

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՎՈԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԱՃԵՄՅԱՆ ՍՈՖԻ ԱՐՄԱՆԻ

ՍԻՆԱՊՏԻԿ ՊԼԱՍՏԻԿՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉՆԵՐԻ ԳԵՆԵՐԻ  
ՊՈԼԻՄՈՐՖԻԶՄՆԵՐԸ ՇԻԶՈՖՐԵՆԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի  
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2019

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АДЖЕМЯН СОФИ АРМАНОВНА

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ РЕГУЛЯТОРОВ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ  
ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности  
03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2019

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության  
ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավարներ՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթ. անդամ, կենս. գիտ. դոկտոր,  
պրոֆ. Ա.Ս. Բոյաջյան

կենս. գիտ. թեկնածու Ռ.Վ. Զախարյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Լ.Ս. Եպիսկոպոսյան  
կենս. գիտ. դոկտոր Վ.Ա. Զավուշյան-Պապյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2019թ. դեկտեմբերի 26-ին,  
ժամը 14<sup>00</sup>-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042  
մասնագիտական խորհրդում (ՀՀ, 0014, ք. Երևան, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության  
ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2019թ. նոյեմբերի 15-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու

Գ.Ս. Մկրտչյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной  
биологии НАН РА.

Научные руководители:

член корр. НАН РА, доктор биол. наук,  
проф. Бояджян А.С.

канд. биол. наук Захарян Р.В.

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, проф. Епископосян Л.М.  
доктор биол. наук Чавушян-Папян В.А.

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 26 декабря 2019г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании  
специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА,  
0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии  
НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 15 ноября 2019 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,  
кандидат биол. наук

Մկրտչյան Գ.Ս.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время уже идентифицированы гены, сцепленные с большим количеством моногенных заболеваний, и следующим важнейшим этапом в развитии биомедицины становится решение проблем диагностики, прогностики и мониторинга комплексных многофакторных патологий. Механизмы наследования полигенных или мультифакториальных заболеваний намного сложнее, чем при моногенных патологических состояниях – по причине комбинированного эффекта и различной экспрессии вовлеченных в патогенез генов. Кроме того, изучение полигенных заболеваний не ограничивается исследованием отдельных генов и их полиморфизмов; необходим также анализ дополнительных факторов, вовлеченных в этиопатогенез болезни. Подробное описание такого рода патологических состояний проводится с обязательным привлечением методов геномики, протеомики, метабомики и биоинформатики. К заболеваниям полигенной и мультифакторной этиологии относится и шизофрения (ШФ) (код DSM-IV-TR: 295.30; ICD-10: F20.0). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [WHO, 2018], ШФ страдают более 21 миллиона людей в мире. Симптомы болезни проявляются в раннем зрелом возрасте, однако ее начало, при учете всех первичных факторов, можно распознать еще в юношестве, реже – в детстве [Rotshtein, 2014; Abidi, 2013]. При этом поздняя манифестация ШФ ассоциирована со сравнительно лучшим психо-социальным состоянием индивида и его более высокими способностями к обучению [Chen et al., 2018], а ранняя – с меньшей социальной активностью и частыми проявлениями негативных симптомов [Immonen et al., 2017]. Симптомы заболевания ярко проявляются уже к 30-ти годам, в большинстве случаев становясь причиной нетрудоспособности и социального отчуждения больного [Gardner et al., 2017].

Ввиду комплексной природы ШФ, в этиопатогенезе заболевания важную роль играют как наследственные факторы (в первую очередь, генетические варианты регуляторов нервной и иммунной систем), так и влияние окружающей среды. Еще в середине 1960-х гг. было выдвинуто предположение о том, что нарушения в «синаптической обрезке» в особо чувствительный для индивида подростковый период могут стать причиной развития вышеуказанных симптомов ШФ [Feinberg, 1982]. Позже исследования пациентов с ШФ, с одновременным анализом баланса между негативными и позитивными симптомами, привели к выводу, что почти все проявления заболевания имеют нейрохимическую основу. Была разработана отдельная нейрональная теория ШФ [Murray et al., 1987], согласно которой болезнь представляет собой результат нарушения процессов развития и созревания мозга [Dean et al., 2003]. При этом не исключается роль генетических факторов: сбои в развитии мозга могут являться результатом генетической предрасположенности организма к заболеванию. Развитию ШФ могут способствовать и такие факторы окружающей среды, как внутриутробные инфекции [Brown et al., 2010], психологические травмы (особенно в период становления организма) [Rajkumar, 2014], воспаление [Khandaker et al., 2015] и т.д. Совокупность всех этих факторов, в конечном итоге, может послужить толчком для развития тяжелых симптомов ШФ – галлюцинаций, иллюзий, двигательной и мыслительной заторможенности и др. [Oroka et al., 2017].

Статистические данные свидетельствуют, что около 94% больных ШФ, наряду с основными симптомами, страдают также когнитивными расстройствами [Waldo et al., 1991], проявляющимися уже на ранних стадиях заболевания [Cannon et al., 2000] и сохраняющимися в период ремиссии [Софронов, 2011], в отличие от галлюцинаций и апатии, которые регистрируются или в позитивном, или в негативном периодах [Ellason et al., 1995]. Таким образом, можно предположить, что когнитивные нарушения служат своего рода сигналом для ранней диагностики заболевания. Именно эти отклонения ведут к нарушениям исполнительных функций, устойчивости и избирательности внимания, рабочей памяти, восприятия информации, ее обработки и умственной работоспособности у больных ШФ [Huemer et al., 2014; Harvey et al., 2014]. Все антипсихотические лекарственные препараты, применяемые для лечения ШФ, в основном, направлены на подавление психопатологических симптомов (галлюцинации, иллюзии, двигательная и мыслительная заторможенность) и не корректируют такие серьезные нарушения, как, например, когнитивная дисфункция [Gardner et al., 2017].

Одной из причин когнитивной дисфункции является нарушение синаптической пластичности [Harvey et al., 2014], которая подразумевает регуляцию интенсивности передачи информации между пресинаптическими и постсинаптическими окончаниями нейронов. Патологические изменения в синаптической пластичности меняют интенсивность передачи импульсов, полностью нарушая естественный процесс обработки информации и запуска соответствующего этому импульсу адаптивного поведения [Gregg et al., 2014]. Ранее сотрудниками нашей лаборатории было установлено, что гены, кодирующие нейромедиаторы (белки-регуляторы синапсов), нейротрофический фактор мозга (BDNF), нетрин G1 (NTNG1) [Boyajyan et al., 2014] и фактор роста нейронов с его рецептором (NGF, NGFR) [Zakharyan et al., 2014], вовлечены в патогенез ШФ. Однако в процесс синаптической пластичности вовлечены и другие гены, связь которых с ШФ не изучена. К ним относятся комплексин-2 (*CPLX2*), комплексин-3 (*CPLX3*), комплексин-4 (*CPLX4*), альфа-1-химерин (*CHN1*), медиатор ответа на коллапсин-4 (*CRMP4/ DPYSL3*) и медиатор ответа на коллапсин-5 (*CRMP5/ DPYSL4*), кодирующие напрямую связанные с когнитивной функцией белки комплексины (синафины) -2, -3, -4, альфа-1-химерин и медиаторы ответа на коллапсин -4, -5, соответственно. Комплексины регулируют комплекс SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor), контролируя скорость и чувствительность захвата ионов кальция Ca(2+) [Brose, 2008]. Белок  $\alpha$ 1-химерин является некиназным рецептором, который присутствует в дендритах и дендритных шипиках нервной клетки и регулирует их развитие [van de Ven et al., 2005]. Белки-медиаторы ответа на коллапсин принадлежат к семейству цитозольных фосфопротеинов и являются частью сигнального пути семафорина, который играет важную роль в процессах роста аксонов в нейрональном развитии [Castellani et al., 2004; Turney et al., 2002; Deo et al., 2003].

