

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ
(НИИ медицинской генетики)

На правах рукописи



Лопаткина Мария Евгеньевна

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ЭФФЕКТЫ ХРОМОСОМНЫХ
МИКРОДЕЛЕЦИЙ И МИКРОДУПЛИКАЦИЙ, ЗАТРАГИВАЮЩИХ ГЕН *CNTN6***

1.5.7 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

профессор РАН

Лебедев Игорь Николаевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

профессор,

Иванова Светлана Александровна

Томск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1 Хромосомные мутации как этиологический фактор нарушений нервно-психического развития.....	16
1.1.1 Вариации числа копий участков ДНК.....	16
1.1.2 Моногенные и внутригенные вариации числа копий участков ДНК.....	20
1.1.3 CNV и нарушения нервно-психического развития.....	21
1.1.4 Сложности в оценке фенотипических проявлений хромосомного дисбаланса	28
1.2 Молекулы межклеточной адгезии: классификация, структура и функции	31
1.3 Подгруппа молекул контактинов.....	35
1.3.1 Молекулярные механизмы реализации действия молекулы CNTN6.....	37
1.3.2 Клинические эффекты мутаций, затрагивающих ген <i>CNTN6</i>	40
1.3.3 Ассоциация мутаций гена <i>CNTN6</i> с процессами, не связанными с функциями ЦНС.....	44
1.4 Модельные системы на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	46
1.5 Транскриптомный анализ как инструмент изучения патогенеза хромосомных болезней	49
1.5.1 Транскриптомный анализ при реципрокных CNV	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	57
2.1 Дизайн исследования	57
2.2 Структура и объем материала.....	60
2.3 Выделение ДНК.....	64
2.4 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	64
2.5 Матричная сравнительная геномная гибридизация.....	66
2.5.1 Энзиматическое мечение	66
2.5.2 Очистка меченых образцов	68
2.5.3 Подготовка меченой ДНК к гибридизации.....	68
2.5.4 Гибридизация и отмывка.....	69
2.6 Полногеномное секвенирование ДНК фибробластов кожи.....	70
2.7 Репрограммирование фибробластов кожи.....	70
2.8 Создание линии ИПСК с нокаутом гена <i>CNTN6</i>	72
2.9 Направленная дифференцировка линий ИПСК	73
2.10 Выделение РНК	75
2.11 Анализ генной экспрессии с помощью ДНК-микрочипов.....	76
2.11.1 Проверка качества РНК	76
2.11.2 Калибровка измерений микроматричного анализа.....	78
2.11.3 Последовательный синтез кДНК на матрице РНК	79
2.11.4 Синтез кРНК, амплификация и мечение.....	79
2.11.5 Очистка образцов кРНК после мечения.....	79
2.11.6 Подготовка кРНК к гибридизации	80
2.11.7 Гибридизация и отмывка.....	81

2.12 Биоинформатический анализ и функциональная аннотация ДЭГ	81
2.13 Валидация результатов микрочипового анализа.....	82
2.13.1 Очистка образцов РНК методом ДНКазной обработки	82
2.13.2 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией.....	83
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	86
3.1 Частота микроделений и микродупликаций гена <i>CNTN6</i> в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития	86
3.2 Получение линий ИПСК с различным числом копий гена <i>CNTN6</i>	89
3.2.1 Анализ CNV в фибробластах кожи пациентов с микроделениями и микродупликациями 3p26.3.....	89
3.2.2 Исключение присутствия дополнительных хромосомных aberrаций в ИПСК.....	94
3.2.3 Анализ плюрипотентности полученных линий ИПСК	98
3.2.4 Получение линии ИПСК с нокаутом гена <i>CNTN6</i>	103
3.3 Направленная дифференцировка ИПСК в нейроны	105
3.4 Анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с умственной отсталостью и здоровых доноров	109
3.4.1 Дифференциальная экспрессия генов в нейронах с разным числом копий <i>CNTN6</i>	113
3.4.2 Транскриптомные эффекты моногенных реципрокных CNV с вовлечением гена <i>CNTN6</i> в нейрональных клетках	122
3.4.3 Особенности экспрессии генов в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных от условно здорового родителя и его ребенка с интеллектуальными нарушениями	125
3.4.4 Сравнительный анализ изменения экспрессии генов в нейронах с микроделением 3p26.3, дифференцированных из ИПСК сиблингов с интеллектуальными нарушениями	130
3.4.5 Анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК с различным числом копий гена <i>CNTN6</i> с помощью ОТ-ПЦР	133
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ.....	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	152
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	189
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	197
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	199
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	201
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	208

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хромосомные болезни представляют собой обширную группу наследственных болезней, характеризующихся врожденными пороками развития [Бочков и др., 2013]. В основе этиологии данных состояний лежат нарушения числа и структуры хромосом – геномные и хромосомные мутации. Генетический дисбаланс может проявиться на всех этапах онтогенеза, начиная от нарушений на ранних стадиях эмбриогенеза и заканчивая нарушениями репродукции во взрослом возрасте [Баранов, Кузнецова, 2006]. Хромосомные болезни нередко сопровождаются задержкой интеллектуального развития, психическими расстройствами, обменными нарушениями, что влечет за собой серьезные социальные трудности.

Применение современных технологий (матричная сравнительная геномная гибридизация (aCGH), секвенирование экзома (WES) и генома (WGS)) для идентификации генетических причин задержки развития и интеллектуальных расстройств позволяет выявлять большое число микроструктурных хромосомных aberrаций, или вариаций в числе копий участков ДНК (CNV) [Royer-Bertrand et al., 2021], среди которых встречаются как полиморфные варианты, патогенные варианты, так и мутации с неясной патогенетической значимостью (потенциально патогенные вариации). Патогенетически значимые хромосомные aberrации нередко выделяют в самостоятельные микроделеционные и микродупликационные синдромы, как, например, синдром Ди Джорджи, Прадера-Вилли, Ангельмана, Вильямса-Бойрена, Смит-Магенис, Потоки-Лупски, Кулена де Ври, Вольфа-Хиршхорна и многие другие [Goldenberg, 2018]. Кроме того, современные методы генетической диагностики делают возможным обнаружение хромосомных мутаций, затрагивающих единственный ген, что в некоторой степени способствует уточнению гено-фенотипических корреляций при смежных генных синдромах [Brandt et al., 2020].

Результаты многочисленных исследований указывают на связь микроструктурных aberrаций и нарушений нервно-психического развития. Данный термин объединяет большое число гетерогенных нозологических форм и синдромов, в основе патогенеза которых лежит нарушение нормальных процессов развития центральной нервной системы [Dierssen, 2020]. Так, показано, что 20 % случаев умственной отсталости обусловлены генетическими причинами, в частности, микроструктурными aberrациями хромосом [Лавров и др., 2016]. Одна из наиболее частых хромосомных мутаций – микроделеция в регионе 16p11.2 – ассоциирована с развитием интеллектуальных нарушений, расстройств аутистического спектра (РАС), психических и поведенческих отклонений [Girirajan et al., 2021]. CNV являются одним из этиологических факторов развития синдрома дефицита внимания и

гиперактивности (СДВГ), шизофрении, биполярного аффективного расстройства (БАР), депрессии, эпилепсии, синдрома Туретта и др. [Corròla et al., 2019; Werling, 2019; Ворсанова и др., 2013; Лавров и др., 2016; Юров и др., 2012].

Примечательно, что для многих заболеваний, связанных с нарушением нервно-психического развития (интеллектуальные нарушения, РАС, СДВГ, БАР) характерно наличие микроструктурных перестроек в одних и тех же регионах хромосом: 1q21.1, 2p16.3, 3q29, 7q11.23, 15q11.2, 15q11.2–13.1, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.1 и 22q11.2, что, вероятно, указывает на пересечение затронутых перестройкой биологических процессов и молекулярных путей и, соответственно, на общность патогенеза данных состояний [Morris-Rosendahl, Crocq, 2020]. Функциональные исследования, проведенные в течение последнего десятилетия, показывают, что как наиболее редкие, так и распространенные варианты, связанные с нарушением нервно-психического развития, влияют на гены, продукты которых вовлечены в общие консервативные молекулярные пути, связанные с процессами синтеза белка, транскрипционной или эпигенетической регуляцией и синаптической передачей сигналов [Parenti et al., 2020].

Несмотря на долгую историю изучения хромосомных болезней, многие аспекты патогенеза данных состояний до сих пор остаются неясными. Так, определенные сложности в понимании гено-фенотипических корреляций у пациентов с субмикроскопическими хромосомными абберациями вносит наличие множества неспецифических симптомов у пациентов с различными хромосомными синдромами, клинический полиморфизм заболевания, неполная пенетрантность мутации, наличие протяженной хромосомной перестройки, затрагивающей одновременно широкий спектр генов с различными функциями. Несмотря на, казалось бы, логичное предположение, что сужение спектра генов, вовлеченных в перестройку (в случае моногенных и внутригенных CNV – до одного гена), позволит сделать более строгий вывод о вкладе мутации в патогенез хромосомного заболевания, всё же остается открытым вопрос о связи хромосомной мутации и ее фенотипических проявлений. В большинстве случаев моно- и внутригенные CNV точно так же, как и протяженные хромосомные мутации, проявляются сложными комплексными нарушениями фенотипа: множественными врожденными пороками развития, нарушением физического, моторного и речевого развития, изменениями со стороны нервной системы (задержка интеллектуального развития, РАС, микроцефалия, эпилепсия, нарушение поведения) и лицевыми дисморфиями [Gillentine et al., 2021; Sanchez-Jimeno et al., 2021].

Также стоит отметить, что в ряде случаев лимфоциты периферической крови, фибробласты и амниоциты, традиционно используемые для цитогенетического анализа с целью диагностики хромосомного заболевания, не являются релевантным типом клеток для

интерпретации клинических эффектов и оценки патогенетической значимости вновь обнаруженных хромосомных мутаций. Использование животных моделей ограничено в возможности изучения развития и функционирования структур головного мозга, а также патогенеза заболеваний, которые являются уникальными для человека. Выходом из сложившейся ситуации может стать разработка и внедрение в практику методики получения и изучения персонифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с уникальными микроструктурными абберациями хромосом и интеллектуальными нарушениями.

В 2006 г. Takahashi и Yamanaka была разработана методика репрограммирования дифференцированных соматических клеток в ИПСК с помощью 4 транскрипционных факторов (Oct-3/4, Sox2, c-Мус и KLF4). Открытие нового метода репрограммирования соматических клеток, взятых от пациентов, позволило решить некоторые этические проблемы, возникающие при использовании в экспериментах эмбриональных стволовых клеток человека [Zahumenska et al., 2020]. В настоящее время технология создания ИПСК активно используется в зарубежных и отечественных лабораториях для моделирования нейродегенеративных заболеваний, психических расстройств и состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития [Shuvalova et al., 2021; Ustyantseva et al., 2020; Vigont et al., 2021; Whiteley et al., 2022; Yefroyev, Jin, 2022]. С помощью нейрональной дифференцировки ИПСК, полученных от пациентов с крупными хромосомными мутациями и микроструктурными абберациями, созданы клеточные модели ряда хромосомных болезней [Drakulic et al., 2020].

Создание модельных систем на основе нейронов, полученных из ИПСК пациентов с хромосомными мутациями, позволяет изучить патогенез заболевания как на клеточном, оценивая морфофункциональные особенности нейронов, так и на молекулярном уровне. Одним из ключевых методов исследования в данном случае является анализ транскриптома релевантных клеток, а именно анализ транскрипционной активности генов с помощью определения количества их мРНК. Проведение количественной оценки экспрессии генов в нормальных нейронах и клетках, несущих хромосомную мутацию, и анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) являются важным инструментом для выявления потенциальных участников молекулярных регуляторных сетей.

В ходе проводимых в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ обследований детей с интеллектуальными нарушениями, ранее были описаны пациенты с уникальными реципрокными хромосомными мутациями, ИПСК которых представляют собой удобную модельную систему для изучения механизмов патогенеза хромосомных болезней на клеточном и молекулярном уровне [Kashevarova et al.,

2014]. Стоит отметить, что у обоих пациентов хромосомная aberrация, а именно микроделеция или микродупликация, возникла в регионе 3p26.3, затрагивающем единственный ген *CNTN6* (контактин 6).

CNTN6 является нейрональной молекулой межклеточной адгезии, экспрессирующейся преимущественно в ЦНС и вовлеченной в процессы развития нейронов, формирования синапсов и миелинизации аксонов. Таким образом, *CNTN6* может участвовать в процессах развития и функционирования ЦНС, а мутации, затрагивающие ген *CNTN6*, могут быть ассоциированы с умственной отсталостью (УО), нарушением процессов нейрогенеза и развитием нейропатий. В ряде последних работ показана потенциальная роль CNV, затрагивающих *CNTN6*, в патогенезе УО, РАС, шизофрении, синдрома Туретта, БАР, СДВГ [Gandawijaya et al., 2021].

Несмотря на тот факт, что изучение данного суперсемейства иммуноглобулин-подобных молекул межклеточной адгезии (IgCAMs) продолжается уже давно, на сегодняшний день остаются неясными молекулярные механизмы действия молекулы *CNTN6* [Oguro-Ando et al., 2017]. В *CNTN6* отсутствует трансмембранный и внутриклеточный домен, поэтому для трансдукции сигнала он нуждается во взаимодействии с молекулярными партнерами [Zuko et al., 2013]. Показано, что молекула *CNTN6* непосредственно связывается с адгезивной молекулой *CHL1* при цис-взаимодействии, однако при этом они не функционируют в качестве лиганда и рецептора [Ye et al., 2008]. Предполагают, что молекулой, опосредующей трансдукцию сигнала внутрь нейрона, может служить протеин-тирозинфосфатаза α (PTP α), дефосфорилирующая и активизирующая внутриклеточную протеин-киназу p59fyn [Ye et al., 2011]. Еще одним молекулярным партнером *CNTN6* может выступать молекула рецепторной протеин-тирозинфосфатазы γ (PTPRG), экспрессирующейся исключительно в нервной системе [Bouyain, Watkins, 2010a; Mercati et al., 2017]. Молекула *CNTN6* рассматривается также в качестве неканонического лиганда Notch-рецептора, активация которого запускает Notch/DLX1 сигнальный путь [Cui et al., 2004; Hu et al., 2006]. В исследованиях A. Zuko с соавт. (2016) на мышах было показано, что *Cntn6* в качестве эндогенного лиганда связывается в цис-положении с молекулой *Lphn1*, относящейся к классу серпентинов, и ингибирует процессы апоптоза. Важно отметить, что многие патологические состояния, отмеченные у пациентов с мутациями в гене *CNTN6* и их родственников, а именно заболевания аутистического спектра, СДВГ, шизофрения, депрессия, агрессивность, БАР и нарушение обучаемости, также могут быть связаны с усилением апоптоза в нейронах [Berk et al., 2017; Beyazyüz et al., 2016; Sheikh et al., 2010].

Открытым остается вопрос фенотипического проявления хромосомных aberrаций в сегменте 3p26. Мутации, затрагивающие *CNTN6*, характеризуются неполной

пенетрантностью, тем самым осложняя оценку патогенетической значимости данной мутации. В ряде случаев мутации в субсегменте 3p26.3 с фенотипическим проявлением наследуются от условно здоровых родителей. Анализ родительского происхождения микродупликации *CNTN6*, выявленной в описанном нами ранее семейном случае, показал наследование перестройки от здорового отца пробанда и бабушки по отцовской линии [Kashevarova et al., 2014]. Данный случай не является уникальным: у 12 пациентов с известным семейным анамнезом отмечено наследование аналогичной хромосомной мутации от условно здоровых родителей. При этом у четырех пациентов семейный анамнез по линии бессимптомного носителя перестройки был отягощен случаями нервно-психических нарушений [Hu et al., 2015; Mercati et al., 2017; Repnikova et al., 2020]. В ранее проведенных нами исследованиях было показано, что фенотипическое проявление хромосомных мутаций в субсегменте 3p26.3, затрагивающих ген *CNTN6*, может быть связано с полом передавшего перестройку родителя [Gridina et al., 2018].

Для изучения роли CNV в патогенезе состояний, характеризующихся нарушением интеллектуального развития, необходимо выбрать систему, позволяющую проследить эффекты мутаций *in vitro*. Приемлемой для исследования УО системой может являться культура нейронов, полученных из ИПСК пациентов с реципрокной хромосомной перестройкой – микроделецией и микродупликацией 3p26.3, затрагивающей ген *CNTN6*. Опираясь на тот факт, что больше у данных пациентов не было выявлено других патогенетически значимых мутаций (по результатам проведенного полногеномного секвенирования), мы можем предположить, что фенотипические проявления CNV (в частности, УО) связаны именно с изменением дозы гена *CNTN6*. Проведение транскриптомного теста и последующего биоинформатического анализа позволит выявить группы ДЭГ, в которых будет проведен анализ обогащения и выявлены молекулярные пути, в которых участвуют продукты данных генов.

Таким образом, в настоящее время становятся особенно актуальными работы, связанные с использованием технологии получения ИПСК от пациентов с различными заболеваниями и их дифференцировкой в определенный тип клеток для последующего моделирования эффектов хромосомного дисбаланса. Результаты подобных исследований важны не только для понимания патогенеза хромосомных болезней, но и для разработки стратегий возможных способов коррекции проявлений данного патологического состояния, в том числе с использованием методов редактирования генома.

Степень научной разработанности темы исследования

Благодаря технологиям репрограммирования соматических клеток активно создаются модельные системы на основе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и психическими расстройствами. Работы по изучению механизмов развития хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, Штаргардта, синдрома Коэна, бокового амиотрофического склероза и спинальной мышечной атрофии ведутся и в отечественных лабораториях [Chechetkina et al., 2022; Grigor'eva et al., 2020; Maretina et al., 2022; Novosadova et al., 2019; Vigont et al., 2021; Лебедин и др., 2017; Честков и др., 2014]. В последние годы опубликовано несколько работ, посвященных изучению механизмов реализации патологического эффекта хромосомной мутации при проведении транскриптомного анализа в модельных системах нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [Adhya et al., 2021; Frega et al., 2019; Johnstone et al., 2019; Lam et al., 2019]. Однако стоит отметить, что работ, нацеленных на изучение патогенеза микроделеционных и микродупликационных синдромов, обусловленных микроструктурными абберациями, разнонаправленно изменяющими число копий хромосомных регионов и генов, в них локализованных, в настоящее время не так много [Adamo et al., 2015; Germain et al., 2014; Gillentine et al., 2017]. Более того, в настоящий момент отсутствуют данные об особенностях генной экспрессии в нейронах с реципрокными моногенными CNV.

