419–429; doi:10.31887/DCNS.2014.16.3/aguidotti.
30. Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR, Veldic M, Pinna G, Davis JM, Costa E. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA overexpression in psychosis. *Neuroreport* 2007; 18(1): 57–60; doi: 10.1097/WNR.0b013e32800fedf7.
31. Haraldsson HM, Ettinger U, Sigurdsson E. Developments in schizophrenia genetics: from linkage to microchips, deletions and duplications. *Nord J Psychiatry* 2011 Apr; 65(2): 82–8; doi: 10.3109/08039488.2011.552734.
32. Hauser J, Dmitrzak-Węglarz M. Review article In search of schizophrenia genes. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia/ Neuropsychiatry and Neuropsychology* 2009; 4(1): 1–9.
33. Henriksen MG, Nordgaard J, Jansson LB. Genetics of Schizophrenia: Overview of Methods, Findings and Limitations. *Front. Hum. Neurosci* 2017; 11: 322; doi: 10.3389/fnhum.2017.00322.
34. Hilker R, Helenius D, Fagerlund B, Skyttøe A, Christensen K, Werge TM, Nordentoft M, Glenthøj B. Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol Psychiatry* 2018; Mar 15; 83(6): 492–498; doi: 10.1016/j.biopsych.2017.08.017.
35. Hu TM, Chen SJ, Hsu SH, Cheng MC. Functional analyses and effect of DNA methylation on the EGR1 gene in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2019 May; 275: 276–282; doi: 10.1016/j.psychres.2019.03.044.
36. Huang HS, Akbarian S. GAD1 mRNA expression and DNA methylation in prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *PLoS One* 2007; 2(8): e809; doi:10.1371/journal.pone.0000809.
37. Ikegame T, Bundo M, Sunaga F, Asai T, Nishimura F, Yoshikawa A *et al.* DNA methylation analysis of BDNF gene promoters in peripheral blood cells of schizophrenia patients. *Neurosci Res* 2013; 77(4): 208–14; doi: 10.1016/j.neures.2013.08.004.
38. Iwamoto K, Bundo M, Yamada K, Takao H, Iwayama-Shigeno Y, Yoshikawa T, Kato T. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *J Neurosci* 2005; 25(22): 5376–5381; doi: 10.1523/JNEUROSCI.0766–05.2005.
39. Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nature reviews. Neuroscience* 2010; 11(6): 402–16; doi: 10.1038/nrn2841.
40. Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology* 2014 May; 80: 133–9; doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.019.
41. Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* 1997; 69(1): 34–42; doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69010034.x.
42. Khavari B, Cairns MJ. Epigenomic Dysregulation in Schizophrenia: In Search of Disease Etiology and Biomarkers. *Cells* 2020; 9(8): 1837; doi:10.3390/cells9081837.
43. Kuehner JN, Bruggeman EC, Wen Z, Yao B. Epigenetic Regulations in Neuropsychiatric Disorders 2019; *Front. Genet.* 10:268; doi: 10.3389/fgene.2019.00268.
44. Kundakovic M, Lim S, Gudsnuk K, Champagne FA. Sex-specific and strain-dependent effects of early life adversity on behavioral and epigenetic outcomes. *Front Psychiatry* 2013; Aug 1;4:78; doi: 10.3389/fpsy.2013.00078.
45. Labouesse MA, Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Meyer U. Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics* 2015; 10(12): 1143–1155; doi:10.1080/15592294.2015.1114202.
46. Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences* 2012; 35(1), 57–67; doi: 10.1016/j.tins.2011.10.004.
47. Li W, Guo X, Xiao S. Evaluating the relationship between reelin gene variants (rs7341475 and rs262355) and schizophrenia: A meta-analysis. *Neurosci Lett* 2015; 609: 42–7; doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.014.