Несмотря на интенсивное исследование молекулярных основ этиопатогенеза ШФ и активное пополнение баз данных новыми генами-кандидатами, до сих пор неясным остается количество маркеров, ассоциированных с этим тяжелым психическим расстройством. Ожидается, что исследование описанных выше процессов на молекулярно-генетическом уровне и с применением биоинформатических инструментов позволит идентифицировать новые кандидатные гены для ШФ. Кроме того, появится возможность

разработать и внедрить новые методы предсказания генетического риска развития ШФ, которые будут основаны на маркерах, специфичных для конкретной популяции. Подобные исследования в дальнейшем позволят подобрать для каждого пациента индивидуальный метод лечения на основе генетического профиля больного.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы заключалась в исследовании на выборке этнических армян ассоциации ШФ с полиморфизмами генов, регулирующих синаптическую пластичность, и в оценке функциональности связанных с заболеваемостью аллелей.

**Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:**

1. Выявление полиморфизмов генов *CPLX2*, *CPLX3*, *CPLX4*, *CHN1*, *CRMP4* и *CRMP5*, предположительно ассоциированных с развитием или предрасположенностью к ШФ;
2. Идентификация гаплотипов, связанных с заболеванием, на основе анализа частоты встречаемости определенных аллелей в исследуемых группах;
3. Установление этносpezifических особенностей распределения исследованных нами полиморфизмов в группах здоровых лиц в различных популяциях;
4. Выявление степени взаимосвязи рассматриваемых генетических маркеров с клиническими характеристиками больных ШФ;
5. Оценка функциональности ассоциированных с ШФ генотипов в выборке больных из доступных баз электронных данных по экспрессии генов.

**Научная новизна и научно-практическая значимость работы.** В настоящей работе впервые на выборке этнических армян была исследована ассоциация ШФ с полиморфизмами генов *CPLX2*, *CPLX3*, *CPLX4*, *CHN1*, *CRMP4* и *CRMP5*, кодирующих, соответственно, белки комплексин-2, комплексин-3, комплексин-4, альфа-1-химерин, медиатор ответа на коллапсин-4 и медиатор ответа на коллапсин-5.

Показано, что мутантный аллель полиморфизма rs1366116 гена *CPLX2* является фактором риска для развития ШФ, в то время как наследование мутантного аллеля полиморфизма rs3892909 гена *CPLX2* снижает риск проявления этого заболевания. Впервые показано, что полиморфизм rs1366116 гена *CPLX2* связан в возрасте первой манифестации ШФ. Нами также выявлена зависимость возраста первой манифестации ШФ от генотипов rs1366116, а именно, у гомозиготных по rs1366116\*Т аллелю индивидов заболевание регистрируется в более раннем возрасте, чем у носителей двух других генотипов. Также наследование мутантного аллеля rs1366116\*Т гена *CPLX2* связано с низким уровнем комплексина-2 в крови больных ШФ и пониженной экспрессией в мозге.

Впервые установлено, что наследование мутантных аллелей rs4940456\*Т гена *CPLX4* и rs1049171\*Т гена *CRMP4* снижает риск развития ШФ.

С использованием методов биоинформатического анализа выявлены различия в уровнях экспрессии ассоциированных с ШФ генов в разных участках мозга больных.

Теоретическая значимость результатов данной работы состоит в выявлении новых генов-кандидатов ШФ, а также в дополнении существующих представлений о молекулярных этиопатомеханизмах заболевания, связанных с нарушениями синаптической пластичности. Полученные данные свидетельствуют о том, что в отклонении нормального функционирования синапсов и нейронального развития мозга

при ШФ на уровне регуляторов синаптической пластичности задействована определенная генетическая компонента.

Практическая значимость работы связана с тем, что ее результаты могут быть использованы для разработки и последующего применения новых эффективных методов прогностики, диагностики и лечения ШФ.

**Апробация работы.** Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на III Международной конференции молодых ученых “Диалоги о науке” (2015, Армения), I Международной школе-конференции молодых ученых “Биомедицина, материалы и технологии 21-ого века” (2015, Россия), 29-м Международном конгрессе ECNP (2016, Австрия), Международной конференции “Новые тенденции в развитии науки о жизни” (2016, Армения), семинарах ECNP для молодых ученых в Европе (2017, Франция), 13-м Международном конгрессе по биологической психиатрии (2017, Дания), 31-м Международном конгрессе ECNP (2018, Испания), 32-м Международном конгрессе ECNP (2019, Дания), семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2013-2019).

**Публикации.** Результаты диссертации отражены в десяти научных работах, опубликованных в отечественных и международных изданиях, включая две статьи в отечественных, три – в зарубежных журналах и пять сообщений в материалах международных конференций.

**Объем и структура работы.** Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 13 таблиц и 37 рисунков, состоит из перечня использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. В литературном обзоре обобщены современные представления о факторах, влияющих на развитие ШФ. Экспериментальная часть включает описание субъектов, объектов и методов исследования, а также использованных приборов и реактивов. Глава «Результаты исследований и их обсуждение» состоит из пяти разделов. В «Заключении» коротко обобщены основные результаты исследования, которые обобщены в пяти выводах. Список цитируемой литературы содержит 236 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Работа выполнена в лаборатории геномики и иммуномики человека Института молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения (НАН РА).

Субъектами исследования являлись больные параноидной формой ШФ (код ICD-10: F20.0; код DSM-IV-TR: 295.30), проходившие лечение (n=250) и не принимавшие нейролептики (ШФ\*) (n=10), а также физически и психически здоровые лица (ЗЛ) (n=260) без наследственной предрасположенности к ШФ или каким-либо другим психическим расстройствам (контрольная группа). Все субъекты данного исследования являлись представителями армянской национальности, проживающими на территории Республики Армения. Больные ШФ находились на лечении в психиатрических клиниках «Норк» и Национального центра психического здоровья («Нубарашен» Психиатрического медицинского центра) Министерства здравоохранения Республики Армения (МЗ РА). Все больные принимали такие антипсихотические препараты, как галоперидол и феназепам.

Контрольную группу составили доноры медицинского центра «Эребуни» МЗ РА, а также сотрудники НАН РА и другие добровольцы. Все лица, вошедшие в контрольную группу, не имели истории воспалительных, нейродегенеративных и психиатрических заболеваний и были предупреждены об исследовании. Настоящее исследование было проведено по разрешению Комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IRB #00004079).

**Объектами исследования** являлись образцы плазмы крови и ДНК субъектов исследования.

**Генотипирование** полиморфизмов rs3892909, rs1366116 (*CPLX2*); rs3743487 (*CPLX3*); rs4940456, rs1980176, rs7243416 (*CPLX4*); rs2646153, rs14228 (*CHNI*); rs10515587, rs1049171 (*CRMP/ DPYSL3*); rs13017554 (*CRMP5/ DPYSL4*) проводили методом PCR-SSP. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для PCR-SSP осуществлялся при использовании базы данных Национального центра биотехнологической информации [National Center for Biotechnology Information, 2012].

