

Идентификация и установление функциональной значимости однонуклеотидных миссенс-вариантов в генах морфогенеза головного мозга в контексте развития психических и когнитивных расстройств

Карагяур М.Н.^{1*}, Примаков А.Л.¹, Бозов К.Д.¹, Усатова В.С.², Берестовой М.А.², Шелег Д.А.^{1,3}, Арбатский М.С.¹, Цыганков Б.Д.^{1,3}, Ткачук В.А.¹, Нейфельд Е.А.^{1,3}

¹ Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

* m.karagyaour@mail.ru

Ключевые слова: морфогенез головного мозга; параноидная шизофрения; эндогенная депрессия; миссенс-мутации; нейральные сфероиды; навигационные молекулы

Мотивация и цель: Нарушение функции и экспрессии генов, вовлеченных в процессы формирования и развития головного мозга, считается одной из возможных причин возникновения психических заболеваний [1–3]. Выявление таких генов и их патологических вариантов, а также установление их функциональной значимости в процессах развития ткани мозга является наиболее актуальной задачей молекулярной психиатрии, поскольку открывает перспективы к диагностике, профилактике, а, возможно, и лечению ряда психических расстройств. Целью данного исследования является идентификация в российской популяции геномных вариантов в генах морфогенеза головного мозга, потенциально ассоциированных с развитием параноидной шизофрении и эндогенной депрессии, с последующим установлением их функциональной значимости на *in vitro* моделях.

Методы и алгоритмы: Для поиска предположительно патологических геномных миссенс-вариантов в генах морфогенеза головного мозга в российской популяции было проведено полноэкзомное секвенирование образцов геномной ДНК пациентов, страдающих параноидной шизофренией (11 человек) и эндогенной депрессией (10 человек). Результаты секвенирования выравнивали на референсный геном человека GRCh37.p13/hg19. Особое внимание уделяли смысловым мутациям в экзонах генов навигационных молекул (ADIPOR1, CDH1-27, CDHR1-4, CD44, DCC, EPHA1-10, EPHB1-6, ERBB2-4, IL6R, IL6ST, ITGA3, ITGAV, ITGB1, NRP1-2, PLAUR, PLXNA1-4, PLXNB1-3 и др.), лигандов (ADIPOQ, CHRDL, EFNA1-5, EFNB1-3, IL6, NRG1-4, NTN1-4, PLAU, RELN, SHN, SEMA3A-G и др.), нейротрофических факторов (NGF, BDNF, NTF3, GDNF, VEGFA-D), их рецепторов (NTRK1-3, NGFR, GFRA1, GFRA3, RET), и ассоциированных молекул (PLAT, PLG) – всего 140 генов, которые по данным литературы вовлечены в процессы формирования мозговой ткани.

Распространенность ряда идентифицированных смысловых мутаций (BDNF (rs6265), CDH2 (rs17445840, rs1944294), CDH3 (rs12923655, rs3114409), CDH13 (rs4782724), CDH23 (rs10999947, rs1227051), CDH19/DCHS1 (rs4758443), CDH27/DCHS2 (rs1352714, rs12500437, rs11935573, rs28561984, rs72731014), PLA1 (rs2227564) и PLAUR (rs4760)) в популяции пациентов, страдающих шизофренией (102 человека), депрессией (79 человек), а также в популяции здоровых доноров (103 человека) была оценена с помощью модификации аллель-специфичного ПЦР (Amplification-refractory mutation system, ARMS).

Для подтверждения функциональной значимости некоторых из идентифицированных миссенс-мутаций (CDH13, DCHS2, EPHA1, NGF, PLA1 и PLXNA3), соответствующие миссенс-мутации будут внесены в индуцированные плюрипотентные клетки здорового донора с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 (редактор оснований). На основе полученных линий iPSC будут собраны нейроглиальные сфероиды.

Результаты: В результате полноэкзомного секвенирования у пациентов, страдающих когнитивными нарушениями, было обнаружено 226 миссенс-мутаций в 79 генах морфогенеза головного мозга (из 140 исследованных). Для ряда мутаций, проанализированных с помощью ARMS, удалось установить достоверно более высокую распространенность в группах пациентов с шизофренией и эндогенной депрессией, чем в группе здоровых доноров. В частности, была установлена ассоциация между частотой встречаемости геномных вариантов rs1944294-T и rs17445840-T (в гене CDH2), rs11935573-G и rs12500437-G/T (в гене DCHS2) и rs1227051-G/A (в гене CDH23), и вероятностью манифестации параноидной шизофрении и эндогенной депрессии [4].

В настоящий момент производится моделирование ряда идентифицированных миссенс-мутаций (CDH13, DCHS2, EPHA1, NGF, PLA1 и PLXNA3) в геном индуцированных плюрипотентных клетках здорового донора с помощью модификации технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 (редактор оснований). В нейральных сфероидах, сформированных на основе модифицированных клеточных линий, будут выявлены их морфологические, электрофизиологические и транскриптомные особенности.

Выводы: Был выявлен ряд вариантов генов морфогенеза головного мозга, значимо ассоциированных с предрасположенностью к параноидной шизофрении и эндогенной депрессии в российской популяции. Многие из выявленных генетических вариантов в контексте психических расстройств показаны впервые. Функциональная значимость идентифицированных геномных вариантов нуждается в верификации с помощью *in vitro* и *in vivo* моделей. Полученные результаты помогут лучше понять механизмы развития психических нарушений, а в перспективе разработать методы объективной диагностики, профилактики и, возможно, лечения ряда психических заболеваний.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00125, <https://rscf.ru/project/22-15-00125/>.

