

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ СПОРАДИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ ШИЗОФРЕНИИ В СЕМЕЙНЫХ ТРИО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

© 2023 г. Т. В. Андреева^{1, 2, *}, Ф. А. Афанасьев², Ф. Е. Гусев^{2, 3}, А. Д. Патрикеев²,
С. С. Кунижева^{2, 3}, Е. И. Рогаев^{3, 4, 5, **}

¹Центр генетики и генетических технологий, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет “Сириус”,
Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

⁵Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, МА 01545 США

*e-mail: an_tati@vigg.ru

**e-mail: evgeny.rogaev@umassmed.edu

Поступила в редакцию 07.12.2022 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

Шизофрения — распространенное психическое заболевание, наследственная природа которого подтверждена многочисленными исследованиями. В настоящее время выявлено более сотни генетических локусов, ассоциированных с шизофренией, также идентифицированы редкие варианты в генах и хромосомные перестройки, связанные с семейными случаями заболевания. Однако не всегда удается определить наследственную природу патологии, многие случаи шизофрении являются спорадическими, а генетическая причина таких случаев остается неизвестна. С использованием данных полногеномного секвенирования трех семейных трио российского происхождения со спорадическими формами шизофрении мы провели поиск редких потенциально патогенных вариантов в кодирующих и регуляторных локусах генома, включая *de novo* и компаундные мутации. Также провели оценку полигенного риска развития шизофрении с использованием распространенных полиморфных маркеров. В результате проведенного анализа были показаны генетическая гетерогенность спорадических форм шизофрении, а также потенциальный вклад редких замен в генах, связанных с метаболизмом глутамата и инозитолфосфата, в развитие спорадических случаев шизофрении.

Ключевые слова: шизофрения, полногеномное секвенирование, полигенный риск, *de novo* варианты.

DOI: 10.31857/S0016675823060024, **EDN:** SRPBKR

Шизофрения является одним из наиболее распространенных в мире психических заболеваний, которым страдает до 1–2% всего населения [1]. Роль генетических факторов в развитии шизофрении давно известна, а многочисленные исследования свидетельствуют о высокой генетической гетерогенности заболевания.

Результаты полногеномного анализа генетических ассоциаций (GWAS) предполагают существование сотен и даже тысяч генетических маркеров в геноме человека, потенциально связанных с шизофренией, каждый из которых вносит незначительный индивидуальный вклад в развитие патологии, тогда как комбинация этих маркеров приводит к болезни [2–5]. Оценка предрасположенности к шизофрении на основе расчетов полигенного

риска позволяет объяснить до 7% случаев шизофрении [6, 7]. Около 5% случаев шизофрении связаны с хромосомными перестройками [8, 9]. Исследования последних лет свидетельствуют о существенной роли *de novo* мутаций в развитии шизофрении, что подтверждается более высокой частотой развития патологий у детей, родившихся у возрастных отцов [10, 11].

Высокая генетическая гетерогенность шизофрении, а также пересечение ее симптомов и уже выявленных генетических факторов с другими психическими патологиями затрудняют идентификацию первичных ключевых механизмов развития заболевания. Кроме того, большинство выявленных генетических маркеров шизофрении до сих пор еще не имеют прямого клинического приме-

Таблица 1. Характеристика образцов, использованных в работе

Семья (этническое происхождение)	Образец (член семьи)	Диагноз	Пол	Возраст на момент обследования, лет
Семья 1 (балкарцы)	SF1 (мать)	Здорова	Ж	55
	SF2 (отец)	Здоров	М	61
	SF3 (пробанд)	Шизофрения (F20.024)	Ж	26
Семья 2 (русские)	SF4 (отец)	Здоров	М	68
	SF5 (мать)	Здорова	Ж	61
	SF6 (пробанд)	Шизофрения (F20.014)	Ж	32
Семья 3 (русские)	SF7 (отец)	Здоров	М	55
	SF8 (мать)	Здорова	Ж	51
	SF9 (пробанд)	Шизофрения (F20.02)	Ж	23

нения. Важное значение для разработки эффективных методов терапии и профилактики данной болезни имеет оценка наиболее распространенных генетических факторов заболевания в той или иной популяционной группе. Целью данной работы является оценка вклада различных генетических факторов в развитие спорадических форм шизофрении в семейных трио из российских популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы три ядерные семьи, включающие здоровых родителей и ребенка с диагнозом шизофрении (табл. 1). Исследования были одобрены этическим комитетом ИОГен РАН; от всех членов семей, включенных в исследование, было получено письменное согласие на участие в исследовании. Диагноз пациентов установлен врачами ГКУЗ ПНД МЗ КБР (семьи 1 и 2) и ФГБУ НЦПЗ (семья 3) в соответствии с критериями МКБ-10, оценка психического состояния здоровых родственников была проведена врачом, обследовавшим пробандов.

ДНК выделяли из образцов периферической венозной крови с использованием набора реагентов QIAamp DNA Blood (Qiagen). 1 мкг полученной ДНК использовали для приготовления фрагментных геномных библиотек с помощью набора реагентов TruSeq DNA Sample Preparation Kit (Illumina). Подготовленные геномные библиотеки секвенировали на платформе HiSeq2000/2500 (Illumina) в режиме парных прочтений. Полученные прочтения были картированы на референсный геном человека GRCh37/hg19 с помощью bwa mem [12]. Для поиска генетических вариантов использовали HaplotypeCaller из пакета программ GATK v4 [13], с последующей фильтрацией выявленных вариантов с помощью ApplyRecalibration, аннота-

цию проводили с помощью VEP [14], предсказание патогенности выявленных миссенс-вариантов проводили с помощью SIFT и PolyPhen2 [15, 16]. Для поиска структурных вариаций использовали SpeedSeq [17] и forestSV [18], генотипирование структурных вариантов проводили с помощью SV2 [19].

Для проверки родственных связей в каждой семье использовали набор из 52 идентификационных маркеров и рассчитывали комбинированный индекс родства (CPI) [20].

Для идентификации вероятных генетических факторов, приводящих к развитию шизофрении у исследованных пациентов, проводили расчет полигенного риска, а также поиск редких потенциально патогенных вариантов, включая *de novo* варианты, гомозиготные и компаундные мутации.