**Оценка функциональной роли исследованных полиморфизмов** была проведена с помощью баз данных Невропатологического консорциума STANLEY (The Stanley Neuropathology Consortium Integrative Database), GEO (Gene Expression Omnibus), BrainSeq, LD (Linkage disequilibrium) анализа, STRING. Количественное содержание *CPLX2* в плазме крови определяли методом твердофазного «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа (ИФА) при использовании коммерческого набора реагентов «ELISA kit for comrexin-2, homo sapiens», E95332Hu (USCN Life Science Inc., США).

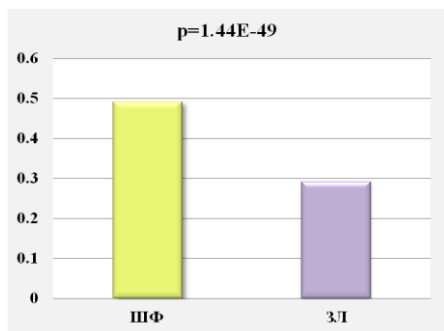
**Статистическую обработку полученных данных** проводили с использованием программных пакетов «Graphpad Prism-3,0» (GraphPad Software Inc., США), «SPSS-13,0» (SPSS Inc., США), а также «SNP-analyzer» (в режиме реального времени; Istech Inc., Южная Корея) [Yoo et al, 2005].

При обработке данных генотипирования распределение генотипов в исследуемых группах для каждого однонуклеотидного полиморфизма проверяли на соответствие закону Харди-Вайнберга (закон генетического равновесия), согласно которому в пределах генофонда популяции доля генотипов, содержащих разные аллели одного гена из поколения в поколение остается неизменной [Salanti et al., 2005]. Число и частота встречаемости генотипов, аллелей и носителей мутантных аллелей в исследуемых группах рассчитывали, основываясь на данных электрофореза (по числу и местоположению соответствующих полос в геле). Достоверность различий по отмеченным параметрам между больными ШФ и ЗЛ определяли по  $\chi^2$ -критерию Пирсона, рассчитывая отношение шансов (OR) и 95%-ый доверительный интервал (95%CI – диапазон колебаний истинных значений в популяции, в котором находится среднее значение с вероятностью 95%). При расчете значений  $p$  проводили многократный  $t$ -тест с  $\alpha$ -коррекцией Бонферрони и вносили поправку Бонферрони на многократные сравнения [Rice et al., 2008]. Значения  $p$  до внесения поправки обозначали как  $p_{\text{ном}}$ , после – как  $p_{\text{корр}}$ ;  $p_{\text{корр}} \leq 0,05$  принимали как статистически достоверные. Исследование связи возраста первой манифестации ШФ и генотипов проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса.

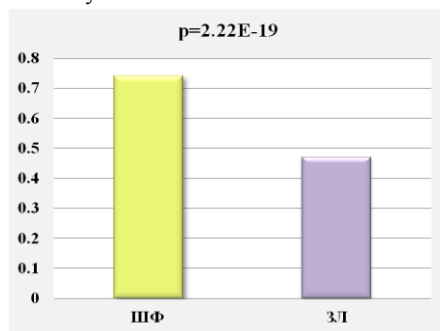
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмами гена *CPLX2*.** Частота встречаемости мутантного аллеля rs1366116\*Т гена *CPLX2* у больных ШФ была статистически значимо выше таковой у ЗЛ ( $p_{ном}=1.44E-49$ ). Число носителей отмеченного аллеля в случае больных ШФ также статистически значимо превышало аналогичный параметр у ЗЛ ( $p_{ном}=2.22E-19$ ). Частота встречаемости мутантного аллеля rs3892909\*Т у больных ШФ была статистически значимо ниже, чем у ЗЛ ( $p_{ном}=0.0008$ ). Соответственно, частота носительства мутантного аллеля rs3892909\*Т среди больных ШФ была меньше, чем среди ЗЛ ( $p_{ном}=0.01$ ). Результаты генотипирования для двух исследованных полиморфизмов приведены на рис. 1, 2, 3 и 4.

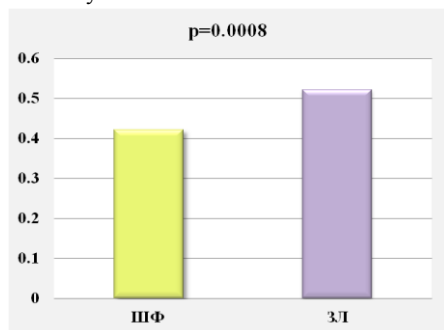
**Рис. 1.** Частота встречаемости мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs1366116 гена *CPLX2* у больных ШФ и ЗЛ.



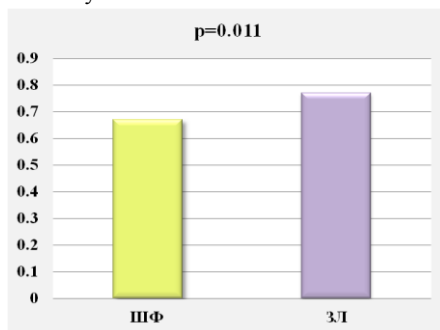
**Рис. 2.** Частота носительства мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs1366116 гена *CPLX2* у больных ШФ и ЗЛ.



**Рис. 3.** Частота встречаемости мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs3892909 гена *CPLX2* у больных ШФ и ЗЛ.



**Рис. 4.** Частота носительства мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs3892909 гена *CPLX2* у больных ШФ и ЗЛ.



Согласно полученным данным, полиморфизм rs1366116 гена *CPLX2* положительно ассоциирует с ШФ и его мутантный аллель rs1366116\*Т может служить фактором риска развития ШФ, тогда как полиморфизм rs3892909 гена *CPLX2* отрицательно ассоциирует с



ШФ и наследование его мутантного аллеля rs3892909\*Т может снизить риск развития этого заболевания.

Проведенный гаплотипный анализ позволил идентифицировать гаплотипы С-С, С-Т, Т-Т и С-С, Т-С, Т-Т в группах ЗЛ и больных ШФ. Сравнение гаплотипных частот среди больных ШФ и ЗЛ после введения поправки Бонферрони выявило статистически значимые различия в частоте встречаемости гаплотипов С-Т, Т-С и Т-Т. Показано, что частота встречаемости гаплотипов Т-Т и Т-С у больных ШФ статистически значимо выше, чем у ЗЛ (0.42 vs. 0.29,  $p_{\text{корр}}=2.75\text{E}-05$  и 0.07 vs. 0,  $p_{\text{корр}}=6.76\text{E}-10$ ), тогда как гаплотип С-Т чаще встречался среди ЗЛ, чем среди больных ШФ (0.28 vs. 0,  $p_{\text{корр}}=1.23\text{E}-37$ ). Следует отметить, что гаплотипы Т-Т и Т-С в первом положении содержат аллель rs1366116\*Т, который, согласно результатам генотипирования, среди больных ШФ встречается чаще, чем среди ЗЛ. Таким образом, результаты проведенного гаплотипного анализа хорошо согласуются с полученными нами данными о повышении риска заболеваемости ШФ в случае наследования мутантного аллеля rs1366116\*Т, или, иными словами, о защитной роли стандартного rs1366116С и мутантного rs3892909\*Т аллелей.