Согласно существующим теоретическим моделям фенотипических эффектов реципрокных хромосомных мутаций – доминантной, аддитивной и U-образной – в нейронах с реципрокными CNV могут проследиваться определенные паттерны транскрипционных изменений в сравнении с нормой [Deshpande, Weiss, 2018]. Аддитивная модель предполагает разнонаправленное изменение экспрессии общих генов в клетках с микроделацией и микродупликацией одного и того же хромосомного региона. В случае U-образной модели, возможно выявление группы общих генов, одинаково изменяющих свою экспрессию вне зависимости от типа хромосомной мутации – микроделеции или микродупликации. Для доминантной модели характерно изменение экспрессии генов только в клетках с определенным типом мутации – или в клетках с микроделацией, или в клетках с микродупликацией. Основываясь на том факте, что реципрокные CNV, затрагивающие *CNTN6*, приводят к снижению его экспрессии [Gridina et al., 2018], мы ожидаем, что основным типом транскриптомных изменений в клетках с микроделацией и микродупликацией *CNTN6*, согласно U-образной модели, будет однонаправленное снижение или повышение экспрессии одних и тех же генов вне зависимости от типа хромосомной мутации (U-модель).

Цель исследования

Оценить распространенность CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, и охарактеризовать молекулярные эффекты вариабельности числа копий *CNTN6* в нейронах на транскриптомном уровне.

Задачи исследования

1. Оценить распространенность микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* в группе пациентов с нервно-психическими заболеваниями.
2. Создать клеточные модели реципрокной микроделеции и микродупликации 3p26.3 на основе линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с хромосомными мутациями.
3. Установить особенности изменения экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с различным числом копий *CNTN6*, и идентифицировать затрагиваемые вследствие дифференциальной экспрессии генов молекулярно-биологические пути и процессы.
4. Сравнить характер экспрессии генов в нейронах с микродупликацией *CNTN6*, полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя.

Научная новизна

С использованием технологий репрограммирования соматических клеток впервые получены пациент-специфичные ИПСК от индивидов с интеллектуальными расстройствами и уникальными реципрокными хромосомными мутациями в субсегменте 3p26.3. Впервые получена линия ИПСК от условно здорового индивида, являющегося носителем микродупликации гена *CNTN6*. Помимо линий ИПСК с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6*, с помощью методов редактирования генома получена линия ИПСК с функциональной нуллисомией по данному гену. Впервые исследованы особенности дифференциальной экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*. Для нейрональных клеток с реципрокными моногенными CNV впервые показаны глобальные транскрипционные изменения по всему геному – продемонстрировано изменение экспрессии большого числа генов, непосредственно не вовлеченных в хромосомную перестройку. Показано, что белковые продукты генов, снижающих свою экспрессию в нейронах с различным числом копий *CNTN6*, участвуют в значимых для развития мозга биологических процессах. Впервые получены данные, объясняющие плеiotропные эффекты хромосомных мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*. Выделена группа

генов, дифференциально экспрессирующихся в нейронах с хромосомным дисбалансом, продукты которых вовлечены в процессы развития и функционирования костно-мышечной, сердечно-сосудистой, пищеварительной систем. Впервые охарактеризован спектр транскриптомных изменений в нейронах с моногенными реципрокными CNV, который представлен 8 возможными комбинациями изменения экспрессии генов в зависимости от числа копий *CNTN6*. Сравнение списков дифференциально экспрессирующихся генов позволило выявить гены, одинаково изменяющие свою экспрессию вне зависимости от типа хромосомной мутации (микроделеции или микродупликации). В ходе настоящего исследования получены новые данные, подтверждающие гипотезу об общности молекулярных процессов и фенотипических проявлений реципрокных CNV в регионе 3p26.3. Впервые получены данные об особенностях экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК бессимптомного носителя моногенной CNV, затрагивающей ген *CNTN6*. В нейронах, полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями, по сравнению с клетками его условно здорового отца, выявлено снижение экспрессии подавляющего числа дифференциально экспрессирующихся генов.

Теоретическая и практическая значимость

Научная значимость результатов исследования заключается в получении новых фундаментальных знаний о механизмах реализации эффектов реципрокных CNV и фенотипических эффектах хромосомных мутаций. В ходе выполнения исследования разработана новая медицинская технология «Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроструктурных хромосомных aberrаций в сегменте 3p26.3 у детей с недифференцированной умственной отсталостью», внедренная в лечебно-диагностический процесс Медико-генетического центра (Генетической клиники) НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (акт внедрения № 4 от 10.10.2016 г). Разработанные стратегии получения культур персонифицированных ИПСК от пациентов с уникальными хромосомными мутациями и их дальнейшая дифференцировка в определенные типы клеток могут представлять интерес для проведения фундаментальных исследований, направленных на расшифровку патогенетических механизмов хромосомных болезней, а также на выявление новых мишеней лекарственных средств и синтез новых таргетных препаратов.

Методологическая основа диссертационного исследования

Научная идея исследования заключается в том, что для нейронов, дифференцированных из ИПСК индивидов-носителей реципрокных моногенных CNV, установлены общие паттерны изменения экспрессии генов, проявляющиеся сходными

изменениями фенотипа пациентов с нарушениями нервно-психического развития. Репрограммирование культур фибробластов, полученных от пациентов и их родственников с реципрокными микроделециями и микродупликациями гена *CNTN6*, в ИПСК, а также направленная дифференцировка линий ИПСК в нейроны, проводились в совместных исследованиях с Отделом молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН (заведующий – д.б.н, профессор Серов О.Л.). Оценка распространенности микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в группе пациентов с нервно-психическими заболеваниями была проведена в сотрудничестве с лабораторией молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (заведующая – д.м.н., профессор Иванова С.А.). Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Перед началом исследования было получено разрешение комитетов по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и НИИ психического здоровья Томского НИМЦ.

Для оценки уровня экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделцией, микродупликацией и нокаутом гена *CNTN6*, а также здоровых индивидов, был использован транскриптомный анализ на микрочипах, проведенный на базе ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов коллекции «Биобанк населения Северной Евразии». Биоинформатическая обработка данных проводилась на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Для оценки распространенности микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* использована технология ПЦР в режиме реального времени (qPCR) и метод aCGH.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Нейроны, дифференцированные из ИПСК пациентов с реципрокными моногенными хромосомными микроделециями и микродупликациями 3p26.3, характеризуются множественными изменениями транскрипционной активности генов, локализованных как в пределах, так и вне региона хромосомной перестройки. Изменение экспрессии затрагивает преимущественно гены, продукты которых вовлечены в нейрогенез и синаптическую передачу.
2. В нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделцией и микродупликацией гена *CNTN6*, выявлено 8 категорий транскриптомных эффектов, соответствующих аддитивной, доминантной и U-образной моделям фенотипического проявления реципрокных CNV. Доминирующим эффектом является снижение

транскрипции общих дифференциально экспрессирующихся генов как в клетках с микроделецией, так и с микродупликацией *CNTN6*, по сравнению с нормальной копийностью гена.

3. Среди дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах, полученных из ИПСК индивидов с микродупликацией *CNTN6*, регистрируются различия по представленности гипо- и гиперэкспрессирующихся генов в зависимости от их фенотипических особенностей: в нейронах, полученных из ИПСК пациента с умственной отсталостью, преобладают гены со сниженным уровнем экспрессии (89 % ДЭГ), тогда как для нейронов, полученных из ИПСК его отца без фенотипических проявлений, соотношение гипо- и гиперэкспрессирующихся генов составляет 43 % и 57 %, соответственно.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности данных, полученных в ходе выполнения настоящей работы, обеспечивается применением современных клеточных технологий репрограммирования соматических клеток, валидацией результатов в нескольких клеточных линиях, использованием молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также статистической обработкой полученных результатов.

Личный вклад автора

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно, либо в ходе совместной работы с коллегами из лаборатории онтогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (зав. – д.б.н., профессор РАН И.Н. Лебедев), лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (зав. – д.м.н., профессор С.А. Иванова) и Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН (зав. – д.б.н., профессор О.Л. Серов). Изучение литературы по теме диссертации, экспериментальная работа, анализ и обобщение результатов, написание диссертации выполнены лично автором. Диссертант участвовал на всех этапах обсуждения полученных результатов, их опубликования и представления на научных конференциях.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертационной работы были представлены на Всероссийской итоговой 74 студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2015); международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы медицинской генетики»

(Томск, 2016); XXV межрегиональной научно-практической конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2018); конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018); 23rd International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics (23 ICACG) (Санкт-Петербург, 2018); European Human Genetics Conference 2018 (Милан, Италия, 2018); международной конференции «Хромосома 2018» (Новосибирск, 2018); XXVI межрегиональной научно-практической конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2019); XII научной конференции «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (Томск, 2019), Российской конференции с международным участием «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддитивных расстройств» (Томск, 2020), Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (онлайн участие, 2020), IX Съезде Российского общества медицинских генетиков (Москва, 2021), 13th European Cytogenomics Conference (онлайн участие, 2022), I Международном форуме геномных и биомедицинских технологий «От рождения до активного долголетия» (Сургут, 2021). Выступления на конференции «Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддитивных расстройств», конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» и IX Съезде Российского общества медицинских генетиков отмечены победами в конкурсе молодых ученых (I, II, III место, соответственно).

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантов РНФ № 14-15-00772 и РФФИ № 19-315-90105.

Публикации

По теме исследования опубликовано 19 работ, в том числе 7 статей в журналах Перечня ВАК РФ, из них 5 статей в журналах, реферируемых в базе данных Web of Science и Scopus, и 2 статьи в журнале, индексируемом в базе данных РИНЦ. 12 публикаций представлены статьями в сборниках и тезисами научных конференций. Зарегистрирована база данных «Клинические и молекулярно-генетические характеристики больных шизофренией» (№ 2020621448).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и

обсуждение), выводы, список литературы и 4 приложения. Работа иллюстрирована 52 рисунками, 28 таблицами. Библиография включает 336 источников, из них 22 источника отечественной и 308 источников зарубежной литературы, а также 6 интернет-ресурсов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хромосомные мутации как этиологический фактор нарушений нервно-психического развития

1.1.1 Вариации числа копий участков ДНК

Хромосомные болезни – это большая группа наследственных заболеваний, характеризующихся множественными врожденными пороками развития, в основе которых лежат хромосомные или геномные мутации [Бочков и др., 2013]. Хромосомные аномалии приводят к нарушению общего генетического баланса, скоординированности в работе генов и системности регуляции, что негативно отражается на всех этапах индивидуального развития организма. Так, в ряде случаев цитогенетическими причинами обусловлены репродуктивные потери на ранних стадиях постимплантационного развития [Баранов, Кузнецова, 2006]. Представлены данные о вкладе генетической составляющей в этиологию таких событий, как младенческая и детская смертность (5–7 %), врожденные пороки развития (4–8 %) нарушение полового развития (25–27 %), мужское бесплодие (2 %) и др. [Лебедев, 2017]. У многих пациентов с хромосомными болезнями диагностируют задержку интеллектуального развития, расстройства аутистического спектра (РАС), эпилепсию, врожденные пороки развития, обменные нарушения и др., что влечет за собой серьезные социальные трудности [Кашеварова и др., 2014].

Возникновение большинства хромосомных синдромов обусловлено последствиями нарушений достаточно точного, но всё же подверженного ошибкам, процесса мейоза, приводящего к образованию гамет с аномальным генетическим составом, а также нарушений при постзиготическом митозе. Геномные (анеуплоидии и полиплоидии) и хромосомные мутации, к которым традиционно относят структурные аномалии хромосом, возникающие в половых клетках и зиготе на ранних этапах дробления, нарушают нормальный процесс преимплантационного и внутриутробного развития организма, что значительно сказывается на дальнейших этапах постнатального онтогенеза [Gardner, Amor, 2018].

Если ранее, в силу ограниченных разрешающих возможностей рутинных цитогенетических методов, диагностика хромосомной патологии ограничивалась обнаружением числовых и крупных структурных перестроек, то в настоящее время, благодаря прогрессу в области молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов, удастся выявить большое число микроструктурных хромосомных aberrаций. Такие структурные варианты, как делеции, дупликации и трипликации могут быть описаны как вариации в числе копий участков ДНК (CNV) [Visser et al., 2015]. Протяженность CNV варьирует от тысячи до нескольких миллионов пар нуклеотидов [Takumi et al., 2018]. Метод хромосомного микроматричного анализа (aCGH), впервые использованный для диагностики

в 2004 году, на сегодняшний день является инструментом первой линии широкогеномной детекции микроструктурных aberrаций у пациентов с недифференцированной формой УО, РАС, врожденными пороками развития (ВПР), а также при проведении инвазивной пренатальной диагностики для выявления хромосомных аномалий плода [Waggoner et al., 2018]. При этом часто возникает необходимость использования метода aCGH в сочетании со стандартным кариотипированием или гибридизацией *in situ*, которые дают информацию как о протяженности и типе перестройки, её геномном составе, так и о числе и структуре вовлеченных в перестройку хромосом, а также позволяют установить механизмы, приводящие к той или иной хромосомной aberrации [Шилова и др., 2018].

Вариации числа копий участков ДНК вносят существенный вклад в возникновение значительной субмикроскопической структурной вариабельности генома человека, составляя приблизительно 9,5 % его последовательности [Hovhannisyan et al., 2019]. Данная вариабельность имеет важные последствия для эволюционных процессов и развития ряда заболеваний [Yang et al., 2018]. Несмотря на то, что данный тип структурных aberrаций выявляется по всему геному, существуют области, наиболее предрасположенные к такого рода перестройкам. Такие особенности архитектуры генома человека, как наличие областей низкокопийных повторов, в частности, сегментных дупликаций протяженностью более 1 т.п.н. и идентичностью последовательностей > 90 %, высококопийных диспергированных повторов (LINEs, SINEs) и эндогенных ретровирусов человека, являются предрасполагающими факторами к формированию микроструктурных aberrаций [Кашеварова, Лебедев, 2016]. Обнаружение высокогомологичных последовательностей обозначило «горячие точки» в геноме, которые с высокой вероятностью подвергаются микроделециям и микродупликациям, в частности, в хромосомных регионах 7q11.23, 16p11.2, 17p11.2 и 22q11.2 [Goldenberg, 2018].

На сегодняшний день неаллельная гомологичная рекомбинация (NAHR) рассматривается в качестве одного из основных механизмов образования рекуррентных микроструктурных aberrаций в области сегментных дупликаций [Carvalho, Lupski, 2016] (Рисунок 1). Вероятным механизмом формирования нерекуррентных хромосомных перестроек является негомологичное соединение концов (NHEJ), возникающее при репарации двунитевых разрывов ДНК, опосредованная микрогомологией и индуцированная разрывами репликация (MMBIR), остановка вилки репликации и переключение матрицы (FoSTeS), проскальзывание вилок репликации (SRS) и L1-опосредованная ретротранспозиция [Carvalho, Lupski, 2016]. Образование CNV может быть предопределено не только структурными, но также и функциональными особенностями генома человека.

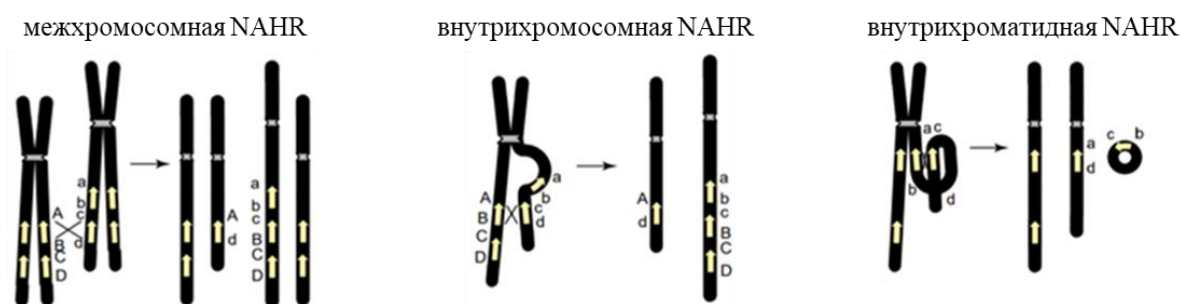


Рисунок 1 – Схематичное изображение образования рекуррентных микроструктурных aberrаций в области сегментных дупликаций по механизму NAHR. Черным цветом обозначены хромосомы, желтыми стрелками – области низкокопийных повторов [Stankiewicz, Lupski, 2002].

Сбой в программе синхронной репликации определенных областей генома может приводить к формированию микроструктурных aberrаций [Кашеварова, Лебедев, 2016].

CNV могут возникать *de novo* по механизму хромотрипсиса, хромоанасинтеза и хромоплексии. Данные события, объединенные термином «хромоагенез», характеризуются катастрофическим нарушением структуры и последующей хаотичной обратной сборкой одной или нескольких хромосом. Хромоагенез предположительно может быть связан с образованием дицентрических хромосом, а также инкапсулированием хромосом в микроядре в процессе деления клеток. Крупные CNV, затрагивающие несколько хромосом, могут указывать на мультифокальный геномный кризис, механизмы развития которого, вероятно, связаны с ошибками репликации, репарацией двунитевых разрывов ДНК (NHEJ) и наличием участков микрогомологии на различных хромосомах [Hattori, Fukami, 2020].