Для оценки полигенного риска развития шизофрении у членов каждой семьи были использованы данные полногеномного анализа ассоциаций, полученные на основе анализа 46 независимых выборок образцов европейского происхождения [2]. При расчете использовали 93 однонуклеотидных полиморфных маркера, статистика по которым представлена в базе GWAS Catalog [21]. В качестве контрольной группы при анализе полигенного риска использовали генотипы 503 индивидов европейского происхождения из проекта “1000 геномов” [22]. Генотипы девяти исследуемых образцов были объединены с генотипами полученной референсной панели, после чего для каждого образца был рассчитан полигенный риск (PRS) по следующей формуле:

$$PRS_{\text{образца}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{SNP}}} \beta_{\text{SNP}i} n_{\text{риск-аллель}},$$

где N_{SNP} — это количество анализируемых генетических вариантов; $\beta_{\text{SNP}i}$ — это размер эффекта ге-

нетического варианта i , полученный из статистики в GWAS Catalog; $n_{\text{риск-аллель}}$ — это количество риск-аллелей генетического варианта i в генотипе данного индивида. На основе полученных значений полигенного риска в популяционной референсной панели из проекта “1000 геномов” были рассчитаны стандартизированные оценки (Z -оценки) полигенного риска для каждого пациента с шизофренией и его родителей.

При поиске потенциально патогенных вариантов рассматривали только редкие, встречающиеся в популяциях с частотой менее 1% [23]. Для отбора *de novo* вариантов (однонуклеотидные замены и короткие инсерции/делеции) применяли следующие фильтры: референсный гомозиготный генотип у родителей и гетерозиготный у ребенка; количество прочтений, подтверждающих мутацию, у родителей должно было быть не больше 3%, у ребенка от 25 до 75%. Кроме того, при отборе *de novo* мутаций были подобраны такие значения параметров программы GATK ApplyRecalibration, чтобы число предсказанных вариантов для индивидуального генома было не менее 70, что соответствует среднему числу новых замен на геном человека [24]. Отбор структурных *de novo* вариантов проводили с применением следующих фильтров: гомозиготный референсный генотип у каждого родителя и гетерозиготный генотип у ребенка, а также отсутствие прочтений, содержащих структурный вариант у обоих родителей [25]. Все выявленные *de novo* варианты дополнительно были визуально проверены в IGV [26].

Поиск *de novo* вариантов в регуляторных участках генома проводили с использованием эпигенетических профилей, представленных в базе данных NIH Roadmap Epigenomics (<http://www.roadmapepigenomics.org>). Были использованы области генома, соответствующие промоторам и энхансерам в клетках тканей мозга. Для анализа коротких инсерционно-делеционных вариантов в регуляторных областях отбирали те, которые были предсказаны с помощью алгоритма DeepSea [27] как нарушающие регуляторные свойства ($p < 0.01$). Изменения в сайтах связывания в случае однонуклеотидных замен анализировали с помощью сервиса PERFECTOS-APE и базы данных HOC-OMOCO для человека [28]. Для идентификации генов, в энхансерах которых были выявлены замены, использовали базу данных GeneLoc [29].

При анализе потенциально патогенных рецессивных вариантов отбирали такие, которые присутствуют у родителей в гетерозиготном состоянии, а у ребенка — в гомозиготном. Для поиска компаундных вариантов был написан скрипт, который отбирает гетерозиготные варианты, присутствующие у одного из родителей и ребенка в гетерозиготном состоянии и отсутствующие у второго родителя, после пересечения двух таких

списков были получены компаундные варианты, которые ребенок унаследовал от разных родителей.

Дополнительно проводили поиск редких вариантов в кодирующих участках генов, для которых ранее была выявлена ассоциация с шизофренией [2, 30–32]. В анализ включали только варианты в генах, экспрессирующихся в тканях мозга [33].

Валидацию *de novo* вариантов в кодирующих участках генов проводили с помощью секвенирования методом Сэнгера, анализ продуктов амплификации локусов, содержащих короткие инсерции/делеции, проводили на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) с использованием набора реагентов High Sensitive DNA Chip (Agilent). Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР-амплификации (доступны по запросу) подбирали с использованием программы Primer3 [34]. Для амплификации использовали набор реагентов GenPak PCR Core (ООО “Лаборатория Изоген”, Россия), реакцию секвенирования проводили с помощью набора Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 2 представлена общая статистика по результатам секвенирования геномов представителей трех семейных трио со спорадическими случаями шизофрении. В результате геномного секвенирования для каждого образца было получено 32–50× геномное покрытие, среднее покрытие 97.5% кодирующих последовательностей генома (экзонов) для всех образцов составило >5×.

Анализ родства

Вероятность отцовства и материнства по результатам анализа 52 несцепленных маркеров составила более 0.9996 для всех трех семей, что подтверждает родственные связи внутри семей.

Полигенный риск развития шизофрении

Результаты оценки полигенного риска развития шизофрении у исследованных пациентов и их родителей представлены на рис. 1. В двух семьях (семья 1 и семья 2) полигенный риск развития шизофрении у ребенка оказался выше, чем у его здоровых родителей. При этом в семье 1 полигенный риск ребенка выше, чем у 97.5% в европейской популяции (рис. 1,а). В семье 3 полигенный риск развития шизофрении ребенка был выше такового у его матери, но не отца (рис. 1,б).

De novo мутации в кодирующих и регуляторных последовательностях

В результате поиска *de novo* мутаций были выявлены 70, 103 и 102 однонуклеотидные замены в

Таблица 2. Общая статистика по полученным данным полногеномного секвенирования

Образец	Общее число полученных прочтений, млн пар	Прочтения, картированные на геном человека GRCh37, %	Среднее покрытие генома
SF1	719	99.7	44×
SF2	610	99.7	34×
SF3	630	99.6	36×
SF4	593	99.6	32×
SF5	843	99.7	50×
SF6	848	99.8	49×
SF7	646	99.6	37×
SF8	606	99.7	34×
SF9	747	99.5	37×

Таблица 3. Варианты *de novo*, выявленные у пациентов с шизофренией и отсутствующие у их здоровых родителей

Семья (пробанд)	Геномные координаты	Референсный аллель	Альтернативный аллель	Ген	Аминокислотная замена	Частота в европейских популяциях*
Семья 2 (SF6)	19:422205	G	A	<i>SHC2</i>	p.Leu521Phe	—
Семья 3 (SF9)	7:138602846	G	A	<i>KIAA1549</i>	p.Ala509Val	—
	19:48305654	C	T	<i>TPRX1</i>	p.Gly205Asp	0.1033
	17:77807917	T	TGCCGCC	<i>CBX4</i>	p.Ala509_Ala510dup	0.08477

* По базе данных GnomAD v2.1.1.