Далее с помощью критерия Краскела-Уоллиса нами была исследована связь между возрастом первой манифестации ШФ и генотипами полиморфизмов rs1366116 и rs3892909 гена *CPLX2*. Оказалось, что у индивидов, гомозиготных по rs1366116Т аллелю (ТТ), ШФ проявляется в более раннем возрасте, чем у носителей СТ генотипа. У последних, в свою очередь, возраст первой манифестации ШФ ниже, чем у носителей СС генотипа (генотип: средний возраст  $\pm \sigma$ , СС: 29.81  $\pm$  8.38 лет, СТ: 28.41  $\pm$  9.25 лет, ТТ: 24.84  $\pm$  8.94 лет,  $p=0.0004$ ).

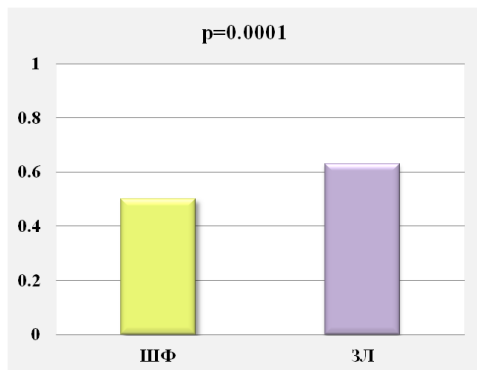
Итак, наследование мутантного аллеля rs1366116\*Т при других способствующих условиях (при наличии генетических факторов риска и факторов окружающей среды) может привести к проявлению болезни в более раннем возрасте, при этом у гомозиготных по данному аллелю лиц ШФ проявляется раньше, чем у гетерозиготных индивидов. Следует отметить, что данные относительно подобной взаимосвязи между полиморфизмом rs1366116 гена *CPLX2* и возрастом первой манифестации ШФ в других популяциях отсутствуют. Связи между другими клинико-демографическими характеристиками больных и генотипами исследованных полиморфизмов гена *CPLX2* мы не обнаружили.

**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмами гена *CPLX4*.** Согласно полученным данным, частота встречаемости мутантного аллеля rs4940456\*Т гена *CPLX4* у больных ШФ была значимо ниже, чем у ЗЛ ( $p_{\text{ном}}=0.0001$ , рис. 5). Число носителей мутантного аллеля у больных ШФ также значимо ниже ( $p_{\text{ном}}=3.2\text{E}-5$ , рис. 6).

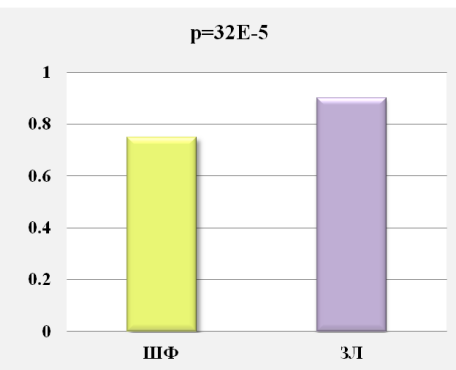
Частота встречаемости мутантных аллелей двух других изученных полиморфизмов rs1980176\*G ( $p_{\text{ном}}=0.29$ ) и rs7243416\*Т ( $p_{\text{ном}}=0.28$ ) гена *CPLX4* у больных ШФ и ЗЛ значимо не отличалась. Число носителей мутантных аллелей среди больных ШФ также значительно не отличалось от числа носителей среди ЗЛ: rs1980176\*G ( $p_{\text{ном}}=0.18$ ) и rs7243416\*Т ( $p_{\text{ном}}=0.132$ ). Полученные данные показывают, что полиморфизм rs4940456 гена *CPLX4* отрицательно ассоциирует с ШФ и наследование его мутантного аллеля rs4940456\*Т снижает риск развития этого заболевания. Два других полиморфизма не ассоциированы с ШФ.

На сегодняшний день в известных нам источниках отсутствует информация об ассоциации гена *CPLX4* с ШФ. Ранее была показана ассоциация полиморфизма rs4940456 с инфарктом миокарда [Schendre et al., 2017].

**Рис. 5.** Частота встречаемости мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs4940456 гена *CPLX4* у больных ШФ и ЗЛ.

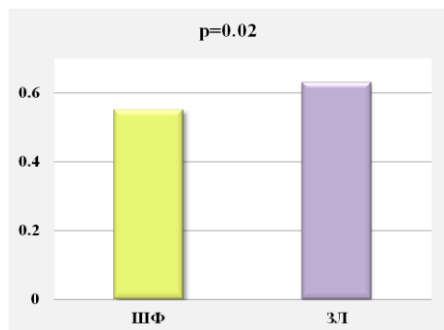


**Рис. 6.** Частота носительства мутантного (Т) аллеля полиморфизма rs4940456 гена *CPLX4* у больных ШФ и ЗЛ.

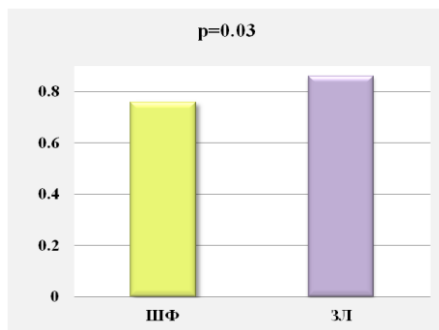


**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмами гена *CRMP4*.** Как показали полученные нами данные, частота встречаемости мутантного аллеля rs1049171\*G гена *CRMP4* у больных ШФ статистически значимо отличалась от таковой у ЗЛ ( $p_{ном}=0.02$ , рис. 7). Число носителей мутантного аллеля в случае больных ШФ также статистически отличалось от аналогичного параметра у ЗЛ ( $p_{ном}=0.03$ , рис. 8). Частота встречаемости мутантного аллеля rs10515587\*G гена *CRMP4* у больных ШФ и ЗЛ значимо не отличалась ( $p_{ном}=0.75$ ). Число носителей мутантного аллеля в случае больных ШФ также статистически не отличалось от аналогичного параметра у ЗЛ ( $p_{ном}=0.83$ ).

**Рис. 7.** Частота встречаемости мутантного (G) аллеля полиморфизма rs1049171 гена *CRMP4* у больных ШФ и ЗЛ.



**Рис. 8.** Частота носительства мутантного (G) аллеля полиморфизма rs1049171 гена *CRMP4* у больных ШФ и ЗЛ.



Таким образом, один из исследованных нами полиморфизмов rs1049171 ассоциирован, в то время как другой - rs10515587 не ассоциирован с ШФ. При этом наследование мутантного аллеля rs1049171\*G может понижать риск развития ШФ. Важно отметить, что полиморфизм rs1049171 гена *CRMP4* расположен в положении 147392415-147392415 хромосомы 5 и перекрывается с одноименным полиморфизмом гена *STK32A*, следовательно, результаты, полученные для гена *CRMP4*, можно также интерпретировать для гена *STK32A*. Ген *STK32A* кодирует белок семейства серин/треонин протеинкиназ, которые фосфорилируют остатки серина или треонина в консенсусных последовательностях Козак и участвуют в процессе инициации трансляции [Kozak, 1991].

Tsutiya и соавторы показали, что ген *CRMP4* экспрессируется в мозге мыши в раннем послеродовом периоде, а особенно активно - в обонятельной луковице (ОБ), гиппокампе и нескольких областях коры [Tsutiya & Ohtani-Kaneko, 2012]. Кроме того, у новорожденных мышей с отключенным геном *CRMP4* было выявлено нарушение обонятельной способности, аномальная активность нейронов и высокие уровни экспрессии глутаматных рецепторов -1 (*GluR1*) и -2 (*GluR2*) в ОБ [Tsutiya et al., 2015].