Хромосомные мутации нередко выделяют в самостоятельные микроделеционные и микродупликационные синдромы, как, например, синдром Ди Джорджи, Вильямса-Бойрена, Прадера-Вилли, Ангельмана, Смит-Магенис, Потоки-Лупски, Кулена де Ври, Вольфа-Хиршхорна и многие другие [Goldenberg, 2018]. CNV-ассоциированные заболевания, связанные с полярными изменениями копийности одного и того же хромосомного региона, принято выделять в самостоятельный класс микроделеционных и микродупликационных синдромов («genomic sister-disorders»). Наряду с редкими хромосомными синдромами, микроструктурные aberrации могут быть вовлечены в патогенез нервно-психических расстройств и нейродегенеративных состояний, онкологических заболеваний, ожирения, врожденных пороков сердца, заболеваний костно-мышечной системы и др. [Yang et al., 2018].

На протяжении всей истории изучения хромосомных болезней актуальным остается вопрос установления гено-фенотипических корреляций и раскрытия механизмов реализации патологического эффекта хромосомной мутации. Изучение данных состояний начиналось с

классического подхода «от фенотипа», предполагавшего обследование групп пациентов со схожей симптоматикой с последующим цитогенетическим исследованием для выявления основной причины заболеваний. В настоящее время в качестве приоритетного рассматривается подход «от генотипа», при котором обследуют клинически гетерогенные группы пациентов, полученные данные о микроструктурных перестройках и соответствующих им фенотипических проявлениях накапливаются, анализируются, для выявления основных клинических черт нового хромосомного синдрома [Gardner, Amor, 2018].

Основные фенотипические эффекты хромосомной патологии могут быть обусловлены влиянием нескольких основных факторов [Gardner, Amor, 2018; Лебедев, 2017]:

1. Дозовый эффект хромосомной мутации, обусловленный как недостатком, так и избытком хромосомного материала, возникающий при анеуплоидии по целой хромосоме или ее части.
2. Специфичный набор генов, локализованных в области перестройки.
3. Прямой повреждающий эффект мутации, приводящий к нарушению последовательности гена в области хромосомной перестройки.
4. Эффект положения гена, приводящий к изменению его активности при изменении его локализации в геноме.
5. Полная или мозаичная форма хромосомного нарушения.
6. Эффект родительского происхождения хромосомной аномалии (геномный импринтинг).
7. Модифицирующее влияние генотипа организма на клиническую картину хромосомного синдрома.
8. Условия окружающей среды, оказывающие влияние на развитие организма с хромосомной мутацией.
9. Комбинация вышеперечисленных механизмов.

В настоящее время одним из основных факторов развития синдромов, связанных с микроструктурными абберациями, считается изменение дозы затронутых перестройкой генов. Патологические состояния, возникающие вследствие утраты или удвоения участка хромосомы, содержащей несколько генных локусов, принято называть смежными генными синдромами [Pereira, Marion, 2018]. Установление гено-фенотипических корреляций при данных синдромах в большинстве случаев затруднено вследствие вовлечения в перестройку нескольких генов с разнообразными функциями. Практически в каждом регионе делеции и дупликации локализованы гены, так или иначе связанные с развитием и функционированием мозга, в то время как продукты других генов могут быть связаны с морфогенетическими

процессами. Таким образом, при любом микроделеционном и микродупликационном синдроме может проявиться клиническая картина интеллектуального дефекта и/или пороки развития [Gardner, Amor, 2018].

1.1.2 Моногенные и внутригенные вариации числа копий участков ДНК

Введение в диагностическую практику новых методов детекции генетических нарушений способствовало выявлению и описанию большого числа микроструктурных хромосомных aberrаций, а также возведению некоторых из данных перестроек в ранг самостоятельных микроделеционных и микродупликационных синдромов [Lupski et al., 2020]. Современные молекулярно-генетические технологии также позволяют выявлять несбалансированные хромосомные перестройки, затрагивающие единственный ген или его отдельные фрагменты, так называемые «моногенные» и «внутригенные» CNV [Truty et al., 2019]. Существование подобного рода перестроек в некоторой степени стирает физические границы между хромосомными и моногенными заболеваниями.

Выявление вероятно патогенных хромосомных мутаций, затрагивающих единственный ген или его отдельные фрагменты, не является редким событием в практике врача-генетика. Так, Truty с соавторами в своей научной работе показали, что при тестировании 143,5 тысяч индивидов было выявлено 2844 внутригенных CNV (1810 микроделений, 1034 микродупликации) в 384 генах, что составило примерно 10 % от общего числа индивидов с патогенными и вероятно патогенными хромосомными вариантами [Truty et al., 2019]. Патогенетически значимые перестройки были выявлены в генах, ответственных за развитие спинальной мышечной атрофии, болезни Шарко-Мари-Тус, дистрофинопатий, наследственных форм рака, врожденных пороков сердца, кардиомиопатии, семейной гиперхолестеринемии, синдрома Бругада, синдрома Линча, гетеротаксии, ранней эпилептической энцефалопатии, синдрома Жубер, туберозного склероза и аномалий развития капилляров в головном мозге. В другом исследовании при проведении высокоразрешающего микроматричного анализа у 7200 пациентов (11 % от общего числа обследованных) было выявлено более 8000 внутригенных CNV [Gambin et al., 2017]. Данные о высокой частоте патогенетически значимых моногенных и внутригенных CNV указывают на вероятный вклад перестроек в структуру наследственной заболеваемости человека, а сравнительно небольшой размер перестроек в случае делеций и дупликаций части гена, указывает на необходимость проведения дополнительных молекулярно-цитогенетических процедур для уточнения диагноза (Приложение А, Таблица А.1).

Несмотря на, казалось бы, логичное предположение, что сужение спектра генов, вовлеченных в перестройку (в случае моно- и внутригенных CNV – до одного гена),

позволит сделать более строгий вывод о вкладе мутации в патогенез хромосомного заболевания и позволит сделать предположение о функции конкретного гена, всё же остается открытым вопрос о связи хромосомной aberrации и ее фенотипических проявлений. Примечательно, что в большинстве случаев моногенные и внутригенные CNV точно так же, как и протяженные хромосомные мутации, неожиданно проявляются сложными комплексными нарушениями фенотипа: множественными ВПР, нарушением физического, моторного и речевого развития, изменениями со стороны нервной системы (задержка интеллектуального развития, РАС, эпилепсия) и лицевыми дисморфиями [Dennert et al., 2017; Mortreux et al., 2018].

В настоящее время определенные сложности вызывает трактовка результатов микроматричного анализа и данных массового параллельного секвенирования в случае выявления моногенных и внутригенных хромосомных перестроек. Возникновение мутации *de novo* в большинстве описанных случаев моногенных и внутригенных CNV подтверждает вероятную патогенетическую значимость исследуемых aberrаций [Dennert et al., 2017]. Тем не менее, как и для многих диагностируемых CNV, для моно- и внутригенных перестроек характерна неполная пенетрантность и переменная экспрессивность проявления хромосомной aberrации. Многие здоровые индивиды могут быть бессимптомными носителями определенной моногенной микроделеции или микродупликации и передавать данную хромосомную мутацию детям, у которых происходит проявление патологического фенотипа [Liu et al., 2015]. Отсутствие фенотипических проявлений у носителей патогенетически значимой CNV и проявление клинической картины заболевания у пробанда (при передаче мутации по материнской или отцовской линии) может указывать на импринтированный характер действия локализованного в ней гена. Широко распространенный феномен неполной пенетрантности аутосомно-доминантных, и, в ряде случаев, аутосомно-рецессивных мутаций, вносит определенные трудности в процесс медико-генетического консультирования пар и оценке риска патологического проявления мутации у потомства [Maya et al., 2020].

1.1.3 CNV и нарушения нервно-психического развития

Термин «нарушение нервно-психического развития» (neurodevelopmental disorders) объединяет большое число гетерогенных нозологических форм и синдромов, в основе патогенеза которых лежит нарушение нормальных процессов развития центральной нервной системы [Cardoso et al., 2019]. Причиной может стать нарушение развития мозга, манифестирующее психоневрологическими расстройствами или нарушением двигательных функций, процессов обучения, вербальной и невербальной коммуникации и поведения

[Ismail, Shapiro, 2019]. К таким состояниям принято относить нарушения интеллектуального и речевого развития, дисфункцию сенсорной интеграции, РАС, СДВГ, эпилепсию, детский церебральный паралич (ДЦП), а также психические расстройства, в частности, БАР, шизофрению, синдром Туретта, обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР) и др. [Morris-Rosendahl, Crocq, 2020]. Данные состояния встречаются у 3 % детей по всему миру и могут быть обусловлены мутациями в более чем 1000 локусов генома [Tărlungeanu, Novarino, 2018].

В большинстве случаев заболевания, характеризующиеся нарушением нервно-психического развития, не являются изолированными состояниями: нарушение в одной сфере развития (познание, коммуникация, двигательные функции и др.) часто сопровождается изменениями в другой [Coe et al., 2019]. Так, в популяционных исследованиях было показано, что у половины обследованных пациентов с ДЦП диагностируют интеллектуальные нарушения и коммуникативные расстройства [Reid et al., 2018]. Гипотония и диспраксия часто выявляются у пациентов с УО. Для большинства пациентов с СДВГ и аутизмом характерны речевые нарушения [Avni et al., 2018]. Частичное перекрывание клинических фенотипов, высокая частота выявления нескольких нарушений у отдельного индивида, совпадающие стратегии лечения ставят под сомнение клиническую и этиологическую «независимость» состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития. Учитывая вышеперечисленные особенности, высказывается предположение, что данную группу заболеваний следует рассматривать как широкий спектр состояний различной степени тяжести, варьирующих от минимальных отклонений в работе головного мозга до самых тяжелых нарушений, а также как континуум, в котором в той или иной степени могут быть затронуты все сферы развития [Morris-Rosendahl, Crocq, 2020] (Рисунок 2).

Исследования показывают, что риск развития УО, РАС и СДВГ у мужчин в 2–4 раза выше, чем у женщин [May et al., 2019]. Возможной причиной различий в частоте данных заболеваний у лиц разного пола являются сложные взаимодействия между биологическими и социокультурными факторами [May et al., 2019]. Одной из гипотез, объясняющих данные различия, является протективный эффект дополнительной X-хромосомы у женщин, обуславливающий некий «порог» развития заболевания и необходимость дополнительного воздействия для реализации патологического фенотипа [Schore, 2017]. Согласно теории «экстремального мужского мозга», являющейся продолжением теории «эмпатии-систематизации», пациенты с РАС обладают гипермаскулинизированным мозгом, т.е. более склонны к систематизированию информации, чем к эмпатии. Примечательно, что

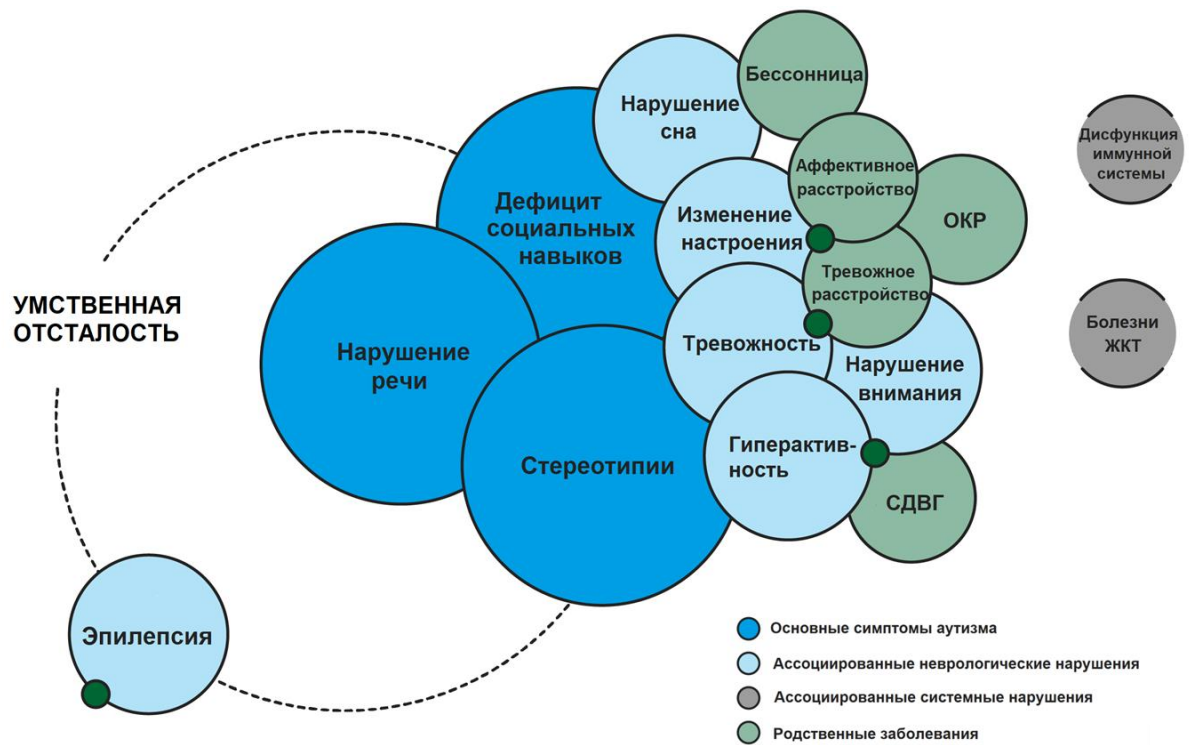


Рисунок 2 – Основные симптомы и ассоциированные неврологические и системные нарушения у пациентов с РАС [https://www.clinicbarcelona.org]

способность к эмпатии может характеризоваться некоторой вариативностью и объясняться генетической предрасположенностью к психическим расстройствам, в частности, к шизофрении [Greenberg et al., 2018]. На различия в частоте нарушений нервно-психического развития среди мужчин и женщин также может влиять воздействие стресса в течение эмбрионального периода развития организма и в раннем детском возрасте [Nugent et al., 2018]. Согласно андрогенной теории аутизма стероидогенные влияния являются потенциальными факторами, способствующими атипичному развитию нервной системы. Так, у женщин с синдромом поликистоза яичников, характеризующимся повышенной продукцией андрогенов, выше риски развития психических отклонений, в том числе РАС, тиков, булимии, шизофрении и тревожного расстройства [Cesta et al., 2016].

В настоящее время показано, что генетические и эпигенетические нарушения, в том числе точковые и хромосомные мутации, затрагивающие гены и некодирующие области генома, могут приводить к нарушению нервно-психического развития [Turner, Eichler, 2019]. Данные состояния проявляются коннектопатиями, синаптопатиями, дендритопатиями, нейродегенерацией, нарушениями передачи нервных импульсов и внутриклеточного сигналинга [Ismail, Shapiro, 2019]. Причиной данных нарушений могут стать мутации в генах, продукты которых участвуют в процессах эпигенетической регуляции (ремоделировании хроматина, модификации гистоновых белков, метилировании ДНК), синаптической передаче и регуляции транскрипции [Mastrototaro et al., 2017].

Для реализации процессов, необходимых для развития ЦНС, нервным клеткам требуется задействование ~70 % от числа всех экспрессирующихся генов, что объясняет факт проявления неврологической симптоматики и поведенческих проблем у большинства пациентов с редкими патогенными CNV [Deshpande, Weiss, 2018]. Наличие сильной корреляции вариаций числа копий ДНК с уровнем экспрессии генов позволяет рассматривать изменение экспрессии РНК в качестве одного из основных механизмов реализации патологического фенотипа при CNV [Blackburn et al., 2015]. Изучение патогенеза хромосомных болезней на примере синдромов, обусловленных CNV, дает преимущества при исследовании сложных фенотипов, поскольку изменение числа копий участков ДНК или белкового продукта дозозависимого гена, обусловленного изменением экспрессии, проще анализировать, чем функциональные нарушения, вызванные миссенс-мутациями и сдвигом рамки считывания, проявление которых сильно зависит от различных функциональных доменов белка [Deshpande, Weiss, 2018].

Изучение паттерна экспрессии генов при реципрокных делециях и дупликациях, затрагивающих одни и те же регионы генома, может быть полезным для установления гено-фенотипических корреляций. В настоящее время предложено несколько моделей реализации фенотипических эффектов реципрокных CNV, объясняющих причинно-следственную связь между экспрессией гена и клиническими проявлениями перестройки: аддитивная модель (увеличение или уменьшение количества числа копий генов приводит к противоположным фенотипическим эффектам), доминантная модель (хромосомные мутации имеют патологическое проявление только в случае гаплонедостаточности или гаплоизбыточности по определенным генам) и U-образная модель (недостаточная и избыточная экспрессия одного и того же продукта гена приводят к идентичным или сходным фенотипам) (Рисунок 3). Данные модели хорошо объясняют фенотипы пациентов с реципрокными хромосомными aberrациями в регионах 1q21.1, 7q11.23, 15q13.3, 16p11.2 и 22q11.2 [Deshpande, Weiss, 2018].