геномах пациентов с шизофренией из семьи 1, 2 и 3 соответственно; структурных вариаций, которые отсутствовали у родителей, но присутствуют у пробандов, не было обнаружено ни в одной семье. Новые мутации, найденные в кодирующих областях генома пациентов со спорадическими случаями шизофрении, представлены в табл. 3, две из них встречаются в европейских популяциях с высокой частотой, поэтому были исключены из дальнейшего рассмотрения.

Секвенирование по методу Сэнгера подтвердило присутствие мутации p.Ala509Val в гене *KIAA1549*, отсутствующей у здоровых родителей, у пробанда из семьи 3, а также мутации p.Leu521Phe в гене *SHC2* у пациента с шизофренией из семьи 2 (рис. 2, а, б).

Выявленная у пациента из семьи 2 однонуклеотидная замена в гене *SHC2* (19:422205 G>A, p.Leu521Phe) приводит к замене лейцина на фенилаланин в консервативной среди всех хордовых позиции белка. Мутация затрагивает функциональный домен SH2 продукта гена, отвечающий за его взаимодействие с другими белками и передачу им сигналов. Следует отметить, что аналогичная замена (p.Leu43Phe) в SH2-доме другого белка (продукт гена *PTPN11*) является пато-

генной и приводит к развитию синдрома Нунана [35], что свидетельствует о важной функциональной роли данной аминокислотной позиции в белке и всего белкового домена. Ген *SHC2* экспрессируется в коре больших полушарий мозга, а ранее были высказаны предположения о его возможной связи с шизофренией как белка, участвующего в процессах синаптической передачи сигналов [36].

De novo вариант, выявленный в семье 3 в гене *KIAA1549* (7:138602846 G>A, c.1526C>T, p.Ala509Val), отсутствует в базе данных gnomAD. Позиция аминокислоты не обладает консервативностью: замены в этой позиции по сравнению с белком человека встречаются у 23% млекопитающих. Ген *KIAA1549* экспрессируется в различных тканях, включая ткани мозга. Его функции до сих пор неизвестны, хотя мутации в этом гене описаны при аутосомно-рецессивных формах пигментного ретинита [37].

В результате проведенного поиска *de novo* вариантов в регуляторных участках генома, активных в нейрональных клетках мозга человека, были выявлены две замены, значимо изменяющие сайты связывания транскрипционных факторов согласно базе HOCOMOCO (<https://hocomoco11.autosome.org>). У пациентки из семьи 1 идентифици-