Известно, что нарушение обонятельной способности и повышенные уровни экспрессии глутаматных рецепторов наблюдаются при таких заболеваниях, как ШФ и расстройства аутистического спектра [Moberg et al., 2013; Zhang & Abdullah, 2013].

**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмом гена *CPLX3*.** Согласно результатам, не обнаружено значимых отличий в частоте встречаемости мутантного аллеля rs3743487\*Т гена *CPLX3* между больными ШФ и ЗЛ ( $p_{ном}=0.87$ ). Число носителей мутантного аллеля в случае больных ШФ также статистически не отличалось от аналогичного параметра у ЗЛ ( $p_{ном}=0.75$ ). Итак, можно заключить, что полиморфизм rs3743487 гена *CPLX3* не ассоциирует с ШФ и его мутантный аллель не играет роли в развитии ШФ, по крайней мере, в армянской популяции.

**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмами гена *CHN1*.** Частота встречаемости мутантного аллеля rs14228\*Т гена *CHN1* у больных ШФ и ЗЛ не отличалась ( $p_{ном}=0.52$ ). Соответственно, число носителей мутантного аллеля в случае больных ШФ также статистически не отличалось от аналогичного параметра у ЗЛ ( $p_{ном}=0.86$ ). Также не наблюдалось различий между частотой встречаемости ( $p_{ном}=0.59$ ) и носительства ( $p_{ном}=0.94$ ) мутантного аллеля rs2646153\*G гена *CHN1* среди больных ШФ и ЗЛ. Таким образом, ни один из исследованных полиморфизмов гена *CHN1* не ассоциирован с ШФ, по крайней мере, в армянской популяции.

Несмотря на важную роль альфа-1-химерина в нейрогенезе, имеются немногочисленные данные о вовлечении данного белка в патогенез тех или иных заболеваний. Была обнаружена пониженная экспрессия *CHN1* у японцев при болезни Альцгеймера. При этом исследование *CHN2* по тем же параметрам не выявило никаких различий между больными и ЗЛ [Kato et al., 2015]. В той же популяции Hashimoto и соавторами была выявлена ассоциация ШФ с миссенсным полиморфизмом H204R гена *CHN2* среди мужчин [Hashimoto et al., 2005].

В нашей лаборатории была обнаружена негативная ассоциация rs14228\*Т и позитивная ассоциация rs2646153\*G с ишемическим инсультом [Tadevosyan et al., 2015].

**Анализ ассоциации ШФ с полиморфизмом гена *CRMP5*.** Частота встречаемости мутантного аллеля rs13017554\*Т гена *CRMP5* у больных ШФ и ЗЛ значимо не отличалась ( $p_{ном}=0.42$ ). Соответственно, число носителей мутантного аллеля в случае больных ШФ также статистически не отличалось от аналогичного параметра у ЗЛ ( $p_{ном}=0.74$ ). Таким образом, не было выявлено ассоциации исследованного полиморфизма гена *CRMP5* с ШФ.

До сегодняшнего дня в литературе отсутствуют данные о вовлечении гена *CRMP5* в патогенез ШФ, однако существуют данные о том, что локус, на котором расположен ген *CRMP5*, ассоциирован сразу с тремя патологиями (ШФ, эпилепсия, нарушения слуха) в одной и той же пакистанской семье из Панджаба, где довольно часты кровные браки [Knight et al., 2008].

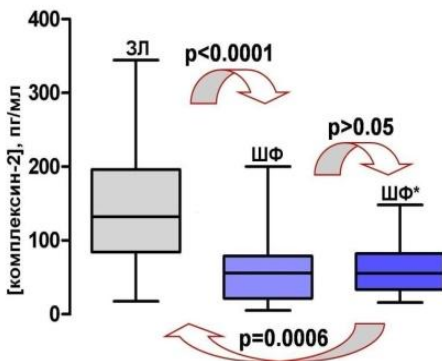
**Популяционные различия в распространенности исследованных полиморфизмов.** С целью выявления популяционных различий в частоте встречаемости изученных нами полиморфизмов, мы использовали базу данных 1000 геномов, которая находится в свободном доступе [1000 Genomes Project Consortium, 2015]. Было выявлено, что частота мутантных аллелей в выборке этнических армян существенно отличаются от данных, полученных для других популяций. При этом, если по полиморфизмам *CPLX2* армянская выборка в целом сходна с африканской, а по полиморфизмам *CRMP4* - с мексиканской, то по разнообразию маркеров *CPLX4* она отличается от всех сравниваемых популяций. Это еще раз свидетельствует о важности кросс-популяционных исследований для выявления этноспецифических генетических маркеров мультифакториальных заболеваний.

**Функциональная характеристика ассоциированных с ШФ полиморфизмов и соответствующих белков**

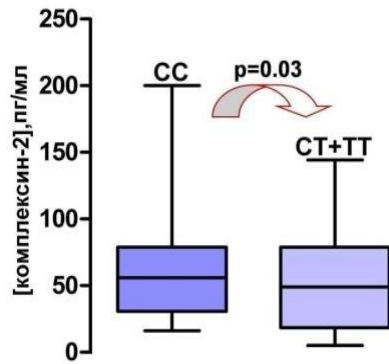
**Имуноферментный анализ комплексина-2** с целью выявления функциональной роли ассоциированных с ШФ полиморфизмов гена *CPLX2* в плазме крови больных ШФ и ЗЛ выявил, что средняя концентрация белка комплексина-2 ( $M \pm \sigma$ , пг/мл) у больных ШФ в 2.7 раза ниже, чем у ЗЛ ( $p < 0.0001$ ). Среднее значение концентрации комплексина-2 в случае ШФ\* также было в 2.4 раза статистически значимо ниже, чем у ЗЛ ( $p = 0.0006$ ). При этом между больными ШФ и ШФ\* не выявлено различия в средних значениях содержания белка в плазме крови ( $p = 0.51$ ) (рис. 9).

Зависимость концентрации комплексина-2 в плазме крови больных ШФ от генотипов rs1366116 в графическом виде приведена на рис. 10. Подобная зависимость наблюдалась и в группе ЗЛ. Выявлено, что средний уровень комплексина-2 ( $M \pm \sigma$ , пг/мл) в плазме больных ШФ, носителей мутантного аллеля rs1366116\*Т (СТ+ТТ) ниже, чем у гомозиготных по стандартному аллелю rs1366116С лиц ( $p = 0.03$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что наследование мутантного аллеля rs1366116\*Т обуславливает низкий уровень комплексина-2 в крови больных ШФ, следовательно, изменение уровня белка, наблюдаемое при ШФ, является генетически детерминированным.

**Рис. 9.** Уровни комплексина-2 в плазме больных ШФ, ШФ\* и ЗЛ.



**Рис. 10.** Зависимость концентрации (Ме [ИКР]) комплексина-2 от генотипов rs1366116 у больных ШФ и ЗЛ.



Данные представлены в виде диаграмм размаха «прямоугольники-отрезки» (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (ИКР: размах от 25-го до 75-го перцентиля), вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля. Медиана (Ме) отмечена горизонтальной линией.