Нарушение интеллектуального развития является одним из наиболее частых симптомов микроделеционных и микродупликационных синдромов [Назаренко и др., 2017]. Согласно МКБ-10, термином «умственная отсталость» принято обозначать состояние задержанного или неполного умственного развития, которое характеризуется, прежде всего, снижением навыков, возникающих в процессе развития, и навыков, которые определяют общий уровень интеллекта (т.е. познавательных способностей, языка, моторики, социальной дееспособности). Распространенность УО в общей популяции составляет 1–3 % [Gao et al., 2018]. По данным литературы, более 800 генов участвуют в патогенезе синдромальных и несиндромальных форм интеллектуальных расстройств, в то время как по предварительным

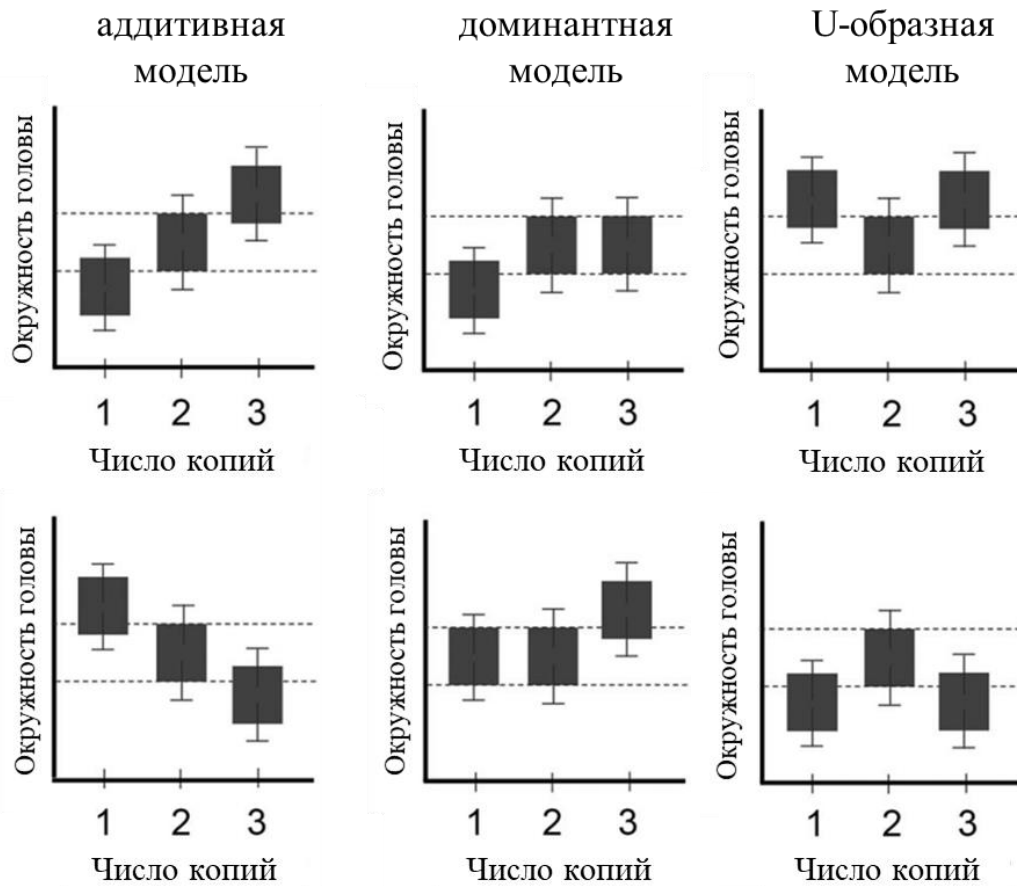


Рисунок 3 – Схематичное представление аддитивной, доминантной и U-образной моделей реализации фенотипических эффектов реципрокных CNV [Deshpande, Weiss, 2018].

оценкам в геноме таких генов может насчитываться около 2000 [Chiurazzi, Pirozzi, 2016]. Патогенетические варианты, возникающие *de novo*, рассматриваются в качестве основных причин развития тяжелых форм интеллектуальных нарушений [Coe et al., 2019].

Согласно «Диагностическому и статистическому руководству по психическим расстройствам» (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, Fifth Edition– DSM-5), УО проявляется в детском возрасте и характеризуется значительными ограничениями интеллектуального функционирования и адаптивного поведения [Kvarnung, Nordgren, 2017]. К интеллектуальному функционированию относятся общие умственные способности, как обучение, планирование, абстрактное мышление, принятие решений и др. Для объективной оценки данного критерия используют определение коэффициента интеллекта (IQ) по тесту Векслера: интеллектуальное функционирование ниже нормы в случае, если IQ менее или равно 70. Адаптивное поведение представляет собой набор концептуальных, социальных и практических навыков, необходимых человеку для выполнения повседневных действий, соответствующих его возрасту. Согласно МКБ-10, существует несколько степеней тяжести УО: легкая (F70), умеренная (F71), тяжелая (F72) и глубокая (F73). Тем не менее, на основании критериев DSM-5, тяжесть данного состояния определяется не значением

коэффициента интеллекта, отражающим нарушение интеллектуального функционирования, а именно нарушением адаптивного функционирования и уровнем помощи и поддержки, необходимой индивиду (Таблица 1) [Kvarnung, Nordgren, 2017].

Таблица 1 – Критерии оценки степени тяжести умственной отсталости

Степень тяжести	Коэффициент интеллекта (IQ score)	Уровень необходимой помощи
Легкая (85 %)	50–70	Человек может жить самостоятельно с минимальным уровнем поддержки
Умеренная (10 %)	35–49	Человеку необходима незначительная поддержка для ежедневного функционирования
Тяжелая (3–4 %)	20–34	Человеку требуется ежедневная помощь по уходу за собой и надзор за безопасностью
Глубокая (1–2 %)	< 20	Человек постоянно нуждается в помощи

Примечание: в скобках указан процент пациентов с данной формой УО от всех выявленных случаев

В большинстве случаев нарушения интеллектуального развития обусловлены влиянием генетических факторов. Показано, что в основе патогенеза УО лежат генные (40 %), числовые (11 %) и структурные хромосомные мутации (20 %), а в 30 % случаев причины УО остаются неизвестными или объясняются негенетическими факторами (ВПР ЦНС, внешние факторы воздействия в пренатальный период, перинатальные расстройства, постнатальные нарушения) [Kvarnung, Nordgren, 2017; Лавров и др., 2016]. aCGH, WES, WGS хорошо зарекомендовали себя как эффективные методы диагностики недифференцированных форм УО, обусловленных CNV, однако для валидации выявленных кандидатных генов крайне желательным является изучение их функционирования в клетках пациента и здорового индивида (в частности, в нейронах), что часто не представляется возможным [Vissers et al., 2015].

На сегодняшний день патогенез РАС, как и других заболеваний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития, остается не до конца изученным. По оценкам специалистов, 85 % случаев РАС относятся к идиопатическим [Al-Dewik, Alsharshani, 2020]. На генетическую природу РАС указывает неравномерное распределение частоты заболевания среди мужчин и женщин, высокая встречаемость заболевания среди сиблингов и монозиготных близнецов [Al-Dewik, Alsharshani, 2020]. CNV, обусловленные микроделециями, микродупликациями в регионах 1q21, 2q37, 3q29 7q11.23, 15q11–13,

16p11.2, 16p12.1, 16p13.1, 17p11.2, 17q12, 17q21.31, 22q11.2 и 22q13, ассоциированы с развитием РАС, при этом у 1–3 % пациентов чаще всего диагностируют унаследованную от матери микродупликацию участка хромосомы 15 (OMIM 608636) [Vicari et al., 2019]. Продукты многих генов, локализованных в данной хромосомной области, в частности *GABRA5* и *GABRB3* (ГАМК-рецепторы), *UBE3A* и *HERC2* (компоненты протеасомного комплекса), *SNRPN* (малый ядерный рибонуклеопротеин-ассоциированный белок N), а также *CYFIP1* (белок, взаимодействующий с FMR1) участвуют в функционировании ЦНС [Santrač et al., 2022]. Микроделеции другой хромосомной области 16p11.2, затрагивающие гены *ALDOA*, *DOC2A*, *HIRIP3*, *MAPK3*, *MAZ*, *PPP4C*, *SEZ6L2* и *TAOK2*, также рассматриваются в качестве этиологической причины развития РАС. Стоит отметить, что микродупликации в регионе 16p11.2 связаны с более широким клиническим проявлением патологического эффекта перестройки: у пациентов диагностируют пороки развития ЦНС, шизофрению и СДВГ [Rein, Yan, 2020]. Микроделеции, затрагивающие области 22q11 (*TBX1*) и 22q13.3 (*SHANK3*), также связаны с проявлением клинических признаков РАС [Flore et al., 2017; Li et al., 2021b].

CNV является одним из этиологических факторов развития СДВГ [Harich et al., 2020]. Микроструктурные перестройки, затрагивающие гены *PARK2* (6q26), *CHRNA7* (15q13.3), *NPY* (7p15.3), *GRM5* (11q14.2–q14.3), *GRM7* (3p26.1), *GRM8* (7q31.33), *COMT* (22q11.21), *HTR1B* (6q14.1), *DISC1* (1q42.2), *BCHE* (3q26.1), выявлены у пациентов с данной патологией [Grimm et al., 2018]. Отмечается высокая степень перекрытия CNV, ассоциированных с СДВГ, с хромосомными перестройками, выявленными у пациентов с РАС и шизофренией, подтверждая тем самым плеiotропный эффект данных хромосомных вариантов [Thapar, 2018].

По данным литературы, развитие эпилепсии у 50–70 % пациентов обусловлено генетическими причинами, в том числе микроструктурными абберациями хромосом (~13 %) [Corpora et al., 2019]. Рекуррентные микроделеции 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11 и 22q11.21 рассматриваются в качестве фактора риска развития генерализованной и фокальной эпилепсии [Pérez-Palma et al., 2017]. В исследованиях Corpora с соавторами CNV, затрагивающие гены *HNRNPU* (1q44), *RORB* (9p21.13), *NBEA* (13q13.1–q13.3), *SETBP1* (18q12.3), *STAG1* (3q22.3), *FGF12* (3q28–q29), *HCN2* (19p13.3), *FMN2* (1q43), *CHRM3* (1q43), *CSNK1G3* (5q23.2) и *NMT1* (17q21.31), выявлены у пациентов с эпилепсией и сопутствующими заболеваниями, в частности, интеллектуальными нарушениями, психическими расстройствами и другой неврологической симптоматикой [Corpora et al., 2019]. В работе Borlot с соавторами, при проведении микроматричного анализа у пациентов с эпилепсией были выявлены 8 нерекуррентных CNV в регионах 2p16.1–p15, 6p25.3–p25.1,

8p23.3p23.1, 9p24.3–p23, 10q11.22–q11.23, 12p13.33–13.2, 13q34 и 16p13.2, в которых локализованы гены, ассоциированные с развитием УО, РАС и эпилепсии [Borlot et al., 2017].

Исследования, направленные на изучение генетических причин развития шизофрении, показали наличие множества микроструктурных aberrаций хромосом у пациентов с психическими расстройствами, затрагивающих регионы 1q21.1, 2p16.3 (*NRXN1*), 3q29, 7q11.23, 15q13.3, 16p11.2 и 22q11.2 [Cheng et al., 2021]. Примечательно, что CNV в данных регионах также ассоциированы с развитием других состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития (УО, РАС, СДВГ, БАР), что указывает на пересечение затронутых перестройкой биологических процессов и молекулярных путей и, соответственно, общность патогенеза данных состояний [Reddaway et al., 2018]. Показано, что продукты локализованных в данных областях генов, участвуют в процессах синаптической передачи и пластичности, развития мозга и морфогенеза нейронов [Zhuo et al., 2017].

Благодаря введению в молекулярно-генетическую диагностику методов aCGH, WGS и WES, была показана вовлеченность CNV в патогенез ряда других состояний, связанных с нарушением нервно-психического развития. Так, микроделеции и микродупликации были выявлены у пациентов с БАР и большим депрессивным расстройством [Werling, 2019], синдромом Туретта [Qi et al., 2019], нарушением обучаемости [McDowell, 2018], коммуникативным расстройством [Kalnak et al., 2018], дислексией и дискалькулией [Ulfarsson et al., 2017], детским дезинтегративным расстройством [Gupta et al., 2017] и др.

1.1.4 Сложности в оценке фенотипических проявлений хромосомного дисбаланса

За последнее десятилетие генетические исследования существенно улучшили понимание причин развития интеллектуальных и психических нарушений. Однако до сих пор многие механизмы реализации патологического эффекта хромосомных мутаций остаются неизученными.

На протяжении всего времени изучения патогенеза хромосомных болезней возникала проблема установления четкой связи выявляемой при анализе хромосомной патологии и наблюдаемых клинических эффектов. Сложившаяся в медицинской генетике «традиция» трактовки проявлений хромосомной патологии как эффекта изменения дозы генов на определенной хромосоме не всегда адекватно отражает реальную ситуацию. Факт наличия причинно-следственной связи между фенотипом пациента и изменением числа или структуры хромосом не вызывает у генетиков сомнений, однако характер данной связи постоянно подвергается обсуждению [Гринберг, Кухаренко, 2013]. Многочисленные работы по изучению пациентов с хромосомными аномалиями, показали, что в большинстве случаев,

хромосомные синдромы сопровождаются неспецифическими проявлениями, которые могут встречаться как в случае моногенных заболеваний, действия тератогенных факторов, так и наблюдаться у здоровых людей. Так, еще в 1968 году, при проведении детального обследования 27 пациентов с синдромом Эдвардса и 27 пациентов с синдромом Патау, Taylor удалось показать, что среди 46 признаков общими у пациентов с трисомией по хромосомам 13 и 18 оказались 44, в их числе: задержка развития, судороги, лицевые дисморфии и др. [Taylor, 1968]. По мнению автора, трисомии по аутосомам приводят к сбою процессов нормального эмбриогенеза; степень перекрытия симптомов обоих синдромов достаточно высока, что, вероятно, может указывать на то, что нарушение внутриутробного развития при обеих патологиях происходит в определенный временной период.

Как и в случае анеуплоидий, изучение гено-фенотипических корреляций при микроструктурных перестройках хромосом у пациентов также осложняется наличием неспецифических клинических проявлений аберрации. Данные признаки зачастую не дают врачу-генетику четкого представления о типе хромосомной аномалии, но лишь позволяют заподозрить ее у обследуемого пациента и направить его на проведение микроматричного анализа с целью уточнения диагноза. В качестве примера можно привести выявление лицевых дисморфизмов, задержки интеллектуального развития, РАС, шизофрении, эпилепсии, СДВГ у пациентов с широким спектром микроструктурных перестроек: делециями и дупликациями хромосомных регионов 3q29, 7q11.23, 10q11.21–q11.23, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 17q12, 22q11.2 и др. [Watson et al., 2014]. В свою очередь, каждый из этих рекуррентных синдромов клинически гетерогенен и характеризуется большим числом фенотипических проявлений, экспрессивность которых может варьировать в широких пределах. Выдвигаются гипотезы о влиянии генетического окружения, факторов внешней среды и эпигенетических различий, однако причины такой широкой клинической гетерогенности до сих пор остаются недостаточно изученными [Watson et al., 2014].

В процессе изучения выявляемых микроделений и микродупликаций хромосом было установлено, что фенотипические проявления CNV зависят от нескольких важных факторов: размера перестройки, количества вовлеченных в нее генов и ее происхождения, т.е. является ли CNV унаследованной от одного из родителей, или она возникла *de novo*. Изменение копийности дозозависимого гена внутри аберрации может приводить к реализации патологического фенотипа через увеличение или уменьшение количества его белкового продукта. Наличие нескольких дозозависимых генов в регионе перестройки в случае смежных генных синдромов, может привести к формированию более сложной клинической картины [Кашеварова и др., 2014]. Помимо изменения дозы гена, другими вероятными причинами формирования клинической картины синдромов реципрокных микроделений и

микродупликаций являются нарушения в регуляторных областях генома (нарушение последовательности энхансера, перемещение его в другую область генома, что приводит к усилению экспрессии других генов), образование химерных генов, демаскирование рецессивных мутаций или SNP на интактном гомологе в случае микроделеций, а также рецессивных мутаций в аллеле с нормальной копийностью в случае снижения активности гена на дуплицированном гомологе [Kloosterman, Hochstenbach, 2014]. Так, было показано, что в ряде случаев реципрокные хромосомные перестройки являются причиной не только зеркальных, но также и идентичных, перекрывающихся и уникальных фенотипов у носителей хромосомной аберрации [Кашеварова и др., 2014]. Данный факт дает основание предположить, что хромосомные мутации затрагивают одинаковые молекулярные пути, в которых участвуют продукты генов из региона перестройки.

Частота возникновения редких CNV осложняет установление гено-фенотипических корреляций при конкретном хромосомном синдроме. Изолированные хромосомные аберрации достаточно редко диагностируют, что значительно затрудняет проведение ассоциативных исследований и адекватного статистического анализа их клинических эффектов [Huguet et al., 2018]. С другой стороны, большое число CNV, присутствующее в геноме здорового человека, приводит к сложности оценки патогенетической значимости хромосомных мутаций, выявлении кандидатных генов заболеваний, прогноза наследования аберраций и повышению риска возникновения различных CNV-ассоциированных заболеваний в потомстве носителей полиморфных вариантов [Скрябин и др., 2017].

Одной из особенностей микроделеционных и микродупликационных синдромов является клиническая картина данных заболеваний, которая, в отличие от большинства классических хромосомных болезней, зачастую характеризуется неполной пенетрантностью [Nowakowska, 2017]. Нередкими являются случаи фенотипического проявления микроструктурной перестройки у ребенка при ее наследовании от условно здорового родителя. Пенетрантность хромосомной перестройки может зависеть от ее размера, дозы гена, локализации в геноме, специфичности мутации, дифференциальной аллельной экспрессии, дигенного и олигогенного наследования, модулирующих эффектов дополнительных CNV, возраста, пола, влияния генов-модификаторов, импринтинга или других эпигенетических модификаций и факторов окружающей среды [Egloff et al., 2018]. Одной из основных гипотез проявления патологического действия мутации в следующих поколениях является «двухударная» гипотеза («two-hit» hypothesis), согласно которой микроструктурная аберрация сама по себе не приводит к развитию болезни, а реализация патологического фенотипа происходит лишь при наличии в геноме дополнительной структурной перестройки, точковой мутации или полиморфного варианта [Gardner, Amor,

2018]. Другим возможным механизмом реализации неполной пенетрантности CNV-ассоциированных состояний является дифференциальное метилирование ДНК в регионах с унаследованными абберациями [Vasilyev et al., 2021; Скрыбин и др., 2017].