Identification and establishment of functional significance of single nucleotide missense variants in brain morphogenic genes in the context of psychiatric and cognitive disorders

Karagyaur M.N.^{1*}, Primak A.L.¹, Bozov K.D.¹, Usatova V.S.², Berestovoy M.A.², Sheleg D.A.^{1,3}, Arbatsky M.S.¹, Tsygankov B.D.^{1,3}, Tkachuk V.A.¹, Neyfeld E.A.^{1,3}

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education "A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

* m.karagyaur@mail.ru

Key words: brain morphogenesis; paranoid schizophrenia; major depressive disorder; missense mutations; neural spheroids; guidance molecules

Motivation and Aim: Aberration in the function and expression of genes involved in the processes of brain morphogenesis is considered to be one of the possible causes of psychiatric diseases [1–3]. The identification of such genes and their pathological variants, as well as the establishment of their functional significance in the processes of brain development, function and dysfunction is one the most urgent task for molecular psychiatry. This knowledge opens prospects for the diagnosis, prevention, and, possibly, treatment of a number of mental disorders. The aim of this study is to identify genomic variants in brain morphogenic genes that are potentially associated with the predisposition to paranoid schizophrenia and major depressive disorder in the Russian population, and establish their functional significance using *in vitro* models of brain tissue development.

Methods and Algorithms: To identify the missense genomic variants in brain morphogenic genes in the Russian population, we performed the whole-exome sequencing of genomic DNA samples of patients suffering from paranoid schizophrenia (11 human) and major depressive disorder (10 human). The sequencing results were aligned to the reference human genome GRCh37.p13/hg19. Special attention was paid to missense-mutations in exons of genes of guidance molecules receptors (ADIPOR1, CDH1-27, CDHR1-4, CD44, DCC, EPHA1-10, EPHB1-6, ERBB2-4, IL6R, IL6ST, ITGA3, ITGAV, ITGB1, NRP1-2, PLAUR, PLXNA1-4, PLXNB1-3, etc.), their ligands(ADIPOQ, CHRDL, EFNA1-5, EFNB1-3, IL6, NRG1-4, NTN1-4, PLAU, RELN, SHH, SEMA3A-G, etc.), neurotrophic factors (NGF, BDNF, NTF3, GDNF, VEGFA-D), their receptors (NTRK1-3, NGFR, GFRA1, GFRA3, RET), and associated molecules (PLAT, PLG). In total, 140 genes involved in brain morphogenesis were studied.

The prevalence of several identified missense-mutations (BDNF (rs6265), CDH2 (rs17445840, rs1944294), CDH3 (rs12923655, rs3114409), CDH13 (rs4782724), CDH23 (rs10999947, rs1227051), CDH19/DCHS1 (rs4758443), CDH27/DCHS2 (rs1352714, rs12500437, rs11935573, rs28561984, rs72731014), PLAU (rs2227564) and PLAUR (rs4760)) in the populations of psychiatric patients (schizophrenia – 102 patients, major depressive disorder – 79 patients) and healthy donors (103 human) was

evaluated using amplification-refractory mutation system (ARMS), a modification of allele-specific PCR.

To confirm the functional significance some of the identified missense-mutations (CDH13, DCHS2, EPHA1, NGF, PLAU and PLXNA3) are being modelled in the genome of induced pluripotent stem cells (iPSC) of a healthy donor using CRISPR/Cas9 base editors. The neural spheroids will be obtained from the iPSC lines.

Results: The whole-exome sequencing of DNA samples from the patients who suffered from cognitive disorders revealed 226 missense-mutations in 79 brain morphogenic genes out of 140 genes studied. For a number of mutations analysed using ARMS, we established a significantly higher prevalence in the groups of patients with schizophrenia and major depressive disorder compared to that in the group of healthy donors. In particular, we found that the occurrence of genomic variants rs1944294-T and rs17445840-T (in the CDH2 gene), rs11935573-G and rs12500437-G/T (in the DCHS2 gene) and rs1227051-G/A (in the CDH23 gene) is more frequent in schizophrenia and depression patients [4].

A number of identified missense-mutations (in CDH13, DCHS2, EPHA1, NGF, PLAU and PLXNA3 genes) are being modelled in the genome of iPSCs obtained from a healthy donor using a modification of the CRISPR/Cas9 genome editing system. The morphological and electrophysiological properties, as well as the transcriptome features of the obtained iPSC-derived spheroids will be studied.

Conclusion: We identified a number of brain morphogenic genes variants significantly associated with susceptibility to paranoid schizophrenia and major depressive disorder in the Russian population. Most of the genetic variants in the context of psychiatric disorders were identified for the first time. The functional significance of the detected genomic variants needs to be verified using in vitro and in vivo models. The results obtained will help to reveal the pathogenetic mechanisms of psychiatric disorders, and in the long term to develop methods of objective diagnosis, prevention and, possibly, treatment of a number of psychiatric diseases.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00125, <https://rscf.ru/project/22-15-00125/>.

Список литературы/References

1. Costa M.R. et al. The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2007;27(42):11376-11388. doi 10.1523/JNEUROSCI.2418-07.2007
2. Meyerink B.L. et al. Ariadne's Thread in the Developing Cerebral Cortex: Mechanisms Enabling the Guiding Role of the Radial Glia Basal Process during Neuron Migration. *Cells.* 2020;10(1):3. doi 10.3390/cells10010003
3. Primak A. et al. Morphogenetic theory of mental and cognitive disorders: the role of neurotrophic and guidance molecules. *Front Mol Neurosci.* 2024;17:1361764. doi 10.3389/fnmol.2024.1361764
4. Karagyaur M. et al. Novel missense variants in brain morphogenic genes associated with depression and schizophrenia. *Front Psychiatry.* 2024;15:1338168. doi 10.3389/fpsyt.2024.1338168