Следует отметить, что уровень комплексина-2 в плазме крови носителей мутантного аллеля rs1366116\*Т в 1.6 раза ниже аналогичного параметра у гомозиготных носителей стандартного аллеля. Поскольку данный аллель встречался чаще среди больных ШФ, чем у ЗЛ, можно предположить, что низкие уровни комплексина-2 также могут выступать в роли фактора риска при ШФ или, возможно, могут быть связаны с нарушениями синаптической пластичности у отмеченных больных.

**Биоинформатический анализ** с целью оценки возможной функциональной роли вышеуказанных полиморфизмов был проведен с использованием целого ряда ресурсов и баз данных.

Анализ данных по экспрессии генов, доступных в базах данных STANLEY и GEO. В базе данных STANLEY нами был проведен поиск данных по экспрессии генов *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4* (*DPYSL3*) и *STK32A*. Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных ШФ понижена экспрессия *CPLX2* в зубчатой извилине (DG) и CA4 зоне гиппокампа. При этом, в поле Бродмана-24 передней поясной коры (BA24), в зоне CA1 и основании гиппокампа, а также в парагиппокампулярной извилине значимых изменений не обнаружено ( $p > 0.05$ ).

Поиск в GEO с помощью ключевых слов “Schizophrenia” и “Homo sapiens” позволил нам выбрать пять наборов данных (datasets: GSE62191, GSE53987, GSE35978, GSE21138, GSE12649). Результаты последующего анализа указали на существенные различия в уровнях экспрессии генов *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4* и *STK32A* в разных областях мозга

больных ШФ. Так, полученные результаты указывают на сниженную экспрессию *CPLX2* и *CPLX4* в мозжечке и теменной доле, и повышенную экспрессию *CRMP4* в фронтальной и префронтальной коре. В префронтальной коре, полосатом теле и гиппокампе наблюдается повышенная экспрессия *STK32A*.

*Анализ данных локусов количественных признаков (QTL).* Нами была проведена оценка связи носительства мутантных аллелей исследованных полиморфизмов генов *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4* и *STK32A* с уровнем экспрессии генов с использованием данных транскриптома дорсолатеральной-префронтальной области головного мозга, доступных в ресурсе BrainSeq [BrainSeq Consortium, <http://eqtl.brainseq.org/>].

Анализ показал, что полиморфизм rs3892909 гена *CPLX2* ассоциирован с изменением уровня экспрессии гена *CPLX2* ( $p=0.00002$ ). При этом носительство мутантного аллеля приводит к понижению уровня экспрессии, что еще раз подтверждает защитную роль мутантного аллеля rs3892909\*Т. Анализ сцепления (Linkage disequilibrium, LD) показал, что ассоциированные с ШФ полиморфизмы rs1366116 и rs3892909 гена *CPLX2* сцеплены с 15-ю другими ОНП, коррелирующими с уровнями экспрессии данного гена. Три из 15-ти ОНП, включая rs3892909, согласно предсказанию эффекта генетических вариантов с помощью биоинформатической программы Variant Effect Prediction [McLaren et al., 2016], являются регуляторными и находятся во фланкирующих регионах промотора гена *CPLX2*. Кроме того, LD анализ выявил сильную корреляцию аллеля rs1366116\*Т с аллелем rs3892909\*Т. Интересно отметить, что экспрессия *CPLX2* повышается с возрастом и достигает своего максимума в позднем периоде детства. Таким образом, функциональные ОНП, понижающие уровни экспрессии *CPLX2*, могут влиять на синаптические перестройки в мозге, особенно в периоды детства и юношества, что является одним из факторов риска развития ШФ [Jaaro-Peled et al., 2009]. Анализ данных локусов количественных признаков (QTL) показал, что полиморфизм rs4940456 не связан с изменениями уровня экспрессии *CPLX4*. С другой стороны, этот полиморфизм сцеплен с ОНП, ассоциированными с повышением экспрессии гена *LMAN1*, кодирующего лектин, связывающий маннозу. Последний является компонентом лектинового пути активации комплемента, который, согласно полученным ранее в нашей лаборатории данным, нарушен при ШФ [Mayilyan, 2006].

Анализ QTL для полиморфизма rs1049171 гена *CRMP4* не выявил достоверной ассоциации генотипов полиморфизма с уровнями экспрессии данного гена. В связи с этим был проведен поиск сцепленных вариантов, который выявил ОНП rs17106725, мутантный аллель которого (rs17106725\*Т) ассоциируется с повышенной экспрессией *CRMP4*. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что носительство rs17106725\*Т, равно как и сцепленного с ним аллеля rs1049171\*G, указывает на повышенную экспрессию *CRMP4* при ШФ. При нормальном развитии плода уровни экспрессии данного гена достигают своего максимума в раннем эмбриональном, и резко понижаются в постэмбриональном периоде.

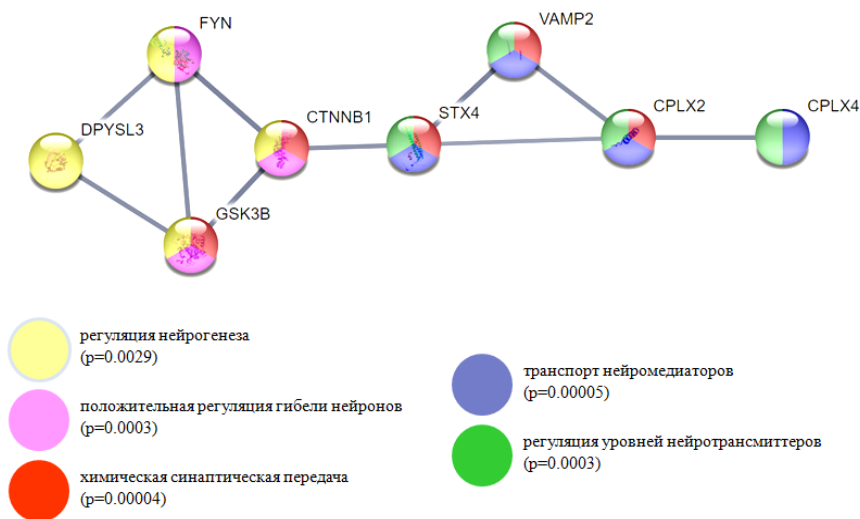
Согласно базе данных dbSNP, полиморфизм rs1049171 гена *CRMP4* также является downstream gene variant для гена *STK32A*. Экспрессия последнего также повышена при ШФ, но, в отличие от данных по *CRMP4*, анализ сцепления не выявил связанных с

rs1049171 функциональных ОНП в гене *STK32A*, что позволяет заключить, что носительство аллеля rs1049171\*G не влияет на уровни экспрессии *STK32A* при ШФ.

Таким образом, обобщив результаты биоинформатического анализа баз данных STANLEY, GEO, BrainSeq и LDlink, можно заключить, что исследованные нами ОНП rs1366116 и rs3892909 гена *CPLX2*, rs4940456 гена *CPLX4* и rs1049171 гена *CRMP4* могут являться непрямыми маркерами нарушения экспрессии этих генов.

**Анализ взаимосвязи между белками, кодируемыми генами *CPLX2*, *CPLX4* и *CRMP4*.** Результаты лабораторных исследований и биоинформатического анализа ассоциированных с ШФ генов *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4* (*DPYSL3*) были затем использованы для установления (с помощью базы данных STRING [Szkarczyk et al., 2019]) схемы взаимодействия кодируемых ими белков. Было выявлено, что белки *CPLX2* и *CPLX4* не взаимодействуют с *CRMP4* (*DPYSL3*) непосредственно, однако связь между ними осуществляется благодаря взаимодействию промежуточных белков, в той или иной степени имеющих вклад в развитие нервной системы, в частности, синаптической пластичности (рис. 11).