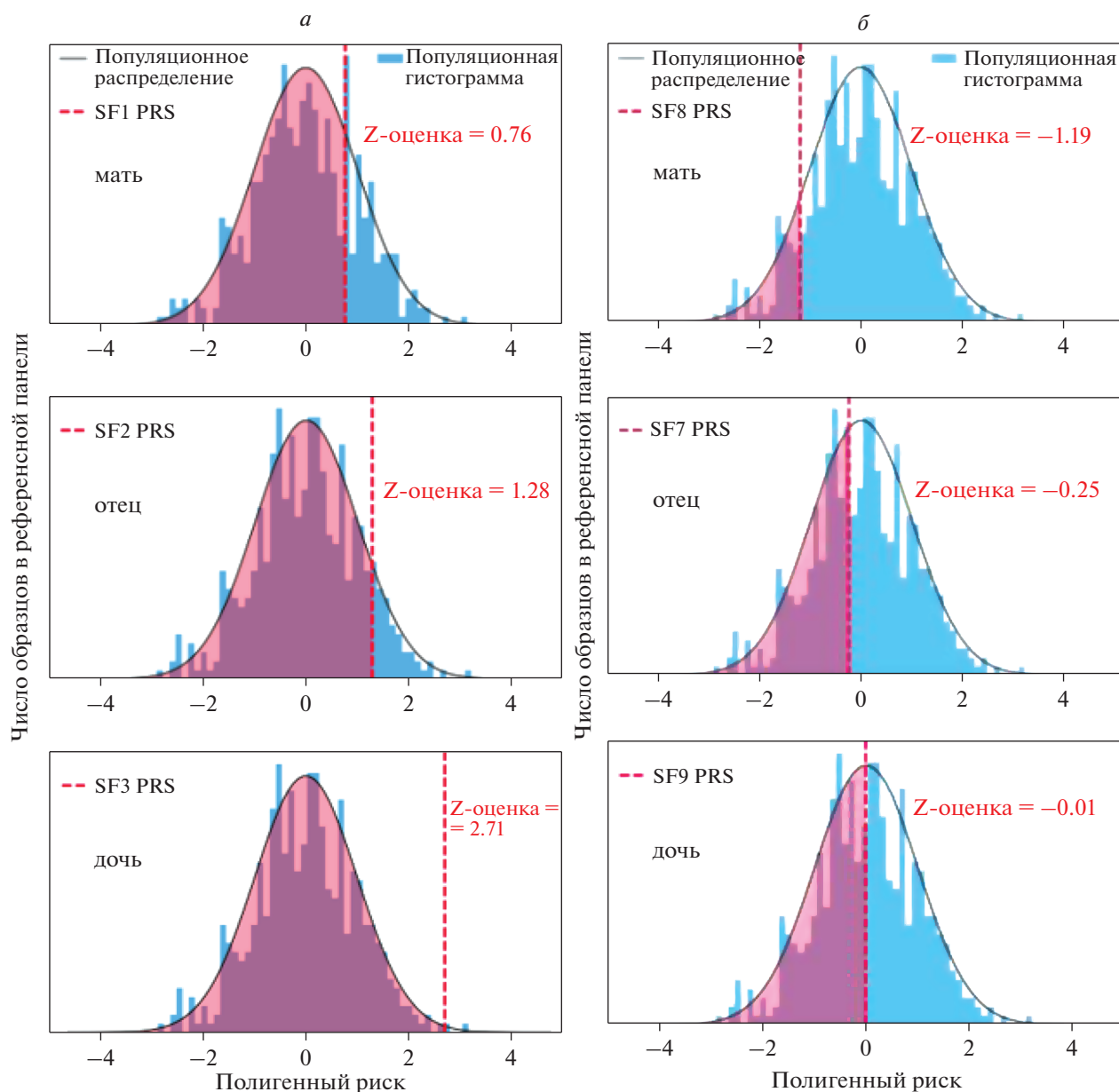


Рис. 1. Оценка полигенного риска развития шизофрении у пациентов с шизофренией и их здоровых родителей. *a* – семья 1, *б* – семья 2, *в* – семья 3. Z-оценка для исследованных членов семей обозначена красным пунктиром. Столбчатая диаграмма синего цвета соответствует индивидуальным оценкам полигенного риска у индивидов европейского происхождения из проекта “1000 геномов”.

рована мутация в энхансере гена *TSPAN9* (12:3327271, T>C), а у пациентки из семьи 3 была обнаружена новая мутация в промоторной области гена *CNTRL* (9:123835451, A>C). Обе нуклеотидные замены отсутствуют в базе данных GnomAD. В настоящее время в литературе отсутствует информация о возможном участии двух этих генов в функционировании нервной системы или развитии нейропсихических патологий, поэтому их возможный вклад в патогенез шизофрении требует дополнительных исследований.

Рецессивные и компаундные мутации

В результате поиска потенциально патогенных редких аутосомно-рецессивных мутаций в кодирующих областях генома была выявлена единственная такая вариация – замена в гене *C1orf87* (1:60474407 G>A, p.Arg3Cys) в семье 3. Функции этого гена в настоящее время неизвестны, информация о его возможной ассоциации с шизофренией или другими психическими патологиями также отсутствует. Гомозиготных вариантов в кодирующих участках генома у пациентов с ши-

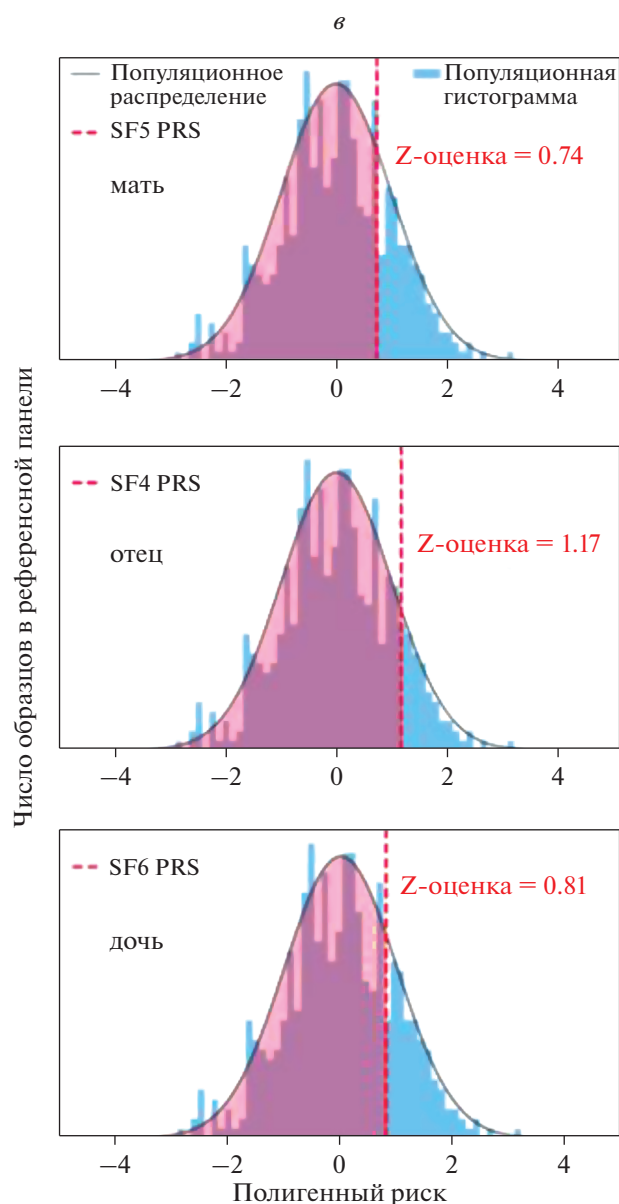


Рис. 1. Окончание.

зофренией из семей 1 и 2, которые присутствуют у здоровых родителей в гетерозиготном состоянии, выявлено не было.

У пробанда из семьи 2 были выявлены компаундные мутации в гене *INPP5J*. Замена 22:31522435 G>A (p.Gly449Ser) была унаследована от отца, а вариант 22:31521105 C>T (p.Ala127Val) был получен пациентом от матери. Продукт гена участвует в метаболизме инозитолтрифосфата. Обе мутации расположены в сайтах белка, которые не являются эволюционно-консервативными, а алгоритмы SIFT и PolyPhen2 предсказывают их как непатогенные.

Редкие варианты в генах, ассоциированных с шизофренией

В результате анализа генов, для которых ранее была показана ассоциация с шизофренией, в исследованных семьях были выявлены варианты в кодирующих областях известных генов, потенциально связанных с шизофренией (табл. 4).

В семье 1 было выявлено пять вариантов, приводящих к аминокислотной замене в генах или локусах, ассоциированных с шизофренией. Четыре из них пациентка получила от матери, один вариант (в гене *SLC18A1*) был унаследован от отца. Ген *SLC18A1* кодирует транспортер моноаминов (серотонина, дофамина и норэпинефрина) и расположен в локусе на хромосоме 18, ассоциированном с различными психическими патологиями, включая биполярные расстройства и шизофрению [38, 39]. Выявленная в семье 1 нуклеотидная замена расположена в сайте сплайсинга, изменения которого потенциально затрагивают почти все транскрипты гена и могут привести к снижению экспрессии гена. В недавних исследованиях было показано, что варианты в гене *SLC18A1* находились под действием положительного отбора в процессе эволюции человека, и высказано предположение о связанной с этим роли продукта этого гена в развитии специфических для человека психических заболеваний [40].