В своих ранее проведенных исследованиях, направленных на изучение реализации фенотипического эффекта хромосомных аномалий у человека, К.Н. Гринберг и В.И. Кухаренко выдвинули предположение, что наблюдаемые при хромосомных мутациях фенотипические проявления есть результат не изменения, а замедления развития структур организма, возникающего вследствие нарушения основных клеточных функций [Гринберг, Кухаренко, 2013]. Было показано, что при разнообразных хромосомных аномалиях наблюдаются сходные изменения на клеточном уровне организации: нарушение морфологии клеток с анеуплоидиями, отсутствие способности организовывать клеточный слой, нарушение процессов пролиферации, миграции, специфической рецепции и синтеза компонентов межклеточного матрикса. Основываясь на сходных цитохимических изменениях, наблюдаемых в культурах клеток с абберантным набором хромосом, ученые выдвинули предположение о «клеточном синдроме» у носителей хромосомных перестроек. Основным звеном патогенеза хромосомного дисбаланса, по мнению авторов, является замедление созревания клеточных и тканевых структур, сходно проявляющееся у носителей разного типа перестроек недоразвитием или «запаздыванием формообразования» органа [Гринберг, Кухаренко, 2013].

1.2 Молекулы межклеточной адгезии: классификация, структура и функции

Развитие центральной нервной системы зависит от ряда скоординированных морфорегуляторных процессов, таких как нейральная индукция, пролиферация и дифференцировка клеток, клеточная миграция и установление паттерна нейрональных связей [Rahimi-Balaei et al., 2018]. В глиальных клетках нервной системы взрослого человека, а также в некоторых областях мозга происходит непрерывная генерация нейронов с их последующей интеграцией в уже сформированные нервные ткани. Изменения происходят и в нервной ткани взрослого организма: так, зрелые нейроны способны изменять свои синаптические связи и эффективность синаптической передачи, т.е. обладают пластичностью, необходимой для процессов памяти и обучения [Leshchyns'ka, Sytnyk, 2016]. Ключевым шагом во всех этих процессах является способность нервных клеток и их отростков (дендритов и аксонов) взаимодействовать с другими клетками и внеклеточным матриксом [Rigby et al., 2020]. Многие из этих взаимодействий опосредованы различными трансмембранными интегральными белками – молекулами клеточной адгезии (CAMs) [de Agustín-Durán et al., 2021]. Процессы распознавания, адгезии, миграции и дифференцировки

клеток, опосредованные CAMs, имеют важное значение для нормального развития органов и тканей в течение эмбрионального развития [Zhong et al., 2015]. Нарушение слаженной работы молекул данного типа может приводить к нарушению процессов нейрогенеза, и, как следствие, активации патогенетических механизмов, приводящих к развитию заболеваний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития.

В ЦНС экспрессируется множество CAMs, относящихся к основным суперсемействам кадгеринов, интегринов, селектинов, нейрексинов/нейролигинов и иммуноглобулинов (IgSF CAMs) и участвующих в процессах ветвления и роста нейритов, аксональном наведении, миелинизации, формировании нейронной сети, регуляции формирования синаптических контактов и поддержания синаптической пластичности в процессах обучения, формирования памяти и клеточной регенерации [Tan et al., 2017]. Ряд молекул, принадлежащих к группе кадгеринов, протокадгеринов, иммуноглобулин-подобных молекул, нейрексинов и нейролигинов, эфринов и взаимодействующих с ними Eph-рецепторов, а также белков, содержащих богатые лейцином повторы (Leucine Rich Repeat, LRR), относится к функциональной группе синаптических CAMs, принимающих активное участие в формировании и функционировании синапсов [Südhof, 2021].

Характерной структурной особенностью молекул самой большой и наиболее изученной группы IgSF CAMs является наличие, по меньшей мере, одного иммуноглобулин-подобного домена во внеклеточной области. Представители группы молекул IgSF участвуют не только в процессах формирования контактов между нервными клетками, но также опосредуют взаимодействие нейронов и других клеток в ЦНС [Tan et al., 2017]. В то время как типичные IgSF CAMs являются трансмембранными молекулами, обладая внутриклеточным доменом для трансдукции сигнала (NCAM1, L1, CHL1, MCAM, ALCAM), ряд представителей не обладает трансмембранным и внутриклеточным доменами, а закрепление на цитоплазматической мембране происходит с помощью молекулы гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якорь). К подгруппе ГФИ-ассоциированных белков относятся молекулы NEGR1, OBCAM, Ntm, LAMP, IgLON5, CNTN1-1,-2,-3,-4,-5,-6, Thy-1, CEACAM-5,-6,-7,-8 и др. [Tan et al., 2017]. Несмотря на отсутствие внутриклеточного домена, функция молекул IgSF CAMs не ограничивается лишь клеточной адгезией: они могут участвовать в трансдукции сигнала, выступать в качестве лигандов и регуляторов образования синапсов и синаптической пластичности, вступать в контакт с внутриклеточными ферментами и элементами цитоскелета [Tan et al., 2017].

Выявление большого числа генных и структурных мутаций, затрагивающих гены суперсемейств CAMs, доказывает значение молекул данных классов для развития и функционирования ЦНС. Так, показано, что многие гены, ассоциированные с развитием

РАС, вовлечены в процессы синаптогенеза (гены семейств *NRXN*, *NLGN*, *CNTN*, *CNTNAP*, *CDH*, *ITG*, *ROBO* и др.) [Tejada et al., 2019]. Молекулы нейрексинов вовлечены в процессы формирования и поддержания нейронных сетей посредством образования контактов со множеством лигандов на пре- и постсинаптической мембране, в свою очередь взаимодействующих с вне- и внутриклеточными сигнальными молекулами, создавая тем самым динамическую молекулярную сеть [Südhof, 2017]. Показано, что гетерозиготные делеции, затрагивающие гены нейрексинов, в частности *NRXN1*, ассоциированы с развитием шизофрении, УО, РАС, СДВГ, БАР, эпилепсии и врожденных пороков развития [Al Shehhi et al., 2019]. Мутации в генах семейства кадгеринов связаны с нарушением нервно-психического развития, в частности УО, РАС, БАР, шизофренией и эпилепсией [Taylor et al., 2020].

Определенные генетические варианты, выявленные в генах, кодирующих IgSF CAMs, в частности *NEGR1*, *LAMP*, *OVCAM*, ассоциированы с развитием РАС, СДВГ, БАР, шизофрении и дислексии [Zhong et al., 2015]. Мутации генах группы NCAM и L1 связаны с развитием психических расстройств и нейродегенеративных заболеваний. Так перестройки, затрагивающие X-сцепленный ген *L1CAM*, приводят к развитию синдрома L1, для которого характерны интеллектуальные нарушения, гидроцефалия, агенезия мозолистого тела и болезнь Гиршпрунга [Sytnyk et al., 2017]. Миссенс-мутации и CNV, затрагивающие ген *CHL1*, ассоциированы с развитием РАС, шизофрении и интеллектуальных нарушений [Shoukier et al., 2013; Tsuboyama, Iqbal, 2021]. SNP в гене *NRCAM* ассоциированы с развитием алкогольной зависимости, шизофрении и РАС [Marui et al., 2009]. Полиморфные варианты гена *NCAM1* рассматриваются в качестве фактора риска развития БАР и шизофрении [Zhang et al., 2014]. Для пациентов с психическими расстройствами было также показано изменение паттерна экспрессии генов, кодирующих белки подгруппы NCAM и L1 [Sytnyk et al., 2017].

Способность нервных клеток к образованию синаптических контактов лежит в основе реализации простых рефлексов и когнитивных функций [Baye's, Grant, 2016]. Мутации в генах, кодирующих синаптические белки, приводят к развитию синаптопатий, проявляющихся интеллектуальными, психическими и поведенческими нарушениями. Исследования показывают, что в постсинаптических сигнальных комплексах, связанных с молекулами мембраноассоциированной гуанилаткиназы (MASC), экспрессируется 145 генов, ассоциированных с развитием 197 патологических состояний, затрагивающих ЦНС. Данные заболевания можно отнести к 4 основным группам: а) болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ; б) психические и поведенческие расстройства; в) болезни нервной системы; г) врожденные пороки развития, деформации, хромосомные аномалии [Baye's, Grant, 2016]. Так, показано, что MASC обогащены

продуктами генов, вовлеченных в патогенез УО, РАС, шизофрении, БАР, ОКР, депрессии и др. [Baye's, Grant, 2016]. Taylor с соавторами предполагают, что патогенетические эффекты мутаций, затрагивающих группу экспрессирующихся в синапсах CAMs, связаны с реализацией одного из следующих механизмов: изменение специфичности синапса в процессе формирования, нарушение созревания синапса и/или синаптического прунинга – удаления избыточных связей из нейросети и повышения эффективности ее работы за счет сокращения числа нейронов или нейрональных отростков [Taylor et al., 2020].

В последнее время появляется больше данных, подтверждающих гипотезу об общности этиологии состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития. Так, большое разнообразие ассоциированных с УО генов и сходный фенотип пациентов (снижение интеллекта) могут быть объяснены вовлечением продуктов данных генов в общие молекулярные сети белковых взаимодействий [van Bokhoven, 2011]. Очевидным становится тот факт, что нарушение работы определенных компонентов данной сети будет проявляться сходными фенотипическими проявлениями. Ряд общих молекулярных и клеточных процессов, в частности нейрогенез, нейрональная миграция, синаптическая трансдукция, эпигенетическая регуляция транскрипции и трансляции нейрональных белков, может быть нарушен у пациентов с УО [Chelly et al., 2006]. Показано, что продукты генов, мутации в которых ассоциированы с различными формами интеллектуальных нарушений, участвуют в процессах высвобождения нейротрансмиттеров и вторичных мессенджеров, генерации потенциала действия, реорганизации компонентов цитоскелета и активации сигнального каскада внутри клетки [van Bokhoven, 2011].

В ходе проводимого в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ обследования детей с интеллектуальными нарушениями, нами были выявлены 3 пациента (два сибса с делецией и один пациент с дупликацией) с уникальными реципрокными хромосомными мутациями в регионе 3p26.3, затрагивающими единственный ген *CNTN6*. Данный ген кодирует нейрональную молекулу межклеточной адгезии, экспрессируется преимущественно в ЦНС и играет важную роль в процессах нейрогенеза [Kashevarova et al., 2014]. Помимо нарушения нервно-психического развития (УО, РАС, эпилепсия), у данных пациентов были отмечены скелетные аномалии, изменение формы черепа, низкорослость, кардиологические нарушения, лицевые дисморфизмы, аномалии ушной раковины, нарушение структуры и роста волос, аномалии пальцев верхних и нижних конечностей, что тяжело поддается объяснению изменением копийности гена, функционирующего преимущественно в головном мозге [Kashevarova et al., 2014]. Вышеописанные факты могут указывать на вовлеченность продукта гена из региона CNV в несколько биологических процессов и сетей белок-белковых взаимодействий.

1.3 Подгруппа молекул контактинов

Контактыны принадлежит к иммуноглобулиновому суперсемейству молекул клеточной адгезии (IgSF CAMs), экспрессирующихся преимущественно в ЦНС и играющих важную роль в процессах роста и развития нейронов, клеточной выживаемости, ветвления нейритов, аксонального наведения и формирования синаптических контактов [Gennarini et al., 2017]. Подгруппа включает 6 членов: контактин 1 (F3, GP135), контактин 2 (TAG-1, TAX1), контактин 3 (BIG-1), контактин 4 (BIG-2), контактин 5 (NB-2, hNB-2) и контактин 6 (NB-3) [Chatterjee et al., 2019]. CNTN6, наряду с другими представителями подгруппы контактинов, содержит в своей структуре 6 иммуноглобулин-подобных и 4 фибронектин-III-подобных домена, закрепленных в мембране с помощью молекулы гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ), при этом внутриклеточный домен отсутствует [Shimoda, Watanabe, 2009] (Рисунок 4).

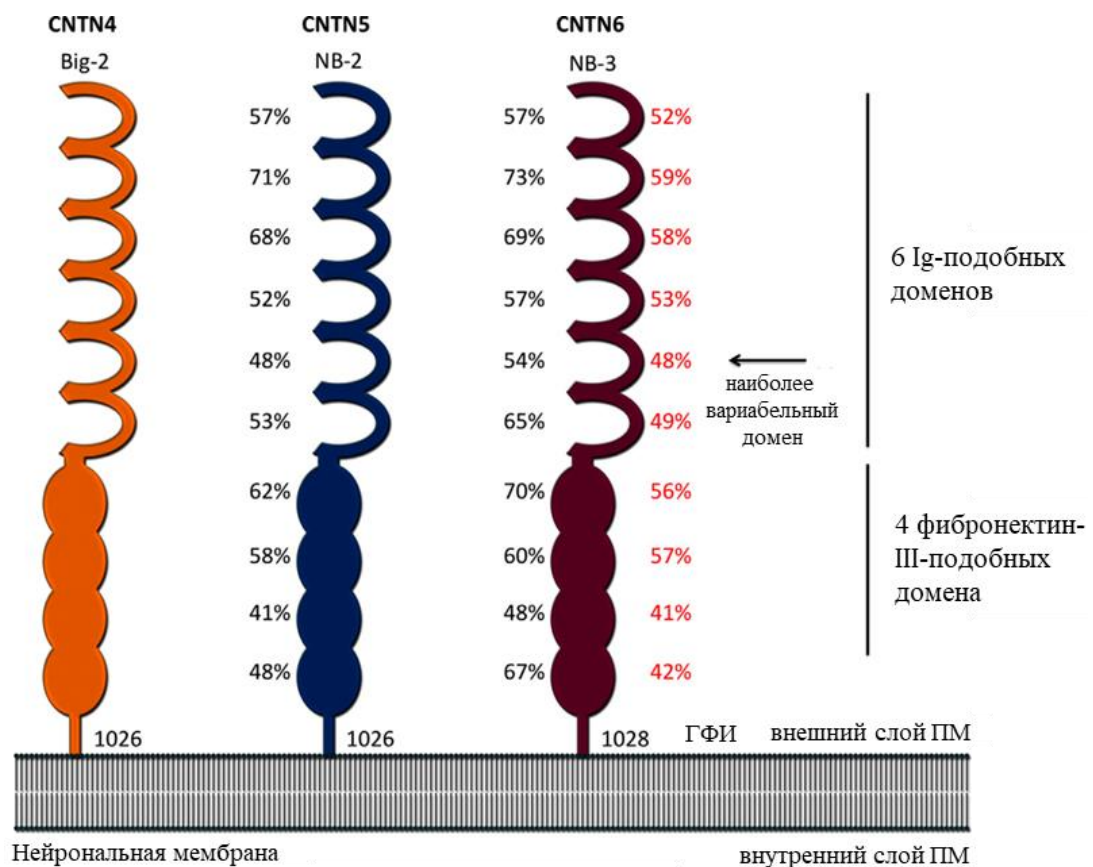


Рисунок 4 – Структура молекул CNTN4, CNTN5, CNTN6 [Zuko et al., 2013]. «ПМ» - плазматическая мембрана.

Исследования выявили 40–60 %-ную гомологию аминокислотной последовательности среди молекул контактинов, при этом 4-й и 5-й иммуноглобулиновые повторы оказались наиболее дивергентны по своей структуре [Zuko et al., 2011]. Важной молекулярной особенностью представителей данной группы является U-образная конформация 4-х

терминальных N-концевых иммуноглобулин-подобных повторов, при этом 2-й и 3-й повторы необходимы для создания активного центра связывания в этой структуре. Данный мотив облегчает взаимодействие с некоторыми известными молекулярными партнерами, в частности, рецепторными протеин-тирозинфосфатазами (RPTG/Z) [Bouyain, Watkins, 2010].

В противоположность иммуноглобулин-подобным повторам, недостаточно известно о фибронектин-III-подобных доменах и их биологической роли для функционирования молекулы контактина [Zuko et al., 2011]. Предполагают, что фибронектиновые домены могут вносить вклад в процессы организации и кластеризации контактина на клеточной поверхности. На вероятную организацию молекул CNTN6 на поверхности цитоплазматической мембраны может указывать наличие в их структуре ГФИ. Так, было высказано предположение о локализации CNTN6 в липидных рафтах (участках цитоплазматической мембраны, обогащенных гликофинголипидами, холестерином и молекулами рецепторов), поскольку ГФИ-заякоренные рецепторы часто встречаются в подобных областях клеточной мембраны [Zuko et al., 2011].

Для молекул группы контактинов, в частности CNTN6, была показана высокая экспрессия в структурах ЦНС. Исследования Lee с коллегами (2000) показали, что ген *Cntn6* преимущественно экспрессируется в развивающейся нервной системе в добавочной обонятельной луковице, II/III и V слоях коры головного мозга, пириформной коре, передних ядрах таламуса, нижних холмиках четверохолмия, мезенцефалическом ядре тройничного нерва, а также клетках Пуркинье мозжечка мыши [Lee et al., 2000]. Работы Zuko с соавторами показали, что *Cntn6* играет важную роль в процессах развития структур гиппокампа, а дефицит данной молекулы приводит к снижению количества проекционных нейронов и интернейронов в зрительной коре и уменьшению мшистых волокон в гиппокампе [Zuko et al., 2016].

Данные о снижении экспрессии гена *Cntn6* в головном мозге на 7 день после рождения и усилении экспрессии в клетках мозжечка до достижения особью половозрелого возраста, дали основания выдвинуть гипотезу об участии *Cntn6* в мозжечковом контроле двигательной активности в зрелом возрасте, что было подтверждено в экспериментах на NB-3-дефицитных мышах с нарушением моторной координации [Takeda et al., 2003]. В экспериментах Mu с соавторами было показано, что у *Cntn6*-дефицитных мышей нарушены процессы пространственного обучения и памяти, что влияет на аллоцентрическую навигацию у данных животных [Mu et al., 2018].

Исследования Sakurai с коллегами позволили получить ценную информацию о роли молекулы *Cntn6* в процессах синаптогенеза. Было показано, что молекулы контактина 6 экспрессируются в гранулярных клетках мозжечка мыши, а именно на пресинаптической

мембране глутаматергических синапсов между параллельными волокнами и клетками Пуркинье. В свою очередь дефицит NB-3 влияет на формирование синапсов в течение постнатального развития мозжечка, приводя к значительному снижению плотности синаптических контактов [Sakurai et al., 2009]. Более позднее исследование, проведенное той же группой ученых, выявило связь между уровнем экспрессии NB-3 и образованием возбуждающих глутаматергических синапсов в гиппокампе. Так, области экспрессии контактина 6 частично перекрывались с областями экспрессии везикулярных транспортеров глутамата 1 (VGLUT1) и 2 (VGLUT2), являющихся пресинаптическими маркерами возбуждающих синапсов, но не везикулярного транспортера ГАМК (VGAT), пресинаптического маркера ингибирующих синапсов. Следовательно, NB-3 может играть ключевую роль в образовании глутаматергических, но не ГАМК-ергических, синапсов в течение постнатального развития гиппокампа [Sakurai et al., 2010].