48. Lichtermann D, Karbe E, Maier W. The genetic epidemiology of schizophrenia and of schizophrenia spectrum disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000; 250(6): 304–10; doi: 10.1007/s004060070005.
49. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 2008; 30: 67–76; doi: 10.1093/epirev/mxn001.
50. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:1161–92; doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1161.
51. Mendizabal I, Berto S, Usui N *et al.* Cell type-specific epigenetic links to schizophrenia risk in the brain. *Genome Biol* 2019; 20(1): 135; doi: 10.1186/s13059-019-1747-7.
52. Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L *et al.* Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet* 2008; 82(3): 696–711; doi:10.1016/j.ajhg.2008.01.008.
53. Murphy BC, O'Reilly RL, Singh SM. Site-specific cytosine methylation in S-COMT promoter in 31 brain regions with implications for studies involving schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 133B(1): 37–42; doi: 10.1002/ajmg.b.30134.
54. Ngan ET, Yatham LN, Ruth TJ, Liddle PF. Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia: A PET study using [(18F)setoperone. *Am J Psychiatry* 2000; 157(6): 1016–8; doi: 10.1176/appi.ajp.157.6.1016.
55. Nishioka M, Bundo M, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome Med* 2012; 4(12): 96; doi:10.1186/gm397.

56. Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G. Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway. *Neuron* 2004; 41(1): 71–84; doi: 10.1016/s0896-6273(03)00819-5.
57. Niu S, Yabut O, D'Arcangelo G. The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2008; 28(41): 10339–10348; doi:10.1523/JNEUROSCI.1917-08.2008.
58. Nohesara S, Ghadirivasfi M, Mostafavi S, Eskandari MR, Ahmadkhaniha H, Thiagalingam S, Abdolmaleky HM. DNA hypomethylation of MB-COMT promoter in the DNA derived from saliva in schizophrenia and bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2011; 45(11): 1432–8; doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.06.013.
59. Osborne AJ, Pearson JF, Noble AJ, Gemmell NJ, Horwood LJ, Boden JM, Benton MC, Macartney-Coxson DP, Kennedy MA. Genome-wide DNA methylation analysis of heavy cannabis exposure in a New Zealand longitudinal cohort. *Transl Psychiatry* 2020; Apr 22; 10(1): 114; doi: 10.1038/s41398-020-0800-3.
60. Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2011 Mar; 198(3): 173–5; doi: 10.1192/bjp.bp.110.084384.
61. Parade SH, Huffhines L, Daniels TE, Stroud LR, Nugent NR, Tyrka AR. A systematic review of childhood maltreatment and DNA methylation: candidate gene and epigenome-wide approaches. *Transl Psychiatry* 2021 Feb 19; 11(1): 134; doi: 10.1038/s41398-021-01207-y.
62. Pérez-Santiago J, Diez-Alarcia R, Callado LF, Zhang JX, Chana G, White CH *et al.* A combined analysis of microarray gene expression studies of the human prefrontal cortex identifies genes implicated in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2012; 46(11): 1464–74; doi: 10.1016/j.jpsychires.2012.08.005.
63. Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee, Cichon S, Craddock N, Daly M, Faraone SV, Gejman PV, Kelsoe J, Lehner T, Levinson DF, Moran A, Sklar P, Sullivan PF. Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 2009 May; 166(5): 540–56; doi: 10.1176/appi.ajp.2008.08091354.
64. Ramaker RC, Bowling KM, Lasseigne BN, Hagenauer MH, Hardigan AA, Davis NS *et al.* Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Med* 2017; 9(1): 72; doi: 10.1186/s13073-017-0458-5.
65. Sahin S, Yüksel Ç, Güler J, Karadayi G, Akturan E, Göde E, Özhan AA, Üçok A. The history of childhood trauma among individuals with ultra high risk for psychosis is as common as among patients with first-episode schizophrenia. *Early Interv Psychiatry* 2013 Nov; 7(4): 414–20; doi: 10.1111/eip.12022.
66. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; Jan 31; 103(5): 1412–7; doi: 10.1073/pnas.0510310103.
67. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014; 511, 421–427; doi: 10.1038/nature13595.
68. Schneider M, Debbané M, Bassett AS, Chow EWC, Fung WLA, van den Bree M *et al.* Psychiatric disorders from childhood to adulthood in 22q11.2 deletion syndrome: results from the International Consortium on Brain and Behavior in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Am J Psychiatry* 2014; 171(6): 627–639; doi: 10.1176/appi.ajp.2013.13070864.
69. Sharaf A, Rahhal B, Spittau B, Roussa E. Localization of reelin signaling pathway components in murine midbrain and striatum. *Cell Tissue Res* 2015; 359, 393–407; doi: 10.1007/s00441-014-2022-6.
70. Sjöholm LK, Ransome Y, Ekström TJ, Karlsson O. Evaluation of Post-Mortem Effects on Global Brain DNA Methylation and Hydroxymethylation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; 122(2): 208–213; doi: 10.1111/bcpt.12875.
71. Smigielski L, Jagannath V, Rössler W, Walitzka S, Grünblatt E. Epigenetic mechanisms in schizophrenia and other psychotic disorders: a systematic review of empirical human findings. *Mol Psychiatry* 2020; 25(8): 1718–1748; doi: 10.1038/s41380-019-0601-3.
72. Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, Schachner M *et al.* Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 2002; 16(2): 165–170; doi: 10.1101/gad.215802.
73. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 2003; Dec; 60(12): 1187–92; doi: 10.1001/archpsyc.60.12.1187.
74. Tang H, Dalton CF, Srisawat U, Zhang ZJ, Reynolds GP. Methylation at a transcription factor-binding site on the 5-HT1A receptor gene correlates with negative symptom treatment response in first episode schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014 Apr; 17(4): 645–9; doi: 10.1017/S1461145713001442.
75. Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N, Kato T. Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 2008; 63(5): 530–3; doi: 10.1016/j.biopsych.2007.07.003.
76. Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, Evans SJ, Choudary PV, Li J *et al.* Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry* 2004; 55(4): 346–352; doi: 10.1016/j.biopsych.2003.10.013.
77. Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, Grayson DR, Davis JM, Pinna G *et al.* Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 500–509.
78. Tsujita T, Niikawa N, Yamashita H, Imamura A, Hamada A, Nakane Y, Okazaki Y. Genomic discordance between monozygotic twins discordant for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1998 Mar; 155(3): 422–4; doi: 10.1176/ajp.155.3.422. PMID: 9501757.
79. Tylec A, Stryjecka-Zimmer M, Kucharska-Pietura K. Polimorfizm genu COMT w zaburzeniach psychicznych / Genetic polymorphism of COMT in mental disorders. *Psychiatria Polska* 2007; tom XLI, 4: 473–483.
80. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS *et al.* Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers* 2021; 1, 59; doi: 10.1038/s43586-021-00056-9.
81. Veldic M, Guidotti A, Maloku E, Davis JM, Costa E. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(6): 2152–2157; doi: 10.1073/pnas.0409665102.
82. Wedenoja J, Tuulio-Henriksson A, Suvisaari J, Loukola A, Paunio T, Partonen T *et al.* Replication of association between working memory and Reelin, a potential modifier gene in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2010; 67(10): 983–991; doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.026.
83. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance

- hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39944–52; doi: 10.1074/jbc.M205147200.
84. Zhou J, Zhou D, Yan T, Chen W, Xie H, Xiong Y. Association between CpG island DNA methylation in the promoter region of *RELN* and positive and negative types of schizophrenia. *J Int Med Res* 2022; 50(5): 3000605221100345; doi: 10.1177/03000605221100345.
85. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 2008; Oct; 24(10): 481–4; doi: 10.1016/j.tig.2008.08.004.