**Рис. 11.** Схема взаимодействия *CPLX2*, *CPLX4* и *CRMP4* (*DPYSL3*).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет оценить функциональный статус ряда регуляторов синаптической пластичности при ШФ и в значительной степени прояснить молекулярные патомеханизмы, лежащие в основе нарушений нейронального развития у больных.

Показано, что ШФ характеризуется нарушением функциональной активности таких ключевых компонентов синаптической пластичности, как белки комплексин-2, комплексин-4, медиатор ответа на коллапсин-4. Выявлены ассоциированные с ШФ функциональные полиморфизмы рассматриваемых генов и идентифицированы их мутантные аллели, наследование которых может модулировать риск развития ШФ на выборке этнических армян.

Определены гаплотипы исследованных полиморфизмов гена *CPLX2*, частота которых в группах больных ШФ и ЗЛ значительно различается и повышает риск развития заболевания, что еще раз подтверждает роль полиморфизма rs1366116\*Т гена *CPLX2* в этиопатогенезе ШФ. Проанализированные гаплотипы содержат распространенный среди больных ШФ мутантный аллель, который повышает риск развития заболевания.

При исследовании функциональных полиморфизмов генов *CHN1*, *CPLX3*, *CRMP5*, кодирующих регуляторы синаптической пластичности, не было выявлено ассоциации анализируемых аллелей с ШФ, несмотря на важную роль рассматриваемых генов в развитии нервной системы и высокую вероятность их вовлеченности в этиопатогенез заболевания.

Выявлены популяционные различия в частоте встречаемости исследованных полиморфизмов, что свидетельствует о необходимости изучения генетических особенностей в пределах отдельных этнических групп.

Показано, что у больных ШФ уровень белка комплексина-2 в плазме крови почти втрое ниже, чем у ЗЛ. Впервые выявлена взаимосвязь между генотипами функционального полиморфизма *CPLX2* и уровнями белка комплексина-2 в крови субъектов исследования. Анализ зависимости возраста первой манифестации ШФ от функциональных полиморфизмов *CPLX2* показал, что наследование мутантного аллеля rs1366116\*Т приводит к раннему проявлению ШФ.

Использование ряда биоинформатических ресурсов выявило функциональные характеристики тех полиморфизмов, которые в результате генетического анализа были ассоциированы с ШФ, а также установило статистическую взаимосвязь между наследованием данных вариантов и экспрессией соответствующих генов. Помимо ассоциации с экспрессией, были обнаружены полиморфизмы, сцепленные с исследованными в работе ОНП, а также была выявлена взаимосвязь между белками, которые кодируются генами *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4*.

Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что характерные для ШФ нарушения синаптической пластичности, вероятнее всего, находятся под определенным генетическим контролем посредством ряда медиаторов, среди которых находятся белки *CPLX2*, *CPLX4* и *CRMP4*.



## ВЫВОДЫ

В результате изучения возможной связи шизофрении с полиморфизмами генов, регулирующих синаптическую пластичность, выявлено:

1. Полиморфизмы rs1366116 и rs3892909, rs4940456, rs1049171 генов *CPLX2*, *CPLX4*, *CRMP4*, соответственно, ассоциированы с риском развития шизофрении в выборке этнических армян.
2. Наследование гаплотипов Т-Т и Т-С полиморфизмов rs1366116 и rs3892909 гена *CPLX2* повышает, а наличие гаплотипа С-Т снижает риск развития шизофрении.
3. Наследование аллеля rs1366116\*Т гена *CPLX2*, обуславливающего низкие уровни соответствующего белка в крови больных ШФ, ассоциировано с ранней манифестацией заболевания.
4. Распределение частот всех исследованных аллелей этнически обусловлено, что указывает на необходимость проведения кросс-популяционных исследований для разработки эффективных подходов к прогнозированию и диагностике шизофрении.
5. Полиморфизмы rs3892909 и rs17106725 генов *CPLX2* и *CRMP4*, соответственно, ассоциированы с изменениями в определенных участках мозга уровня их экспрессии, влияющими на синаптические перестройки, которые регистрируются при развитии шизофрении.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Atshemyan S., Zakharyan R., Arakelyan A. Evaluation of functional effect of polymorphisms associated with schizophrenia. // Proceedings of the YSU, Chemistry and Biology. 2019; 53(2):126-130.
2. Atshemyan S. Complexin-4 gene polymorphisms in schizophrenia. // Biolog. Journ. Armenia. 2016; 68:27-30.
3. Atshemyan S., Zakharyan R., Arakelyan A. No association of the complexin-3 gene polymorphism with schizophrenia. // Scientific J. Genetics Gen. Ther. 2015; 1(1):027-029.

4. Zakharyan R., Atshemyan S., Boyajyan A. Risk and protective effects of the complexin-2 gene and gene-environment interactions in schizophrenia. // *Recent Adv. DNA Gene Seq.* 2014; 8(1):30-34. doi:10.2174/1872215608666141001153202.
5. Boyajyan A., Stepanyan A., Avetyan D., Ghazaryan H., Atshemyan S., Zakharyan R., Pirumyan K., Tsakanova G. Genetic variations associated with brain disorders: Focus on synaptic plasticity and apoptosis regulatory genes in schizophrenia, posttraumatic stress disorder and ischemic stroke. // *International Journal of Genetics and Genomics* 2014, 2(2):19-29. doi:10.11648/j.ijgg.20140202.12.

#### **Материалы конференций**

1. Atshemyan S., Telumyan E., Arakelyan A., Zakharyan R. No association between collapsin response mediator protein gene variations and schizophrenia. New approaches to psychiatric drug development. Nice, France, 12-13 March 2017, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017; 27(Suppl.1):S13–S14. doi:10.1016/S0924-977X(17)30081-0.
2. Atshemyan S., Telumyan E., Arakelyan A., Zakharyan R. Association of complexin-4 gene variants with schizophrenia. 29<sup>th</sup> ECNP Congress. Vienna, Austria, 17-20 September, 2016. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016; 26(Suppl.2):S189. doi.org/10.1016/S0924-977X(16)31025-2.
3. Аджемян С. Захарян Р. Ассоциация шизофрении с полиморфизмами гена, кодирующего белок комплексин-4. Сборник Тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века», Казань, 25-28 ноября 2015; с. 15.
4. Tadevosyan K., Atshemyan S., Boyajyan A. Genetic polymorphisms of chimerin-1 in schizophrenia and ischemic stroke. 28<sup>th</sup> ECNP Congress. Amsterdam, the Netherlands. 29 August-1 September 2015. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2015; 25(Suppl.2):S160–S161. doi.org/10.1016/S0924-977X(15)30138-3.
5. Atshemyan S., Zakharyan R. Polymorphisms in chimerin-1 gene not associated with schizophrenia. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International scientific conference “Dialogues on Science”. Yerevan, 23-26 June 2015, p. 45.