В экспериментах, проведенных Mercati с коллегами, было установлено, что Cntn6 увеличивает длину аксона и количество аксональных сегментов, в то время как контактин 5 влияет на количество нейрональных отростков и усиливает их ветвление. Было показано, что связанные с клеточной поверхностью и растворимые рекомбинантные молекулы контактина 6 оказывают стимулирующее влияние на развитие нейронов коры [Mercati et al., 2013]. Huang с коллегами (2012) в опытах на мышах показали, что NB-3 экспрессируется в глубоких слоях моторной коры, аксонах кортикоспинального тракта, сером веществе спинного мозга [Huang et al., 2012]. В дополнение к аксональному росту и формированию синапсов, NB-3 также участвует в правильном росте и терминальном ветвлении аксонов в развивающемся тракте. NB-3–NB-3 взаимодействия могут опосредовать формирование синапсов между нервными окончаниями кортикоспинального тракта и интернейронами дорзальной и промежуточной зон серого вещества спинного мозга [Huang et al., 2012].

1.3.1 Молекулярные механизмы реализации действия молекулы CNTN6

Несмотря на тот факт, что изучение данного суперсемейства иммуноглобулин-подобных молекул межклеточной адгезии продолжается уже давно, на сегодняшний день отмечается недостаток сведений о молекулярных механизмах действия молекулы CNTN6 [Oguro-Ando et al., 2017]. Поскольку в молекуле CNTN6 отсутствует трансмембранный и внутриклеточный домен, для трансдукции сигнала она нуждается во взаимодействии с молекулярными партнерами. Таким образом, контактины могут действовать в качестве ко-рецептора с цис-взаимодействующим молекулярным партнером, или в роли лиганда, взаимодействуя в транс-положении с трансмембранным рецептором. Кроме того, также возможны взаимодействия с растворимыми лигандами [Zuko et al., 2013] (Рисунок 5).

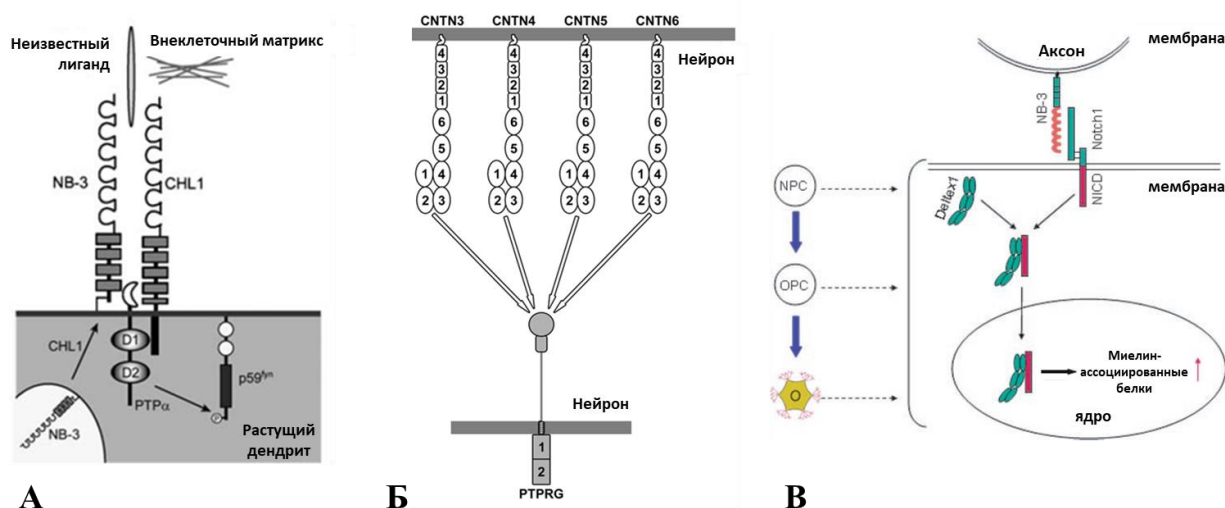


Рисунок 5 – Молекулярные партнеры молекулы CNTN6: CHL1 и протеин-тирозинфосфатаза α (А), рецепторная протеин-тирозинфосфатаза γ (Б), молекула NOTCH1 (В) [Bouyain, Watkins, 2010; Cui et al., 2004; Ye et al., 2008]

Показано, что контактин 6 (NB-3), непосредственно ассоциируясь с адгезивной молекулой CHL1 при цис-взаимодействии, регулирует ориентацию апикальных дендритов пирамидных нейронов зрительной коры головного мозга. Но при этом NB-3 и CHL1 не функционируют в качестве лиганда и рецептора, не индуцируют кластеризацию эндогенных NB-3 и CHL1 на поверхности нейрона, и микросферы с иммобилизованными молекулами NB-3, не связываются с мембраной CHL1-экспрессирующих клеток [Ye et al., 2008]. Предполагают, что молекулой, опосредующей трансдукцию сигнала внутрь нейрона, может служить протеин-тирозинфосфатаза α (PTP α), влияющая на дефосфорилирование и активацию внутриклеточной протеин-киназы p59fyn [Ye et al., 2008]. PTP α , экспрессирующаяся в глубоких слоях развивающегося неокортекса и гиппокампа, необходима для кластеризации молекул CHL1 и NB-3 на поверхности нервных клеток. PTP α усиливает экспрессию контактина-6 на поверхности развивающихся нейронов, облегчая высвобождение молекул NB-3 из аппарата Гольджи в процессе синтеза, а также стабилизируя NB-3 на мембране клетки [Ye et al., 2011].

Контактин 6, наряду с контактином 1, может выступать в качестве неканонического функционального лиганда Notch1-рецептора [Hu et al., 2006]. Notch1 – важный рецептор сигнальной трансдукции, регулирующий выбор путей дифференцировки различных клеток в развитии многоклеточных организмов. Он представляет собой высококонсервативный белок, включающий протяженный внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены. Активация Notch-сигнального пути молекулами NB-3 приводит к освобождению внутриклеточного домена (NICD) с помощью регулируемого внутримембранного протеолиза γ -секретазным комплексом и запускает Notch/DLX1 сигнальный путь, способствуя

олигодендроглиогенезу нейрональных клеток-предшественниц и созреванию олигодендроцитов [Cui et al., 2004]. В юных олигодендроцитах NB-3 стимулирует процессы транскрипции миелин-ассоциированного гликопротеина, тем самым, влияя на процессы миелинизации нейронов. Было показано, что NB-3/Notch1 взаимодействия определяются как в разных структурах мозга (полосатое тело, гиппокамп, мозжечок, ствол мозга и спинной мозг), так и на разных этапах индивидуального развития (эмбриональный и постнатальный периоды) [Cui et al., 2004].

Notch-рецептор опосредует многие сигнальные пути в зависимости от взаимодействующего с ним лиганда, что приводит к различным молекулярным и клеточным эффектам. Так, активация Notch-рецептора каноническим лигандом Delta ингибирует дифференцировку клеток-реципиентов сигнала в нейроны. В свою очередь, Jagged1/Notch/Hes5 сигнальный путь предотвращает дифференцировку клеток-предшественниц в олигодендроциты и их дальнейшую миелинизацию [Hu et al., 2006]. Возможно, F3 и NB-3/Notch1 сигнальные пути противодействуют Jagged1/Notch сигнальному пути. Таким образом, существует некий баланс между Jagged1/Notch, F3 и NB-3/Notch сигнальными каскадами для обеспечения правильной временной дифференцировки клеток-предшественниц олигодендроцитов. Предположение о доминирующей роли именно NB-3/Notch сигнального пути в регуляции процессов клеточной дифференцировки на ранних этапах развития не исключает возможности согласованного функционирования F3 и NB-3/Notch сигнальных путей [Hu et al., 2006].

В 2010 году Bouyain и Watkins представили молекулу рецепторной протеин-тирозинфосфатазы γ (PTPRG), экспрессирующейся исключительно в нервной системе, в качестве вероятного лиганда для контактина 6 [Bouyain, Watkins, 2010]. В отличие от других представителей суперсемейства молекул межклеточной адгезии IgCAMs (L1/NgCAM, NCAM, NrCAM), связывающихся со спейсерной областью PTPRG, контактины взаимодействуют с карбоангидразным доменом (PTPRG^{CA}), образующим особую петлевую структуру – β -шпильку. Схожие нарушения координации движений у мышей с дефицитом PTPRG и контактина 6 и перекрывание времени и регионов экспрессии в коре головного мозга и гиппокампе дали основания предположить, что взаимодействие молекул необходимо для развития и координации соответствующих двигательных функций [Bouyain, Watkins, 2010].

Открытым остается вопрос о механизме сигнальной трансдукции и контроле фосфатазной активности при связывании контактина 6 и PTPRG. Димеризация мономерных молекул RPTPs на поверхности клетки приводит к их инактивации, но исследования показали, что контактины не стимулируют данный процесс [Bouyain, Watkins, 2010].

Возможно, связывание молекул контактинов может удерживать RPTPs в определенном регионе клеточной мембраны, тем самым контролируя локализацию процессов дефосфорилирования [Boeyain, Watkins, 2010].

В исследованиях Zuko на мышах было показано, что *Cntn6* в качестве эндогенного лиганда напрямую связывается в цис-положении с молекулой латрофилина (*Lphn1*), относящейся к классу серпентинов, и ингибирует процессы апоптоза [Zuko et al., 2016]. Важно отметить, что многие патологические состояния, отмеченные у пациентов с мутациями в гене *CNTN6* и их родственников, а именно РАС [Wei et al., 2014], СДВГ [Valbonesi et al., 2015], шизофрения [Jarskog et al., 2005], депрессия [Gibon et al., 2016], агрессивность [Ichibaeva et al., 2016], тревожность [Lehner et al., 2015] и БАР [Berk et al., 2017], могут быть связаны с усилением апоптоза в нейронах.

1.3.2 Клинические эффекты мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*

В различных исследованиях была показана роль молекул семейства контактинов в физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в ЦНС. Так, выявлена ассоциация мутаций, затрагивающих ген *CNTN1*, с развитием нервно-мышечных заболеваний, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии и спинальной мышечной атрофии [Tang et al., 2020]. Полиморфные варианты гена *CNTN1* диагностированы у пациентов с деменцией с тельцами Леви [Sanghvi et al., 2020]. Ген *CNTN2* ассоциирован с развитием рассеянного склероза и приобретенного демиелинизирующего синдрома [Singh et al., 2015]. Делеции одного нуклеотида в гене *CNTN2* (с.503_503delG; p.Trp168fs) связаны с развитием эпилепсии, миоклонального тремора и интеллектуальных нарушений [Stogmann et al., 2013]. Мутации в гене *CNTN3* ассоциированы с развитием РАС и болезни Альцгеймера [Morrow et al., 2008]. *CNTN4* рассматривается в качестве кандидатного гена развития РАС, шизофрении и спиноцеребеллярной атаксии [Zuko et al., 2013]. Микроструктурные перестройки, затрагивающие ген *CNTN5*, выявлены у пациентов с РАС [Van Daalen et al., 2011].

Изучение функции гена *CNTN6* не ограничено лишь экспериментальными работами на модельных организмах. В последние годы в литературе появляется все больше информации о пациентах с мутациями, затрагивающими как единственный ген *CNTN6*, так и локализованные рядом с ним гены *CHL1* и *CNTN4*, при этом значительное количество нозологических форм, диагностированных у данных пациентов, относится к заболеваниям, характеризующимся задержкой нервно-психического развития.

В работах Wang с соавторами, направленных на поиск генетических ассоциаций и редких микроструктурных перестроек ДНК (CNV) в группе 3733 здоровых индивидов и 1033

пациентов с нервной анорексией, состоянием, характеризующимся расстройством пищевого поведения, было показано, что в ряде случаев у пациентов были выявлены aberrации (делеция и дупликация), приводящие к нарушению последовательности генов *CNTN6* и *CNTN4* [Wang et al., 2011]. Примечательно, что в исследовании Nakabayashi с соавторами была показана значимая ассоциация гена *CNTN5* с развитием нервной анорексии [Nakabayashi et al., 2009], что может указывать на возможную связь нарушения функционирования молекул группы контактинов и возникновения данного психического расстройства.

В ряде работ была показана потенциальная связь aberrаций, затрагивающих ген *CNTN6*, с развитием БАП [Hu et al., 2015]. В исследованиях по полногеномному поиску ассоциаций в группе пациентов с БАП и здоровых индивидов (1000 и 1034 индивида, соответственно), проведенных Kerner с соавторами, было показано, что генетический вариант rs2727943, локализованный в регионе 3p26.3 между генами *CNTN6* и *CNTN4*, ассоциирован с развитием БАП, сопровождаемого алкогольной аддикцией [Kerner et al., 2011]. В 2015 году было проведено ретроспективное исследование, направленное на поиск вариаций числа копий *CNTN6* среди 3724 пациентов с множественными врожденными пороками развития, пороками сердца, низкорослостью, задержкой развития и интеллектуальными расстройствами, а также РАС и эпилептиформными приступами [Hu et al., 2015]. Всего было идентифицировано 14 CNV, затрагивающих *CNTN6*, у детей в возрасте от 1 года до 15 лет. Семь пациентов имели либо полную, либо внутригенную делецию *CNTN6*. У 5 пациентов была диагностирована внутригенная дупликация *CNTN6*. Еще 2 пациента имели дупликацию колокализированных генов *CHL1/CNTN6* и *CHL1/CNTN6/CNTN4*, соответственно. Среди патологических состояний, выявленных у пациентов, были задержка развития, интеллектуальные нарушения, БАП, СДВГ, РАС, судороги, мигрень, ОКР, расстройства социального поведения, агрессивное поведение и истерические припадки. Для 4 пациентов из 14 были получены данные, подтверждающие наследование моногенной CNV от одного из родителей. Анализ историй болезни позволил получить данные о семейных случаях психоневрологических нарушений. Так, у родственников пробандов были диагностированы такие состояния, как интеллектуальные нарушения, шизофрения, РАС, БАП, депрессия, тревожность, трудности в обучении, судороги, нарушение слуха, мигрень и алкогольная аддикция [Hu et al., 2015].

В настоящее время опубликовано большое число работ, результаты которых указывают на ассоциацию генетических вариантов, затрагивающих ген *CNTN6*, с развитием РАС. Данные состояния характеризуются нарушением способности начинать и поддерживать социальное взаимодействие, способностью коммуницировать, а также часто

повторяющимися стереотипными поведенческими действиями. Проведенное в 2011 г. исследование van Daalen с соавторами, направленное на изучение генетических причин развития РАС, выявило 2 микроструктурных перестройки: делецию материнского происхождения, затрагивающую гены *CHL1* и *CNTN6*, и дупликацию *CNTN6*, возникшую *de novo* [Van Daalen et al., 2011]. Авторы сделали предположение о том, что микродупликация *CNTN6*, возникшая *de novo*, может рассматриваться в качестве самостоятельной причины развития РАС, в то же время унаследованная от матери микроделеция, затрагивающая гены *CHL1* и *CNTN6*, вероятно, способствует патологическому проявлению другой мутации, скрытой в геноме [Van Daalen et al., 2011]. Микродупликация в регионе 3p26.3, затрагивающая гены *CHL1* и *CNTN6*, также была описана у пациента с задержкой психомоторного и речевого развития и признаками РАС [Te Weehi et al., 2014]. В работе Guo с соавторами представлены результаты исследований двух пациентов с РАС: так, у обоих детей были выявлены протяженные микродупликации, затрагивающие ген *CNTN4* (1,6 м.п.н. и 2,4 м.п.н.), а также дополнительная микродупликация у одного из пациентов, нарушающая последовательность гена *CNTN6* [Guo et al., 2012]. В экспериментах Chuang с соавторами было показано, что экспрессия *CNTN6*, вероятно, регулируется молекулой транскрипционного фактора T-Brain (TBR1), являющегося кандидатным геном развития РАС: экспрессия *Cntn6* в модельной системе *Tbr*^{-/-} оказалась повышена [Chuang et al., 2015].

В наших исследованиях были описаны первые случаи обнаружения четырех пациентов с идиопатическими формами интеллектуальных нарушений и реципрокными микроделециями и микродупликациями, затрагивающими единственный ген *CNTN6* [Kashevarova et al., 2014]. Анализ родительского происхождения показал, что микродупликация *CNTN6* была унаследована ребенком от условно здорового отца и бабушки. Наряду с интеллектуальными нарушениями, у пациентов были описаны такие состояния, как атипичный аутизм, задержка развития, дизартрия, дислексия и дисграфия, СДВГ, нарушение поведения с приступами агрессии и истерии [Kashevarova et al., 2014].

В работе Mercati с коллегами была показана связь мутаций в гене *CNTN6* с нарушением слухового восприятия у пациентов с РАС [Mercati et al., 2017]. Исследование пациентов с РАС позволило выявить 6 случаев микроделений, затрагивающих ген *CNTN6* (6/1534), и 18 редких генетических вариантов (18/501), которые встречались статистически значимо чаще в группе пациентов, чем в контрольной выборке (1/8936 делеций, $p=0,00006$ и 535/33480 генетических вариантов, $p=0,0005$, соответственно). При анализе родительского происхождения было показано, что две микроделеции из шести были унаследованы детьми от отцов с РАС, одна нонсенс-мутация была унаследована сыновьями от матери и одна точковая мутация возникла *de novo*. Анализ клинической картины показал, что для многих

пациентов с мутациями, затрагивающими ген *CNTN6*, характерно нарушение слухового восприятия [Mercati et al., 2017]. Гиперакузия – болезненная чувствительность к слышимым звукам, наряду с такими признаками, как невосприимчивость к боли/теплу/холоду, повышенная чувствительность к запахам и прикосновениям, интерес к вращающимся предметам, нарушение моторики и координации, рассматривается в качестве одного из симптомов РАС. Гиперакузия была выявлена у всех пациентов с CNV и SNV, затрагивающими ген *CNTN6*, за исключением одного индивида. Неполная пенетрантность мутаций, выявленных в данном исследовании, по мнению авторов, может указывать на наличие других перестроек в геноме пробандов. Дальнейшие исследования продемонстрировали наличие у пациентов дополнительных мутаций в генах *GRID2*, *DMD* и *RAB39B*, являющихся факторами риска развития интеллектуальных нарушений, РАС, эпилепсии и нервно-мышечных заболеваний. Мутации *CNTN6*, приводящие к нарушению роста нейритов, могут отрицательно сказываться на сенсомоторных функциях у пациентов с РАС [Mercati et al., 2017].