Вариант в гене *CIT* (p.Arg831Gln), унаследованный пациенткой с шизофренией от матери, расположен в консервативном среди млекопитающих и птиц сайте белка. Мутации в этом гене описаны при аутосомно-рецессивных формах микроцефалии, кроме того показано эпистатическое взаимодействие полиморфных маркеров в генах *CIT* и *DISC1* (ген, ассоциированный с шизофренией по результатам нескольких независимых исследований [41]) как при развитии шизофрении, так и при когнитивных процессах у психически здоровых людей [42].

Уникальная нуклеотидная замена в гене *WFS1* (p.Pro675Leu), выявленная у пациентки с шизофренией и ее здоровой матери, отсутствует в популяционной базе данных GnomAD. Аминокислотная замена расположена в консервативной среди млекопитающих области белка вольфрамина. Мутации в гене *WFS1* связаны с аутосомно-рецессивным нейро-дегенеративным синдромом Вольфрама, основными симптомами которого являются сахарный диабет, атрофия зрительного нерва и нарушения слуха. В целом ряде работ обсуждается связь мутаций в гене *WFS1* с различными психическими заболеваниями, включая шизофрению [43, 44].

По результатам проведенного ранее полногеномного анализа ассоциаций полиморфный вариант в гене *NOS1* (p.Asp394Ala), выявленный в семье 1, не ассоциирован с шизофренией [2].

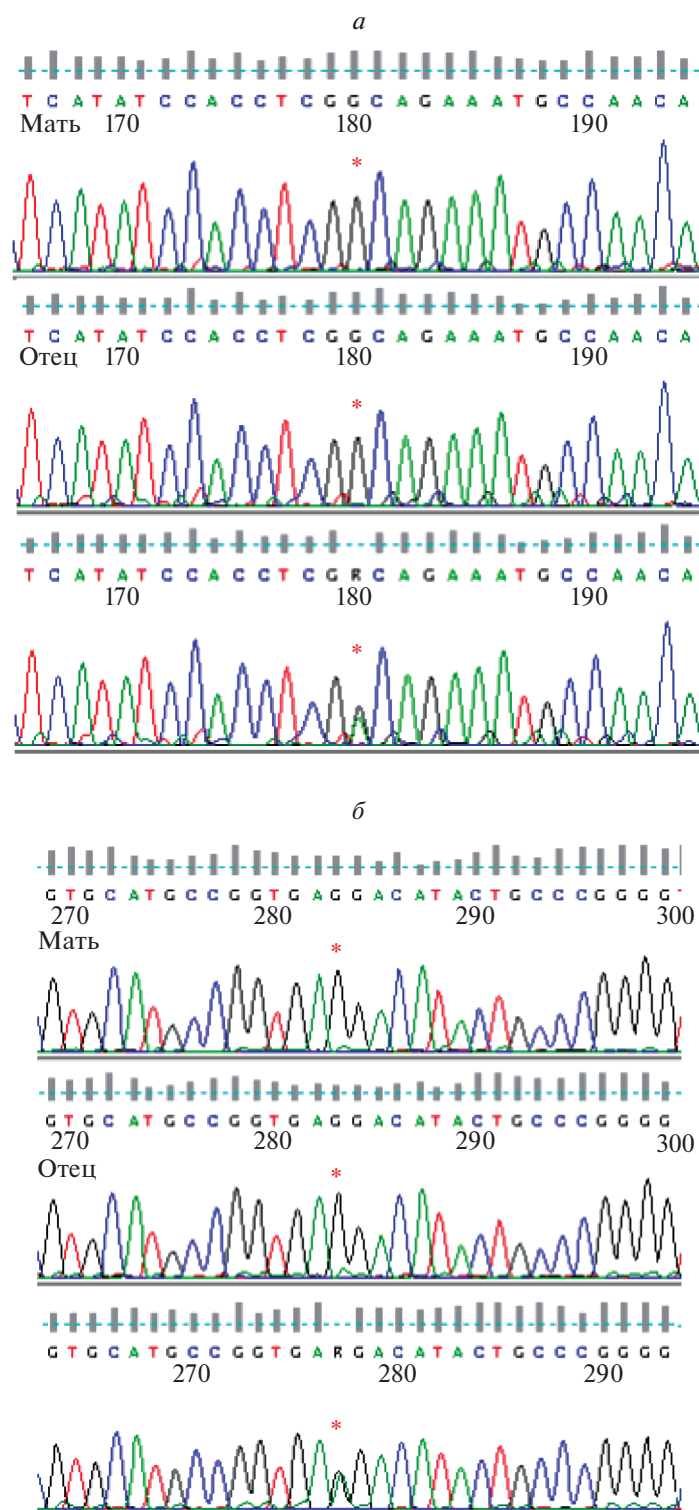


Рис. 2. Результаты секвенирования методом Сэнгера вариантов в генах *KIAA1549* (*a*) и *SHC2* (*б*) у пациентов с шизофренией (внизу) и их здоровых родителей. Звездочкой отмечено положение выявленной нуклеотидной замены.

Единственный вариант, выявленный в кодирующих участках генов, ассоциированных с шизофренией, в семье 2 у пациентки и ее матери приводит к аминокислотной замене в гене *CYFIP1*

(p.Glu469Asp). Данная замена расположена в высококонсервативном среди хордовых сайте белка, а в базе данных GnomAD присутствует только у одного индивида европейского происхождения.