## ԱՃԵՄՅԱՆ ՍՈՖԻ ԱՐՄԱՆԻ

ՍԻՆԱՊՏԻԿ ՊԼԱՍՏԻԿՈՒԹՅԱՆ ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉՆԵՐԻ ԳԵՆԵՐԻ  
ՊՈԼԻՄՈՐՖԻԶՄՆԵՐԸ ՇԻՋՈՖՐԵՆԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

### ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ շիզոֆրենիա, սինապտիկ պլաստիկություն, կարգավորիչ գեներ, եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմ, ճանաչողական խանգարումներ:

Չնայած շիզոֆրենիայի (ՇՖ) զարգացման մոլեկուլային հիմքերի լայնածավալ ուսումնասիրություններին՝ մինչ այժմ պարզաբանված չէ այս ծանր հիվանդության հետ ասոցացված մարկերների թիվը: ՇՖ-ի ժամանակ օրգանիզմի խաթարված գործընթացների համապարփակ ուսումնասիրումը գենետիկական մակարդակով և կենսաինֆորմատիկայի մոտեցումների կիրառմամբ թույլ կտա բացահայտել հիվանդության հետ կապված նոր թեկնածու գեներ:

Աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել ուսումնասիրել ՇՖ-ի կապը սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչների գեների պոլիմորֆիզմների հետ և ՇՖ-ի հետ ասոցացված ալելների ֆունկցիոնալությունը: Հետազոտության համար ընտրվել են նյարդամեդիատորների արտանետման և նյարդային բջիջների աճի գործընթացները կարգավորող կոմպլեքսին-2 (*CPLX2*), կոմպլեքսին-3 (*CPLX3*), կոմպլեքսին-4 (*CPLX4*), քիմերին-1 (*CHN1*), կոլապսինի պատասխանի միջնորդ-4 (*CRMP4*) և կոլապսինի պատասխանի միջնորդ-5 (*CRMP5*) գեները:

Հետազոտության առարկա են հանդիսացել ազգությամբ հայ ՇՖ-ով հիվանդների ( $n=260$ ) և առողջ անձանց ( $n=260$ ) արյան պլազմայի ու ԴՆԹ-ի նմուշները: Կիրառվել են PCR-SSP, ELISA, վիճակագրական և կենսաինֆորմատիկայի մի շարք մեթոդներ:

Ցույց է տրվել, որ *CPLX2* գենի rs1366116\*T մուտանտ ալելը հանդիսանում է ՇՖ-ի ռիսկի գործոն, իսկ նույն գենի rs3892909\*T ալելը նվազեցնում է հիվանդության զարգացման ռիսկը:

Առաջին անգամ ցույց է տրվել, որ *CPLX2* գենի rs1366116 պոլիմորֆիզմն ասոցացված է ՇՖ-ի առաջին դրսևորման տարիքի հետ: Այսպես, rs1366116\*T ալելով հոմոզիգոտ անձանց մոտ հիվանդությունն արտահայտվում է ավելի վաղ տարիքում՝ այլ գենոտիպեր կրողների համեմատ: Միևնույն ժամանակ rs1366116\*T մուտանտ ալելի ժառանգումն ասոցացված է ՇՖ-ով հիվանդների արյան մեջ կոմպլեքսին-2 սպիտակուցի ցածր մակարդակի հետ: Ցույց է տրվել, որ *CPLX4* գենի rs4940456\*T մուտանտ ալելը բարձրացնում է, իսկ *CRMP4* գենի rs1049171\*T մուտանտ ալելը՝ նվազեցնում ՇՖ-ի զարգացման դիսկը:

Ցույց է տրվել, որ հետազոտված պոլիմորֆիզմների մուտանտ ալելների հանդիպման հաճախականությունը հայկական պոպուլյացիայում տարբերվում է այլ պոպուլյացիաներում նույն ալելների հանդիպման հաճախականությունից:

Կենսաինֆորմատիկայի գործիքների կիրառմամբ մի շարք տվյալների շտեմարանների վերլուծությունը բացահայտել է, որ ՇՖ-ի հետ ասոցացված գեների էքսպրեսիան տարբերվում է գլխուղեղի տարբեր հատվածներում: Բացի այդ, հիվանդության հետ ասոցացված պոլիմորֆիզմները ֆունկցիոնալ են և կարող են ներգրավված լինել համապատասխան գեների էքսպրեսիայի տարբերության մեջ:

Աշխատանքի հիմնարար նշանակությունը կայանում է նրանում, որ ստացված արդյունքներն ի հայտ են բերում ՇՖ-ի զարգացման համար նոր թեկնածու գեներ, որոնք համալրում են հիվանդության պաթոմեխանիզմների մասին առկա պատկերացումները: Ստացված արդյունքները վկայում են, որ ՇՖ-ի ժամանակ գլխուղեղի զարգացման խանգարումները սինապտիկ պլաստիկության կարգավորիչների մակարդակով առնվազն մասամբ պայմանավորված են գենետիկական գործոններով:

Կիրառական տեսանկյունից տվյալ հետազոտության արդյունքները կարող են նախադրյալներ ստեղծել ՇՖ-ի ախտորոշման և բուժման նոր արդյունավետ մեթոդների մշակման համար:

POLYMORPHISMS OF THE SYNAPTIC PLASTICITY REGULATORY GENES IN  
SCHIZOPHRENIA

**SUMMARY**

*Keywords:* schizophrenia, synaptic plasticity, regulatory genes, single nucleotide polymorphism, cognitive dysfunction.

Despite intensive studies of molecular bases of schizophrenia (SCZ), so far the number of markers, associated with this severe disorder is unclear. The comprehensive study of processes altered in SCZ at genetic level and using approaches of bioinformatics is of special importance.

This project aimed to explore the association of polymorphisms in the genes regulating synaptic plasticity and functionality of their disease-associated alleles. Complexin-2 (*CPLX2*), complexin-3 (*CPLX3*), complexin-4 (*CPLX4*), chimerin-1 (*CHN1*), collapsin-response mediator protein-4 (*CRMP4*) and collapsin-response mediator protein-5 (*CRMP5*) genes regulating the release of neuromediators and neuronal growth were selected for the study.

The objects used in this study comprised blood plasma and DNA samples of 260 ethnic Armenian patients with SCZ and 260 healthy individuals from the same population. To analyze the specimens and process the generated data several wetlab, statistical and bioinformatics techniques have been applied.

It was shown that the rs1366116\*T mutant allele of the *CPLX2* gene is a risk factor for the development of the SCZ, whereas the rs3892909\*T allele of the same gene, in contrary, reduces the risk of the SCZ development.

For the first time, we demonstrated that the rs1366116 polymorphism of the *CPLX2* gene is associated with the age of the first manifestation. In rs1366116\*T homozygous individuals, the disease is manifested at an earlier age than in carriers of other genotypes. At the same time, the inheritance of the rs1366116\*T mutant allele is associated with low level of complexin-2 protein in the blood of SCZ patients.

We also revealed that the rs4940456\*T mutant allele of the *CPLX4* gene increases, whereas the rs1049171\*T mutant allele of the *CRMP4* gene reduces the risk of SCZ development.

It was shown that the mutant allele frequencies of the studied polymorphisms in Armenian population significantly differ from the corresponding features in other populations.

Analysis of various databases using bioinformatics tools demonstrated that the expression level of the genes associated with SCZ varies in different parts of the brain. Moreover, the polymorphisms associated with the disease are functional and can be implicated in variations of corresponding genes expression.

From the fundamental point of view, the results obtained reveal new candidate genes for schizophrenia development and enrich our understanding of molecular pathomechanisms of the disease. The results indicate that the developmental and synaptic dysfunctions of the brain during schizophrenia are at least partially genetically determined at the level of synaptic plasticity regulators.

As a practical outcome, the results of this study may serve as a basis for the development of new diagnostic and treatment approaches to schizophrenia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'S. Legh' or similar, located in the lower right quadrant of the page.