В работе Tassano с соавторами приведена клиническая и генетическая характеристика двух новых случаев реципрокных моногенных хромосомных мутаций в области 3p26.3, затрагивающих ген *CNTN6*, которые были унаследованы пробандами от своих отцов [Tassano et al., 2018]. Помимо РАС, задержки психомоторного развития и признаков ОКР, у пациента с микроделецией *CNTN6* (427,7 т.п.н.) также была выявлена задержка физического развития, у пациента с микродупликацией *CNTN6* (941,9 т.п.н.) – расстройство социального поведения, СДВГ и гиперфагия. Еще один случай нонсенс-мутации в гене *CNTN6* у пациента с РАС был описан в статье García-Ortiz с соавторами [García-Ortiz et al., 2019]. В 16 месяцев у пробанда впервые были отмечены эпизоды судорожных приступов, регрессия приобретенных речевых навыков и задержка физического развития. Ребенок демонстрировал стереотипное поведение, был чувствителен к аудиальным стимулам, проявлял агрессию, имел трудности с актом глотания. Результаты полноэкзомного секвенирования показали наличие вероятно патогенных SNV в 9 генах, являющихся кандидатными для развития РАС. Среди данных SNV был выявлен вариант c.566C>A, p.Ser189Ter; приводящий к преждевременной терминации трансляции и образованию укороченной молекулы *CNTN6*. Примечательно, что данный вариант был унаследован пробандом от условно здорового отца, у которого не были выявлены аналогичные SNV в значимых для развития РАС генах (за исключением *COL11A1*). По мнению авторов, наличие аналогичной перестройки у пробанда и его здорового отца может указывать на необходимость присутствия в геноме дополнительных сопутствующих генетических вариантов для развития патологических проявлений нонсенс-мутации в *CNTN6* [García-Ortiz et al., 2019].

В статье Huang с соавторами приводятся данные о поиске генетических факторов, связанных с развитием синдрома Туретта [Huang et al., 2017]. Данное состояние характеризуется множественными хроническими непроизвольными моторными или вокальными тиками. В исследовании приняли участие 6527 человек (2434 пациентов с синдромом Туретта и 4093 здоровых индивида). Было показано, что делеции и дупликации, затрагивающие гены *NRXN1* и *CNTN6*, ассоциированы с развитием синдрома Туретта [Huang et al., 2017].

В исследовании Juan-Perez с соавторами был впервые описан пациент с микроделечией гена *CNTN6* и шизофренией [Juan-Perez et al., 2018]. Шизофрения представляет собой тяжелое психическое заболевание, при котором наблюдаются эмоциональные расстройства, неадекватное поведение, нарушение мышления и невозможность вести социальную жизнь. Микроделечия *CNTN6* (200 т.п.н.) была унаследована пациенткой от ее матери. Помимо шизофрении, у пробанда были выявлены пограничная форма интеллектуальной недостаточности и генерализованная эпилепсия. В семейном анамнезе у дяди по материнской линии было выявлено БАП, у тети по материнской линии – психическое расстройство, у бабушки по материнской линии диагностировали деменцию в 60 лет [Juan-Perez et al., 2018].

1.3.3 Ассоциация мутаций гена *CNTN6* с процессами, не связанными с функциями ЦНС

В последнее время в литературе появляется все больше данных, указывающих на значимость мутаций гена *CNTN6* для развития состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития. Однако в ряде работ показана неожиданная ассоциация мутаций и редких генетических вариантов *CNTN6* с развитием онкологических, аутоиммунных и кардиологических заболеваний. Данный факт вызывает немало вопросов, поскольку экспрессия *CNTN6* ограничена нервной системой [Ogawa et al., 1996].

В одной из работ показана ассоциация мутаций *CNTN6* с развитием наследственного рака простаты в популяции Финляндии [Rökman et al., 2005]. Впервые было показано, что локусы 3p25-p26 и 11q14.3p26.3 ассоциированы с предрасположенностью к развитию данного заболевания. Проведенный скрининг в группах пациентов с раком простаты и здоровых индивидов на наличие мутаций в генах региона 3p26.3 (*CHL1* и *CNTN6*) позволил выявить редкий генетический вариант p.Thr867Ala гена *CNTN6*, который, однако, не был обнаружен у других пациентов и у родственников пациентов-носителей мутации Thr867Ala [Rökman et al., 2005].

В работе Нограоран с соавторами приводится информация об исследовании 221 пациентов с аденоматозным полипозом толстого кишечника (мутации в генах *APC* и *MUTYH*

были предварительно исключены) [Нограоран et al., 2015]. Наличие редких (частота менее 0,2 % в группе здоровых индивидов) и уникальных (не встречающихся в контроле) CNV в группе пациентов составила 42 %, при этом все aberrации затрагивали белок-кодирующие последовательности ДНК. Анализ экспрессии и обогащения позволил сократить число вероятных генов-кандидатов развития аденоматозного полипоза до 77, в которых был проведен поиск точковых мутаций в группе из 192 пациентов. В общей сложности, при проведении исследования был выявлен 1 пациент с частичной микродупликацией гена *CNTN6*, 2 пациента с мутацией сдвига рамки считывания и еще 2 пациента с мутацией сайта сплайсинга [Нограоран et al., 2015]. Анализ потери гетерозиготности, проведенный в работе Manderson с соавторами, выявил 2 области в регионе 3p26.3, содержащие гены *CNTN4*, *CNTN6* и *CHL1*, которые были исследованы в качестве вероятных генов-онкосупрессоров при раке яичников. В ходе проведенного исследования авторы пришли к выводу, что *CNTN6*, вероятно, нельзя рассматривать в качестве гена-онкосупрессора, поскольку было показано отсутствие его экспрессии во всех анализируемых образцах как здоровой ткани, так и в образцах эпителиального рака яичника [Manderson et al., 2009].

В работе Pezzolo с соавторами приводится информация об обнаружении терминальной микроделеции 3p26.3 у подростка с нейробластомой [Pezzolo et al., 2017]. Примечательно, что у пациента не были диагностированы когнитивные нарушения и фенотипические особенности, характерные для синдрома микроделеции 3p26.3. В ходе молекулярно-цитогенетического анализа была выявлена субмикроскопическая терминальная делеция (2,54 м.п.н.), при этом точка разрыва локализовалась в последовательности гена *CNTN4*, а гены *CNTN6* и *CHL1* были делетированы [Pezzolo et al., 2017]. Было выдвинуто предположение, что *CHL1*, вероятно, является геном-онкосупрессором, а его сниженная экспрессия может указывать на вероятный неблагоприятный исход для пациентов с нейробластомой и микроделецией 3p26.3. Исследования Wang с соавторами были направлены на выявление генов-кандидатов немелкоклеточного рака легких на разных стадиях развития заболевания [Wang et al., 2017]. При проведении транскриптомного анализа в образцах тканей на стадии заболевания IB, IIB, IIIA и IV было выявлено 499, 602, 592 и 457 дифференциально экспрессирующихся генов, соответственно. Экспрессия гена *CNTN6* была снижена на всех стадиях развития немелкоклеточного рака легких [Wang et al., 2017].

Полногеномный поиск ассоциаций в группе пациентов с системной красной волчанкой был проведен Armstrong с коллегами [Armstrong et al., 2015]. Исследование выявило несколько новых кандидатных генов развития данного заболевания, в число которых вошли гены, кодирующие факторы транскрипции (*EHF* и *MED1*), два гена, продукты которых являются компонентами сигнального пути NFκB (*RASSF2* и *RNF114*), два

гена, продукты которых вовлечены в процессы презентации антигенов (*BIN1* и *SEC61G*), а также *CNTN6*, продукт которого участвует в процессах клеточной адгезии [Armstrong et al., 2015]. В нескольких работах показана возможная ассоциация мутаций и редких генетических вариантов *CNTN6* с развитием кардиологических нарушений. Так, у пациента с микродупликацией *CNTN6* была выявлена добавочная хорда в левом желудочке, у пациента с микроделецией *CNTN6* – нарушение проводимости сердца, у второго пациента с микроделецией – кардиомиопатия [Hu et al., 2015]. Проведенный Tang с соавторами полногеномный поиск ассоциаций позволил выявить ряд новых кандидатных локусов, связанных с развитием венозной тромбоэмболии, при этом один из SNP (rs6764623) был расположен на расстоянии 90 т.п.н. от гена *CNTN6* [Tang et al., 2013].

Помимо выявленных ассоциаций мутаций в гене *CNTN6* с развитием патологических состояний, не связанных с нарушением нервно-психического развития, вызывают особый интерес данные о вероятной связи *CNTN6* с процессами краниогенеза, липидным обменом и носительством определенной микрофлоры в кишечнике [Bertolini et al., 2016; Turpin et al., 2016; Wakil et al., 2016]. Стоит отметить, что при анализе гено-фенотипических корреляций у пациентов с реципрокными изолированными микроделециями и микродупликациями гена *CNTN6* были выявлены аномалии формы черепа и скелета (микроцефалия, макроцефалия, оксифалия, долихоцефалия, брахицефалия, выступающие лобные бугры, сколиоз и синдактилия) [Van Daalen et al., 2011; Hu et al., 2015; Kashevarova et al., 2014; Pinto et al., 2007; Wang et al., 2011; Zuko et al., 2013]. В исследовании Wakil с соавторами показана связь варианта гена *CNTN6* (rs9835344) со снижением уровня холестерина липопротеинов высокой плотности у этнических арабов [Wakil et al., 2016]. Результаты масштабного исследования, в котором принял участие 1561 здоровый индивид, показали связь 58 SNP с определенными таксонами кишечной микробиоты: в частности, вариант rs1394174 (*CNTN6*) был ассоциирован с *Faecalibacterium prausnitzii* [Turpin et al., 2016].

1.4 Модельные системы на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Выявление неожиданно большого числа микроструктурных aberrаций у пациентов с нарушениями нервно-психического развития и их очевидная патогенетическая значимость поставили вопрос о необходимости разработки соответствующих моделей для изучения патогенеза заболевания и разработки терапевтической стратегии данных состояний [Torres et al., 2015].

Изучение патогенеза нарушений нервно-психического развития влечет за собой определенные сложности. В большинстве случаев традиционно используемые для анализа

лимфоциты периферической крови, амниоциты и фибробласты не являются релевантным типом клеток для интерпретации клинических эффектов и оценки патогенетической значимости вновь обнаруженных хромосомных мутаций, связанных с нарушением интеллекта [Zhao, Bhattacharyya, 2018]. Без сомнения, наибольший интерес в контексте определения механизмов нарушения психики представляет изучение генетических феноменов непосредственно в клетках головного мозга, что дает возможность идентифицировать каскад биологических процессов, связанных как с нормальным, так и аномальным его функционированием [Ардаширова и др., 2020; Новосадова и др., 2019; Юров и др., 2021].

Использование животных моделей для изучения патогенеза состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития, сыграло важную роль в углублении понимания механизмов развития данных заболеваний. Тем не менее, данные модели ограничены в возможности изучения некоторых фундаментальных аспектов развития и функционирования структур головного мозга, в частности неокортекса, генетических особенностей организма и патогенеза заболеваний, которые являются уникальными для человека. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) рассматриваются в качестве альтернативной модельной системы для исследования генетических механизмов развития специфичных именно для человека нервно-психических расстройств [Zhao, Bhattacharyya, 2018].

В 2006 г. в прорывных исследованиях Takahashi и Yamanaka, проведенных на фибробластах мыши, а затем и в исследованиях Yu (2007) и Wernig (2007) было показано, что дифференцированные соматические клетки могут быть перепрограммированы в ИПСК с помощью ретровирусных векторов, несущих 4 транскрипционных фактора (Oct-3/4, Sox2, c-Myc и KLF4) [Karagiannis et al., 2019]. Данный метод стал альтернативой уже существующим методам переноса ядер соматических клеток в лишенный ядра ооцит, слияния соматических клеток с эмбриональными плюрипотентными стволовыми клетками и спонтанного репрограммирования при длительном культивировании примордиальных зародышевых клеток и клеток костного мозга [Yamanaka, 2007]. Открытие нового метода репрограммирования соматических клеток, взятых от пациентов, позволило решить некоторые этические проблемы, возникающие при использовании в экспериментах эмбриональных стволовых клеток человека [Zahumenska et al., 2020].

Особый интерес представляют модельные системы на основе ИПСК от пациентов с нейродегенеративными, нейропсихиатрическими заболеваниями и состояниями, характеризующимися нарушением нервно-психического развития [Whiteley et al., 2022]. Данные системы не только могут быть полезны при изучении патогенеза заболеваний, но

также могут быть использованы для поиска эффективных средств фармакологического лечения, и, вероятно, разработки алгоритмов регенерации старых и поврежденных нейронов, а также персонализированной клеточной терапии и тканевой инженерии [McKinney, 2017]. Дополнительное применение методов редактирования генома позволяет создавать интересующие исследователя модельные системы и изучать эффекты микроструктурных aberrаций в определенном типе клеток [Tai et al., 2016].

Технология индуцированной плюрипотентности значительно расширила возможности для изучения молекулярных механизмов развития интеллектуальных нарушений при различных патологических состояниях. В настоящее время стали возможными дифференцировка в нейрональном направлении и дальнейший анализ происходящих структурных и функциональных изменений в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с хромосомными болезнями, обусловленными числовыми и структурными аномалиями хромосом (синдром Дауна, Прадера-Вилли, Ангельмана, Вильямса-Бойрена, Рубинштейна-Тейби), нейродегенеративными заболеваниями (болезнью Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона), состояниями, характеризующимися нарушением нервно-психического развития (шизофренией, РАС, БАР) [Karagiannis et al., 2019; Khattak et al., 2015].

Работы по изучению механизмов развития нейродегенеративных заболеваний на модельных системах ИПСК ведутся и в отечественных лабораториях. Так, в настоящий момент известны исследования молекулярно-генетических основ патогенеза хореи Гентингтона [Vigont et al., 2021], болезни Паркинсона [Novosadova et al., 2019; Коваленко и др., 2017], болезни Штаргардта [Лебедин и др., 2017], бокового амиотрофического склероза [Честков и др., 2014] [Честков и др., 2013], спинальной мышечной атрофии [Григорьева и др., 2016]. Разработаны подходы для дифференцировки ИПСК в ГАМК-ергические средние шипиковые нейроны для моделирования болезни Гентингтона и других нейродегенеративных заболеваний [Grigor'eva et al., 2020] (Рисунок 6).

Одной из перспективных возможностей для дальнейшего изучения патологических процессов, происходящих при заболеваниях, сопровождающихся нарушением нервно-психического развития, является использование 3D структур, в частности, церебральных органоидов, дифференцированных из ИПСК и позволяющих реконструировать трехмерную организацию некоторых отделов эмбрионального головного мозга [Adams et al., 2019]. Данный подход для моделирования заболевания уже был использован при изучении патогенеза первичной аутосомно-рецессивной микроцефалии, микроцефалии при синдроме Меккеля, макроцефалии, врожденной лиссэнцефалии, болезни Сандхоффа, комплекса туберозного склероза, РАС, синдрома Ретта, а также ряда хромосомных и

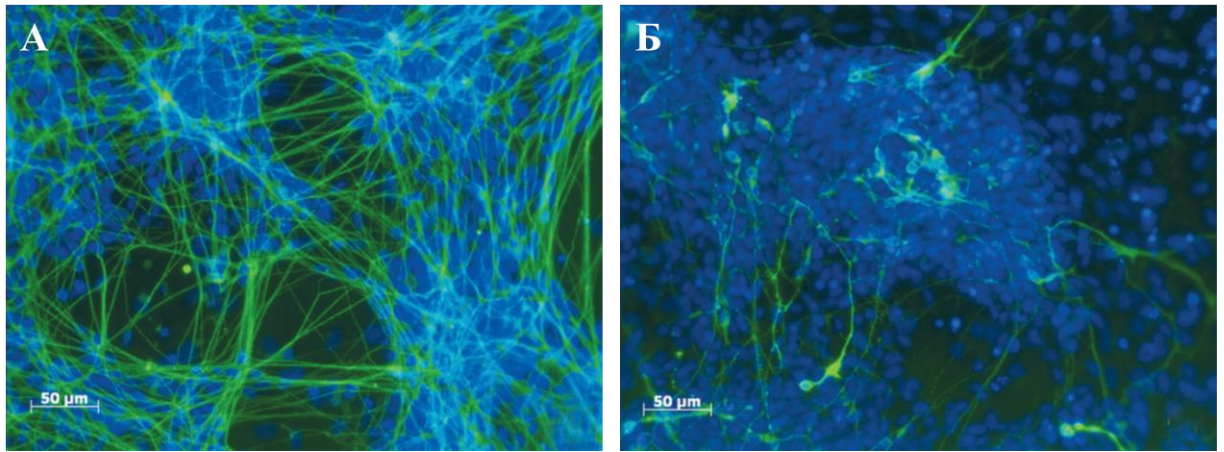


Рисунок 6 – Нейроны, полученные из ИПСК пациента, страдающего болезнью Паркинсона, иммуноцитохимическая реакция, продукт экспрессии зеленого цвета, ядра клеток окрашены DAPI в синий цвет: β -3-тубулин (А); тирозин-гидроксилаза (Б) [Некрасов и др., 2011].