Таблица 4. Редкие варианты в генах, связанных с шизофренией, выявленные у пациентов из исследованных семей

Семья (образцы)	Нуклеотидная замена	Ген	Аминокислотная замена	Частота в европейских популяциях*	SIFT	PolyPhen2
Семья 1 (SF1, SF3)	12:117724018 T>G	<i>NOS1</i>	p.Asp394Ala	0.007437	0.15	0.014
Семья 1 (SF1, SF3)	12:120195263 C>T	<i>CIT</i>	p.Arg831Gln	0	0.46	0.001
Семья 1 (SF2, SF3)	8:20038604 A>T	<i>SLC18A1</i>	Сайт сплайсинга	0.00006	—	—
Семья 1 (SF1, SF3)	4:6303546 C>T	<i>WFS1</i>	p.Pro675Leu	—	0*	0.996 [#]
Семья 2 (SF5, SF6)	15:22954257 G>T	<i>CYFIP1</i>	p.Glu469Asp	0.0000088	0.02*	0.247
Семья 3 (SF7, SF9)	6:146720043 T>C	<i>GRM1</i>	p.Val623Ala	0.000008791	0*	1 [#]
Семья 3 (SF8, SF9)	21:30968856 A>G	<i>GRIK1</i>	p.Val414Ala	0.000008842	0.02*	0.003
Семья 3 (SF7, SF9)	10:121581975 A>G	<i>INPP5F</i>	p.Tyr664Cys	—	0.02*	1 [#]

* SIFT. deleterious. [#] PolyPhen. probably damaging.

Ранее было показано, что полиморфизм в гене *CYFIP1* ассоциирован с шизофренией в китайской популяции [45], кроме того показан доза-зависимый вклад продукта гена в поддержание нормальных синаптических функций и развитие различных психических патологий [46, 47].

У пациентки из семьи 3 были обнаружены мутации в двух различных генах, кодирующих глутаматные рецепторы. Первый вариант — замена в гене *GRM1* (p.Val623Ala), кодирующем метаболитный глутаматный рецептор mGluR1, был получен ею от здорового отца, вторая замена — в гене *GRIK1* (p.Val414Ala), кодирующем ионотропный глутаматный рецептор GluK1, — от здоровой матери. Обе аминокислотные замены в продуктах генов *GRM1* и *GRIK1* затрагивают эволюционно-консервативную среди позвоночных позицию соответствующего рецептора, в базе данных GnomAD присутствуют только по одному носителю каждого варианта. Ранее у пациентов с шизофренией были выявлены различные мутации в гене *GRM1* [48, 49], а потенциальный вклад изменений в гене *GRIK1* и уровня его экспрессии в развитие шизофрении был показан как на основе генетического анализа, так и в функциональных исследованиях [50–52].

Кроме того, у пациентки с шизофренией из семьи 3 и ее здорового отца была обнаружена уникальная замена в гене *INPP5F* (p.Tyr664Cys), отсутствующая в базе данных GnomAD и приводящая к аминокислотной замене в консервативном сайте функционального домена белка, участвующего в метаболизме инозитолтрифосфата.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного нами полногеномного анализа данных секвенирования трех семейных трио со спорадическими случаями шизофрении впервые был оценен вклад различных гене-

тических факторов в развитие спорадических форм шизофрении в семьях российского происхождения. Оценка полигенного риска развития шизофрении в последнее время рассматривается как одно из перспективных приложений для оценки риска развития заболевания, хотя обсуждаются значительные ограничения этого метода, связанные, например, с выбором подходящей контрольной группы [53], а также с отсутствием значимого вклада этого метода для диагностики [54]. В исследованных нами семьях вероятный вклад полигенного риска в развитие болезни был показан в двух семьях из трех (семья 1 и семья 2) — риск развития шизофрении у пробандов выше, чем у их здоровых родителей. Причем в семье 1 полигенный риск у пациентки оказался не только выше такового у обоих родителей, но и выше, чем значение риска у 97.5% индивидов европейского происхождения. Следует отметить, что члены семьи 1 относят себя к балкарцам, проживающим на ограниченной территории в ущельях и предгорьях Северного Кавказа, численность которых составляет около 125 тыс. человек (по данным переписи 2020 г.), поэтому нельзя исключить наличие дальних родственных связей между родителями пациентки, а следовательно гомозиготное состояние многих генетических маркеров, потенциально участвующих в развитии патологий.

Развитие шизофрении у пациентки из семьи 3 вероятно связаны с комбинацией в ее геноме нескольких потенциально патогенных редких вариантов в генах *GRM1* и *GRIK1*, полученных от разных родителей и приводящих к нарушениям в сигнальных путях, связанных с глутаматом — основным нейромедиатором в центральной нервной системе, роль которого в развитии шизофрении давно известна.

В двух исследованных семьях нами были обнаружены замены в консервативных сайтах белков, участвующих в метаболизме инозитолтрифосфа-

та. В семье 3 у пациентки и ее отца выявлена замена в консервативном сайте гена *INPP5F*, в семье 2 пациентка является носителем компаундных вариантов в гене *INPP5J*.

Инозитолтрифосфат является вторичным мессенджером, производство которого запускается по сигналу глутаматных рецепторов, необходим для передачи сигнала по глутаматному метаболическому пути. У пациентов с шизофренией было показано снижение уровня инозитола в тканях мозга [55], а также выявлена связь между уровнем инозитолтрифосфата в крови и эффективностью терапии [56]. До настоящего времени мутации в генах *INPP5F* и *INPP5J* не были описаны в связи с шизофренией, однако их прямая связь с компонентами сигнального пути глутамата и выявленные нами нарушения в их генах у пациентов с шизофренией позволяют предположить их вероятный вклад в развитие патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (номер гранта 19-75-30039).

