

# Исследование роли мутации в гене *SLC6A1* в развитии шизофрении *in vitro*

Букина Е. С.<sup>1</sup>, Артюхов А. С.<sup>2</sup>, Кондратьев Н. В.<sup>3</sup>, Карпов Д. С.<sup>2,3,4</sup>, Абашкин Д. А.<sup>2,3</sup>,  
 Дашинимаев Э. Б.<sup>2,5</sup>, Козин С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Россия, Москва

<sup>2</sup> — ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Россия, Москва

<sup>3</sup> — ФГБНУ Научный центр психического здоровья, Россия, Москва

<sup>4</sup> — ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Россия, Москва

<sup>5</sup> — ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, Москва

**Ключевые слова:** шизофрения; мутации; ген *SLC6A1*

## Для цитирования:

Букина Е.С., Артюхов А.С., Кондратьев Н.В., Карпов Д.С., Абашкин Д.А., Дашинимаев Э.Б., Козин С.В. Исследование роли мутации в гене *SLC6A1* в развитии шизофрении *in vitro* // *Фармакогенетика и фармакогеномика*. 2020;(2):4-5. (In Russ). DOI: 10.37489/2588-0527-2020-2-4-5

**Введение.** Шизофрения — это полиморфное полигенное психическое заболевание с не до конца изученным патогенезом [1], понимание механизмов развития которого позволит разработать новые подходы к лечению. Клиническая картина шизофрении неоднозначна: под диагнозом «шизофрения» объединён ряд отдельных синдромов, отличающихся в том числе и генетическим бэкграундом [1]. При этом заболевании выделяют позитивные, негативные и когнитивные симптомы, выраженность которых может существенно варьировать. На данный момент наиболее успешным подходом к лечению шизофрении является медикаментозная терапия антипсихотиками, которая не всегда даёт желаемый эффект в связи с клинической гетерогенностью заболевания.

Одним из подходов при разработке новых лекарств является использование для доклинических исследований клеточных моделей *in vitro*. Однако в случае психических заболеваний это затруднено из-за ограниченного доступа к клеткам головного мозга. Животные модели недостаточно адекватны из-за межвидовых различий в строении нервной системы. В связи с этим широкое распространение получили модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [2]. ИПСК, полученные из фибробластов кожи пациентов, могут быть дифференцированы в нейральном направлении *in*

*vitro* и затем использованы для исследования патогенеза шизофрении.

Существуют разные подходы к оценке генетической предрасположенности к развитию шизофрении. Оценка полигенного риска — наличие полиморфизмов, ассоциированных с развитием того или иного полигенного заболевания (шизофрении в том числе), — базируется на результатах полногеномного поиска ассоциаций [3]. Однако помимо полиморфизмов в генетическую архитектуру шизофрении вносят вклад вариации числа копий генов, редкие мутации и эпимутации, которые могут возникать *de novo* [4]. Для их выявления часто используют подход, основанный на сравнении геномных последовательностей у пробандов и их здоровых родителей (в так называемых тройках). В нашем распоряжении есть фибробласты кожи, полученные от больного шизофренией с мутацией в гене *SLC6A1*, ассоциированной с развитием заболевания, и его здоровых родителей. Ген *SLC6A1* кодирует транспортер гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), отвечающий за обратный захват ГАМК из синаптической щели. Использование моделей *in vitro* на основе ИПСК даёт возможность изучать влияние отдельных мутаций, в частности *de novo* мутации в гене *SLC6A1* на характеристики нервной ткани и в дальнейшем разрабатывать подходы к персонализированному лечению.

**Цель.** Изучить влияние мутации *de novo* в гене *SLC6A1*, кодирующем обратный транспортер ГАМК, на патогенез шизофрении.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Подтвердить у пробанда наличие мутации в гене *SLC6A1*.
- Получить и охарактеризовать ИПСК из фибробластов пробанда и родителей.
- Перепрограммировать полученные ИПСК в нейроны и провести их сравнительный анализ.
- С помощью высокоточной системы геномного редактирования Prime Editor исправить мутацию в гене *SLC6A1* на стадии ИПСК, перепрограммировать ИПСК пробанда с отредактированным геномом в нейроны и вновь провести их сравнительный анализ с нейронами, полученными из фибробластов родителей.

**Материалы и методы.** Выделение геномной ДНК из культур клеток человека: фенол-хлороформная экстракция; амплификация гена *SLC6A1* с помощью количественного метода ПЦР; секвенирование по Сенгеру (аутсорс); получение плазмид, содержащих гены Яманаки (аутсорс); наработка плазмиды: трансформация плазмиды в компетентные клетки (*Escherichia coli*), посев на чашки Петри на агар с ампициллином, постановка ночной культуры, выделение плазмиды набором MiniPrep (Евроген); упаковка плазмид в лентивирусы и их дальнейшее концентрирование в концентрате центрифужном Amicon; лентивирусная трансдукция культур

фибробластов родителей и пробанда; морфологический анализ ИПСК: микроскопия; анализ специфических маркеров ИПСК: покраска селективными антителами; проверка уровня экспрессии специфических маркеров ИПСК: выделение РНК и обратная транскрипция (набор ExtractRNA (Евроген), согласно инструкции производителя), синтез кДНК (набор MMLV RT (Евроген), согласно инструкции производителя), ПЦР в реальном времени (ПЦР-анализу подвергалась кДНК, полученная в ходе обратной транскрипции, для определения уровней экспрессии маркеров ИПСК в исследуемых клетках); тест на функциональную активность: способность дифференцироваться в три зародышевых листка.

**Результаты.** С помощью секвенирования по Сенгеру было подтверждено наличие исследуемой мутации в гене *SLC6A1* в геноме пробанда, и отсутствие этой мутации в геномах родителей.

На данный момент мы находимся на этапе получения ИПСК из фибробластов кожи пробанда и родителей: получены лентивирусные трансдукты, которыми были заражены культуры фибробластов пробанда и родителей.

**Заключение.** Поскольку на данный момент патогенез шизофрении до конца не ясен, таргетных препаратов для её лечения нет. Однако возможность получения ИПСК из фибробластов пациентов и дифференцировка их в нейроны позволят изучать механизмы развития заболевания с учётом индивидуальных различий и эффективнее проводить скрининг препаратов для таргетной терапии и генной терапии в том числе.

#### Литература / References

1. Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*. 2014;506(7487):179-184. DOI: 10.1038/nature12929
2. Busskamp V, Lewis NE, Guye P et al. Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells. *Mol Syst Biol*. 2014;10:760. DOI: 10.15252/msb.20145508
3. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12):e1002822. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002822
4. Sullivan PF, Daly MJ, O'Donovan M. Genetic architectures of psychiatric disorders: The emerging picture and its implications. *Nat Rev Genet*. 2012;13(8):537-551. DOI: 10.1038/nrg3240