Авторы работы выражают благодарность М.М. Шаваевой (ГКУЗ ПНД МЗ КБР) и д.м.н. Л.И. Абрамовой (ФГБНУ НЦПЗ) за предоставленные образцы биологического материала пациентов и членов их семей; Т.А. Бородиной и В.Н. Рыкалинной за помощь в проведении геномного секвенирования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Owen M.J., Sawa A., Mortensen P.B. Schizophrenia // *Lancet* (London, England). 2016. V. 388. № 10039. P. 86.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6)
2. Ripke S., Neale B.M., Corvin A. et al. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci // *Nature*. 2014. V. 511. № 7510. P. 421–427.
<https://doi.org/10.1038/nature13595>
3. Goes F.S., Mcgrath J., Avramopoulos D. et al. Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2015. V. 168. № 8. P. 649–659.
<https://doi.org/10.1002/AJMG.B.32349>
4. Ikeda M., Takahashi A., Kamatani Y. et al. Genome-wide association study detected novel susceptibility genes for schizophrenia and shared trans-populations diseases genetic effect // *Schizophr. Bull.* 2019. V. 45. № 4. P. 824–834.
<https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBY140>
5. Li Z., Chen J., Yu H. et al. Genome-wide association analysis identifies 30 new susceptibility loci for schizophrenia // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 11. P. 1576–1583.
<https://doi.org/10.1038/NG.3973>
6. Martin A.R., Daly M.J., Robinson E.B. et al. Predicting polygenic risk of psychiatric disorders // *Biol. Psychiatry*. 2019. V. 86. № 2. P. 97–109.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2018.12.015>
7. Kendler K.S. The schizophrenia polygenic risk score: to what does it predispose in adolescence? // *JAMA Psychiatry*. 2016. V. 73. № 3. P. 193–194.
<https://doi.org/10.1001/JAMAPSYCHIATRY.2015.2964>
8. Kato H., Kimura H., Kushima I. et al. The genetic architecture of schizophrenia: Review of large-scale genetic studies // *J. Hum. Genet.* 2023. V. 68. P. 175–182.
<https://doi.org/10.1038/S10038-022-01059-4>
9. Farrell M., Dietterich T.E., Harner M.K. et al. Increased prevalence of rare copy number variants in treatment-resistant psychosis // *Schizophr. Bull.* 2022.
<https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBAC175>
10. Wu Y., Liu X., Luo H. et al. Advanced paternal age increases the risk of schizophrenia and obsessive-compulsive disorder in a Chinese Han population // *Psychiatry Res.* 2012. V. 198. № 3. P. 353.
<https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2012.01.020>
11. Khachadourian V., Zaks N., Lin E. et al. Advanced paternal age and risk of schizophrenia in offspring—review of epidemiological findings and potential mechanisms // *Schizophr. Res.* 2021. V. 233. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2021.06.016>
12. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 14. P. 1754–1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
13. McKenna A., Hanna M., Banks E. et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 9. P. 1297–1303.
<https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
14. McLaren W., Gil L., Hunt S.E. et al. The ensembl variant effect predictor // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/S13059-016-0974-4>
15. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
<https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
16. Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 7. P. 1073–1081.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
17. Chiang C., Leyer R.M., Faust G.G. et al. SpeedSeq: Ultra-fast personal genome analysis and interpretation // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 10. P. 966–968.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3505>
18. Michaelson J.J., Sebat J. ForestSV: Structural variant discovery through statistical learning // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. № 8. P. 819–821.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2085>

19. Antaki D., Brandler W.M., Sebat J. SV2: Accurate structural variation genotyping and de novo mutation detection from whole genomes // *Bioinformatics*. 2018. V. 34. № 10. P. 1774–1777.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX813>
20. Sanchez J.J., Phillips C., Børsting C. et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. № 9. P. 1713–1724.
<https://doi.org/10.1002/elps.200500671>
21. Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M. et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019 // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D1005–D1012.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1120>
22. Sudmant P.H., Rausch T., Gardner E.J. et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes // *Nature*. 2015. V. 526. № 7571. P. 75–81.
<https://doi.org/10.1038/nature15394>
23. Purcell S.M., Moran J.L., Fromer M. et al. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia // *Nature*. 2014. V. 506. № 7487. P. 185–190.
<https://doi.org/10.1038/nature12975>
24. Roach J.C., Glusman G., Smit A.F.A. et al. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole genome sequencing // *Science*. 2010. V. 328. № 5978. P. 636.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1186802>
25. Brandler W.M., Antaki D., Gujral M. et al. Frequency and complexity of de novo structural mutation in autism // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 98. № 4. P. 667–679.
<https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2016.02.018>
26. Robinson P., Zemo jtel T. Integrative genomics viewer (IGV): Visualizing alignments and variants // *Computational Exome and Genome Analysis*. 2018. P. 233–245.
<https://doi.org/10.1201/9781315154770-17>
27. Zhou J., Troyanskaya O.G. Predicting effects of non-coding variants with deep learning-based sequence model // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 10. P. 931–934.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3547>
28. Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S. et al. HOCOMOCCO: Expansion and enhancement of the collection of transcription factor binding sites models // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D116–D125.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1249>
29. Rosen N., Chalifa-Caspi V., Shmueli O. et al. GeneLoc: Exon-based integration of human genome maps // *Bioinformatics*. 2003. V. 19. Suppl. 1.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG1030>
30. Carbon S., Dietze H., Lewis S.E. et al. Expansion of the gene ontology knowledgebase and resources // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № D1. P. D331–D338.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1108>
31. Rappaport N., Twik M., Plaschkes I. et al. MalaCards: An amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № D1. P. D877–D887.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1012>
32. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium // *Nat. Genet.* 2000. V. 25. № 1. P. 25–29.
<https://doi.org/10.1038/75556>
33. Lonsdale J., Thomas J., Salvatore M. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 6. P. 580–585.
<https://doi.org/10.1038/NG.2653>
34. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3—new capabilities and interfaces // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 15. P. e115.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
35. Lappalainen I., Thusberg J., Shen B., Vihinen M. Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations // *Proteins*. 2008. V. 72. № 2. P. 779–792.
<https://doi.org/10.1002/PROT.21970>
36. Glessner J.T., Reilly M.P., Kim C.E. et al. Strong synaptic transmission impact by copy number variations in schizophrenia // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 23. P. 10584–10589.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1000274107/SUPPL_FILE/PNAS.201000274SI.PDF
37. De Bruijn S.E., Verbakel S.K., De Vrieze E. et al. Homozygous variants in *KIAA1549*, encoding a ciliary protein, are associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa // *J. Med. Genet.* 2018. V. 55. № 10. P. 705–712.
<https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2018-105364>
38. Greenwood T.A., Lazzeroni L.C., Murray S.S. et al. Analysis of 94 candidate genes and 12 endophenotypes for schizophrenia from the Consortium on the Genetics of Schizophrenia // *Am. J. Psychiatry*. 2011. V. 168. № 9. P. 930–946.
<https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2011.10050723>
39. Lohoff F.W. Genetic variants in the vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1/SLC18A1) and neuropsychiatric disorders // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 637. P. 165–180.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-700-6_9
40. Sato D.X., Kawata M. Positive and balancing selection on *SLC18A1* gene associated with psychiatric disorders and human-unique personality traits // *EV. Lett.* 2018. V. 2. № 5. P. 499–510.
<https://doi.org/10.1002/EVL3.81>
41. Schumacher J., Laje G., Jamra R.A. et al. The DISC locus and schizophrenia: Evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 14. P. 2719–2727.
<https://doi.org/10.1093/HMG/DDP204>
42. Nicodemus K.K., Callicott J.H., Higier R.G. et al. Evidence of statistical epistasis between *DISC1*, *CIT* and *NDEL1* impacting risk for schizophrenia: Biological validation with functional neuroimaging // *Hum. Genet.* 2010. V. 127. № 4. P. 441–452.
<https://doi.org/10.1007/S00439-009-0782-Y/FIGURES/5>
43. Cryns K., Sivakumaran T.A., Van den Ouweland J.M.W. et al. Mutational spectrum of the *WFS1* gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22. № 4. P. 275–287.
<https://doi.org/10.1002/HUMU.10258>
44. Munshani S., Ibrahim E.Y., Domenicano I., Ehrlich B.E. The impact of mutations in wolframin on psychiatric

- disorders // *Front. Pediatr.* 2021. V. 9.
https://doi.org/10.3389/FPED.2021.718132
45. Zhao Q., Li T., Zhao X. et al. Rare CNVs and Tag SNPs at 15q11.2 are associated with schizophrenia in the Han Chinese population // *Schizophr. Bull.* 2013. V. 39. № 3. P. 712.
https://doi.org/10.1093/SCHBUL/SBR197
 46. Kim N.S., Ringeling F.R., Zhou Y. et al. *CYFIP1* dosages exhibit divergent behavioral impact via diametric regulation of NMDA receptor complex translation in mouse models of psychiatric disorders // *Biol. Psychiatry.* 2022. V. 92. № 10. P. 815–826.
https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2021.04.023
 47. Davenport E.C., Szulc B.R., Drew J. et al. Autism and schizophrenia-associated *CYFIP1* regulates the balance of synaptic excitation and inhibition // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 8. P. 2037–2051. e6.
https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.01.092
 48. Cho H.P., Garcia-Barrantes P.M., Brogan J.T. et al. Chemical modulation of mutant mGlu1 receptors derived from deleterious *GRM1* mutations found in schizophrenics // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. № 10. P. 2334–2346.
https://doi.org/10.1021/CB500560H
 49. Ayoub M.A., Angelicheva D., Vile D. et al. Deleterious *GRM1* mutations in schizophrenia // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e32849.
https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032849
 50. Hirata Y., Zai C.C., Souza R.P. et al. Association study of *GRIK1* gene polymorphisms in schizophrenia: case-control and family-based studies // *Hum. Psychopharmacol.* 2012. V. 27. № 4. P. 345–351.
https://doi.org/10.1002/HUP.2233
 51. Costain G., Lionel A.C., Merico D. et al. Pathogenic rare copy number variants in community-based schizophrenia suggest a potential role for clinical microarrays // *Hum. Mol. Genet.* 2013. V. 22. № 22. P. 4485–4501.
https://doi.org/10.1093/HMG/DDT297
 52. Hu W., Macdonald M.L., Elswick D.E., Sweet R.A. The glutamate hypothesis of schizophrenia: Evidence from human brain tissue studies // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015. V. 1338. № 1. P. 38–57.
https://doi.org/10.1111/NYAS.12547
 53. Curtis D. Polygenic risk score for schizophrenia is more strongly associated with ancestry than with schizophrenia // *Psychiatr. Genet.* 2018. V. 28. № 5. P. 85–89.
https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000206
 54. Landi I., Kaji D.A., Cotter L. et al. Prognostic value of polygenic risk scores for adults with psychosis // *Nat. Med.* 2021. V. 27. № 9. P. 1576–1581.
https://doi.org/10.1038/s41591-021-01475-7
 55. Shimon H., Sobolev Y., Davidson M. et al. Inositol levels are decreased in postmortem brain of schizophrenic patients // *Biol. Psychiatry.* 1998. V. 44. № 6. P. 428–432.
https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00071-7
 56. Arranz B., Rosel P., San L. et al. Low baseline serotonin-2A receptors predict clinical response to olanzapine in first-episode schizophrenia patients // *Psychiatry Res.* 2007. V. 153. № 2. P. 103–109.
https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2006.12.015

Analysis of Genetic Factors of Sporadic Schizophrenia in Family Trios Using Whole Genome Sequencing

T. V. Andreeva^{a, b, *,}, Ph. A. Afanasiev^b, F. E. Gusev^{b, c,}, A. D. Patrikeev^b,
S. S. Kunizheva^{b, c,} and E. I. Rogayev^{c, d, e, **}

^aCenter for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology,
Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cCenter for Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Krasnodarski Krai, p. Sirius, 354340 Russia

^dMoscow State University, Moscow, 119234 Russia

^eDepartment of Psychiatry, UMass Chan Medical School, Worcester, MA 01545 USA

*e-mail: an_tati@vigg.ru

**e-mail: evgeny.rogayev@umassmed.edu

Schizophrenia is a mental disorder, the hereditary nature of which has been confirmed by numerous studies. Currently, more than a hundred genetic loci associated with schizophrenia have been described, and rare variants in genes and chromosomal rearrangements associated with familial cases of the disease have also been identified. However, it is not always possible to determine the hereditary nature of the pathology, many cases of schizophrenia are sporadic, and the genetic cause of such cases remains unknown. Using whole genome sequencing data for three family trios from Russia with sporadic cases of schizophrenia, we searched for rare potentially pathogenic variants in the coding and regulatory loci of the genome, including *de novo* and compound mutations. The polygenic risk of schizophrenia was also assessed using common polymorphic markers. As a result of the analysis, the genetic heterogeneity of sporadic forms of schizophrenia was shown, as well as the potential role of rare substitutions in genes associated with the metabolism of glutamate and inositol phosphate in sporadic cases of schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, whole genome sequencing, polygenic risk score, *de novo* variants.