нейродегенеративных заболеваний [Adams et al., 2019; Gonzalez et al., 2018; Sun et al., 2019; Xu et al., 2019].

1.5 Транскриптомный анализ как инструмент изучения патогенеза хромосомных болезней

Создание модельных систем хромосомных болезней на основе нейронов, полученных из ИПСК пациентов с хромосомными мутациями, позволяет изучить патогенез заболевания как на клеточном, оценивая морфофункциональные особенности нейронов, так и на молекулярном уровне. Одним из ключевых методов исследования в данном случае является анализ транскриптома релевантных клеток, а именно анализ транскрипционной активности генов с помощью определения количества их мРНК.

Проведение количественной оценки экспрессии генов в нормальных нейронах и клетках, несущих хромосомную мутацию, и анализ ДЭГ являются важным инструментом для выявления потенциальных участников молекулярных регуляторных сетей. Анализ ДЭГ позволяет выявлять изменение экспрессии отдельно взятых генов, исследовать кластеры генов по их общим функциональным группам, регуляции и экспрессии (при этом также необходим анализ последовательности ДНК для нахождения регуляторных регионов и мотивов), и, на уровне системной биологии, изучать генные и белковые сети для понимания проявления этих взаимодействий на системном уровне. Транскриптомный анализ и методы статистической обработки полученных данных позволяют идентифицировать кластеры генов со схожими экспрессионными профилями и функциями, а в ряде случаев, выявлять и корегулируемые кластеры.

Khattak с соавторами использовали технологию ИПСК для получения и изучения кортикальных нейронов с микроделецией 7q11.23 и нейронов без хромосомной перестройки,

и пришли к выводу о глобальной дисрегуляции экспрессии в клетках головного мозга пациентов с синдромом Вильямса-Бойрена [Khattak et al., 2015]. Экспрессия генов, локализованных в субсегменте 7q11.23, составила менее 50 % от уровня экспрессии нейронов без хромосомной перестройки, что вполне соответствует теоретическим ожиданиям. Для полученных нейронов с хромосомной абберацией были характерны нарушения их электрофизиологических свойств и дисрегуляция транскрипции. Нейроны продемонстрировали серьезные нарушения в генерации потенциала действия, в частности, значительно увеличенную фазу реполяризации и снижение тока ионов через потенциал-активируемые калиевые каналы [Khattak et al., 2015].

Проведение подобных исследований зачастую осложняется влиянием генетического фона на результаты полнотранскриптомного анализа, поскольку у разных индивидов наблюдается вариабельность экспрессии мРНК. Данную проблему попытался решить Hibaoui с коллегами – в качестве контрольной линии клеток они использовали ИПСК, полученные от плода с нормальным кариотипом, монозиготный близнец которого обладал дополнительной хромосомой 21 [Hibaoui et al., 2014]. Полнотранскриптомный анализ, проведенный на материале линий ИПСК с трисомией 21 и без нее, показал повышение экспрессии большого числа генов, локализованных на хромосоме 21. Было выявлено 580 гипо- и 624 гиперэкспрессирующихся гена в линии ИПСК, полученных от плода с синдромом Дауна, что в процентном соотношении составило 2,84 % и 3,05 % от всего генома. Анализ генных онтологий показал, что продукты гипоекспрессирующихся генов вовлечены в такие процессы, как эмбриональное развитие и морфогенез, морфогенез и развитие органов и систем. Среди данных 580 генов 96 были связаны с развитием центральной и периферической нервной системы, развитием мозга, нейрогенезом, аксоногенезом, а также генерацией и дифференцировкой нейронов. Стоит отметить, что полнотранскриптомный анализ показал изменение экспрессии генов, не локализованных на хромосоме 21, что подтверждает предположение об изменениях, происходящих при трисомии на уровне всего транскриптома клетки [Hibaoui et al., 2014].

При дифференцировке нейрональных клеток-предшественниц (НКП) в нейроны была показана сниженная экспрессия нейрональных (β 3-TUBULIN и MAP2) и повышенная экспрессия глиальных маркеров (GFAP, VIMENTIN, S100B, OLIG1 и OLIG2), что подтвердило предположение о нарушении нейрогенеза. Нейроны с трисомией 21 имели сниженное число нейритов (аксонов и дендритов) и их уменьшенную длину по сравнению с аналогичными показателями в нейронах контрольной группы. Плотность синаптических контактов была снижена в группе нейронов с дополнительной хромосомой 21 [Hibaoui et al., 2014].

Оценка характера дифференциальной экспрессии в фибробластах монозиготных плодов, дискордантных по трисомии 21, была проведена Letourneau с коллегами. Оказалось, что ДЭГ были организованы в 337 доменов (GEDDs) на всех хромосомах, при этом группы гиперэкспрессирующихся генов чередовались с группами гипоекспрессирующихся генов (Рисунок 7). GEDDs варьировали по размеру и числу локализованных в них генов (средняя протяженность 3,2 м.п.н., среднее число генов 20). Данный паттерн изменения экспрессии не прослеживался в случае оценки экспрессии в фибробластах, полученных от пары здоровых монозиготных близнецов, что дало основание предположить, что дисрегуляция транскрипции вызвана именно дополнительной копией хромосомы 21 [Letourneau et al., 2014].

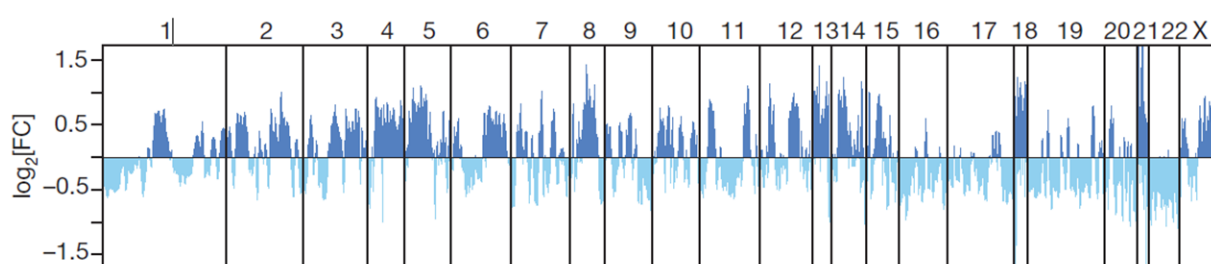


Рисунок 7– Изменение экспрессии генов в фибробластах с трисомией 21 в сравнении с контрольной группой клеток. Цифрами обозначены номера хромосом. Домены гиперэкспрессирующихся генов обозначены темно-синим цветом, домены гипоекспрессирующихся генов – светло-голубым [Letourneau et al., 2014].

Схожий паттерн изменения экспрессии генов, как и в случае с GEDD, прослеживался и в дифференцированных из фибробластов ИПСК. Примечательно, что GEDD совпадали с доменами, ассоциированными с ядерной мембраной (lamina-associated domains, LADs), и доменами репликации клеток млекопитающих. В клетках здоровых индивидов экспрессия генов в LAD снижена; однако, в соответствии с GEDD, в клетках с трисомией 21 происходила повторная активация экспрессии в LAD [Letourneau et al., 2014]. Данные результаты могут указывать на то, что взаимодействие хроматина с ядерной мембраной в клетках с трисомией 21 нарушено. Сравнение с доменами репликации млекопитающих также подтвердило их корреляцию с GEDD: в трисомных клетках экспрессия ранореплицирующихся активных генов, локализованных в центре ядра, подвергается ингибированию, в то время как экспрессия генов на периферии клеточного ядра активируется.

Было показано, что уровни триметилированных гистонов H3K4 в клетках с трисомией 21 коррелируют с GEDD [Letourneau et al., 2014]. Результаты исследования показывают, что ядерные компартменты трисомных клеток подвергаются эпигенетическим модификациям, что влияет на процессы транскрипции, поэтому, вероятно, GEDD могут способствовать

некоторым фенотипическим проявлениям трисомии 21. Было высказано предположение, что гиперэкспрессия ряда генов (*HLCS*, *HMG1*, *DYRK1A*, *BRWD1* и *RUNX1*) может приводить к изменению структуры и функции хроматина посредством модификаций гистонов, что, в свою очередь, приводит к изменениям компартментализации и процессов транскрипции. Данные изменения, вызванные дополнительным генетическим материалом в ядре, могут объяснять и нарушение регуляции экспрессии генов в случае других анеуплоидий [Letourneau et al., 2014].

Глобальные изменения экспрессии, вероятно лежащие в основе фенотипических проявлений синдрома Дауна, были исследованы Gonzales с соавторами в работе, проведенной на материале дисомных и трисомных клонов ИПСК, полученных от одного пациента с трисомией 21 [Gonzales et al., 2018]. Были рассмотрены и другие вопросы, касающиеся транскриптома клетки, такие как редактирование РНК заменой аденозина на инозин, альтернативный сплайсинг и экспрессия повторяющихся элементов генома. Значительные изменения в процессах накопления транскрипта, альтернативного сплайсинга и экспрессии повторяющихся элементов генома, были характерны для клеток с дополнительной копией хромосомы 21. Примечательно, что уровень экспрессии нейрон-ассоциированных генов был выше в ИПСК и нейронах с трисомией 21 в сравнении с дисомными клетками. Кроме того, ИПСК с хромосомной мутацией успешнее дифференцировались в нейроны [Gonzales et al., 2018]. Вероятно, дополнительная копия хромосомы 21 не накладывает ограничение на процессы дифференцировки ИПСК в нейрональном направлении, однако препятствует сохранению клетками их плюрипотентного состояния. При секвенировании РНК ИПСК с двумя и тремя копиями хромосомы 21, были идентифицированы 1644 ДЭГ (834 гипо- и 810 гиперэкспрессирующихся генов). Продукты генов с повышенной экспрессией в группе ИПСК с трисомией 21 были вовлечены в нейрогенез и функционирование нервной системы (в частности, *GRIN3A*, *GABRA2*, *STMN2*, *UNC5C*, *MAP2*), а продукты гипоекспрессирующихся генов участвовали в таких процессах, как клеточная адгезия и развитие зародышевых листков (*KLF4*, *NODAL*, *LEFTY1* и *LEFTY2*) [Gonzales et al., 2018]. Примечательно, что продукты данных генов также необходимы для поддержания клеткой плюрипотентного состояния. При проведении полнотранскриптомного анализа дисомных и трисомных нейрональных культур было выявлено 1377 ДЭГ, при этом для 1165 из них было показано снижение, а для 212 – повышение экспрессии. Анализ геномной онтологии выявил схожие для ИПСК и нейронов группы биологических процессов, в которых были задействованы продукты ДЭГ [Gonzales et al., 2018].

1.5.1 Транскриптомный анализ при реципрокных CNV

Одной из целей работ, которые преследовал Adamo с коллегами, стал ответ на вопрос, на каком этапе развития организма становится информативной модельная система на основе ИПСК, полученных от пациентов с микроструктурными хромосомными нарушениями. Была исследована дозозависимая дисрегуляция в линиях ИПСК с реципрокными изменениями числа копий хромосомного региона 7q11.23, вызывающими у их носителей синдром Вильямса-Бойрена и синдром микродупликации 7q11.23 (OMIM 194050 и 609757, соответственно), характеризующиеся зеркальными фенотипическими проявлениями [Adamo et al., 2015].

Было показано, что наличие в фибробластах CNV в исследуемом регионе не влияет на восстановление плюрипотентности клеток. Установлено, что существует прямая корреляция между экспрессией генов субсегмента 7q11.23 и дозой этих генов: снижение экспрессии для генов в линиях ИПСК с делецией и повышение экспрессии в линиях ИПСК с дупликацией [Adamo et al., 2015]. При парном сравнении 3 генотипов (делеция, дупликация, норма) выявлено 757 ДЭГ, анализ обогащения которых показал значительную представленность генов, продукты которых вовлечены в биологические процессы, имеющие прямое отношение к фенотипу пациентов с синдромом Вильямса-Бойрена и микродупликации 7q11.23 и органам-мишеням данных состояний (клеточная адгезия, миграция и подвижность; клеточный гомеостаз ионов кальция; морфогенез внутреннего уха; миграция и дифференцировка клеток нервного гребня, развитие скелетных мышц; развитие кровеносных сосудов и развитие сердечно-сосудистой системы; развитие почечного эпителия и др.) [Adamo et al., 2015].

Большинство ДЭГ в линиях с делецией и дупликацией демонстрировали либо противоположные, либо однонаправленные изменения экспрессии в сравнении с контрольной группой, что дает основание предположить, что разнонаправленное изменение дозы генов затрагивает одни и те же транскрипционные программы [Adamo et al., 2015]. Анализ обогащения 166 ДЭГ, однонаправленно изменяющих свою экспрессию в обеих группах сравнения, продемонстрировал значимое обогащение генов, продукты которых вовлечены в процессы синаптической передачи; в частности, в эту группу вошли гены *PDLIM1* и *MYH14*, нарушения работы которых, вероятно, приводят к развитию СДВГ, нарушению роста нейритов, гиперактузии, дефектами сердечно-сосудистой системы [Adamo et al., 2015].

Было показано, что CNV в субсегменте 7q11.23 влияют на транскрипционный профиль клеток, начиная с их плюрипотентного состояния. Различия в профиле экспрессии линий ИПСК с перестройками и контрольными линиями клеток усиливались в процессе их

направленной дифференцировки в целевые типы клеток (НКП, стволовые клетки нервного гребня и мезенхимальные стволовые клетки), т.е. очевидно, что происходило аккумулятивное транскрипционных изменений в процессе развития организма с микроделециями и микродупликациями в субсегменте 7q11.23 [Adamo et al., 2015]. В случае транскрипционного анализа НКП значимо изменяли свою экспрессию гены, вовлеченные в процессы аксонального наведения, регуляции секреции транмиттеров, негативной регуляции аксоногенеза, передачи нервного импульса, клеточной адгезии и морфогенеза черепных нервов. В стволовых клетках нервного гребня дифференциальная экспрессия была показана для генов, ассоциированных с развитием черепно-лицевых аномалий (*ATP2C1*, *HNAT*, *LMNB1*, *MAPK8*, *PTCH1* и *SATB2*) и RhoA-сигналинга посредством семейства Rho ГТФаз (*WASF1*, *GFAP*, *ACTR2*, *STMN1*, *MAPK8*, *ARHGEF11* и *PLXNA1*). ДЭГ, выявленные в процессе полнотранскриптомного анализа мезенхимальных стволовых клеток, были значимо обогащены в категориях, связанных с тканевой морфологией [Adamo et al., 2015].

ИПСК и НКП, полученные от пациентов с гетерозиготными реципрокными микроделециями (OMIM 612001) и микродупликациями субсегмента 15q13.3, также были использованы в качестве модельной системы в работе Gillentine с соавторами. Было изучено влияние дисрегуляции экспрессии кандидатного гена *CHRNA7*, экспрессирующегося преимущественно в гипоталамусе и кодирующего $\alpha 7$ -никотиновый ацетилхолиновый рецептор, на фенотипические проявления данных реципрокных синдромов (в частности, задержку развития, УО, РАС, эпилептические приступы и шизофрению) [Gillentine et al., 2017]. Было показано, что гаплонедостаточность *CHRNA7* при микроделеции 15q13.3 способствовала снижению тока ионов кальция. В случае микродупликации отмечалась гиперэкспрессия гена *CHRNA7*, что приводило к повышению экспрессии специфичных шаперонов и стрессу эндоплазматического ретикулума. Данное состояние сопровождалось нарушением включения $\alpha 7$ -субъединицы в комплекс никотинового ацетилхолинового рецептора, локализованного на клеточной мембране. В данном случае нарушались зависимые от кальциевого тока каскады внутриклеточных реакций. Наличие реципрокных микроструктурных перестроек у индивидов и общее звено патологического проявления мутации (снижение тока ионов кальция через никотиновый холинорецептор), вероятно, может объяснить наличие у пациентов общих фенотипических проявлений, в частности, нейропсихических заболеваний и когнитивных нарушений. Авторы приходят к заключению, что CNV в субсегменте 15q13.3 приводят к снижению тока ионов кальция, что в свою очередь, способствует дисрегуляции экспрессии на уровне целой клетки [Gillentine et al., 2017].

Реципрокные микроделеции и микродупликации области 15q11-q13.1 были исследованы Germain с соавторами с помощью транскриптомного анализа в модельной системе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с синдромом Ангельмана (OMIM 105830) и синдромом микродупликации 15q11-q13.1 (OMIM 608636), вызванным наличием изодисцентрической хромосомы 15 [Germain et al., 2014]. Дупликации области 15q11-q13.1 на материнской хромосоме ассоциированы с развитием аутизма, гипотонии, задержкой развития, отклонениями в поведении, нарушением речевого развития, эпилептиформными приступами, нарушениями в сфере социальных взаимодействий, вербального и невербального общения. Делеции на материнском гомологе в данной области связаны с проявлением симптомов синдрома Ангельмана: нарушением развития ЦНС, судорожными припадками, отсутствием речи и задержкой развития. Сравнение транскрипционных профилей в нейронах с микроделецией 15q11-q13.1 и изодисцентрической хромосомой 15 показало, что, несмотря на противоположный характер изменения копийности данного хромосомного региона, выявленные ДЭГ изменяли свою экспрессию однонаправленно в обеих группах исследуемых клеток [Germain et al., 2014]. Общим ДЭГ для двух групп нейронов с хромосомными абберациями оказался 751 ген, при этом 76 % продемонстрировали общую тенденцию в изменении характера экспрессии (гипо- или гиперэкспрессия в обеих группах сравнения относительно контрольной группы клеток) [Germain et al., 2014]. Было выявлено снижение экспрессии генов, кандидатных для развития аутизма и эпилепсии (*DLX2*, *ARX*, *ISL1*, *NLGN1*, *SHANK1*, *ADORA2A*, *DLX5*), а также генов, продукты которых вовлечены в процессы развития нейронов [Germain et al., 2014].

В заключение стоит отметить, что в настоящее время становятся особенно актуальными работы, связанные с использованием технологии получения ИПСК от пациентов с различными заболеваниями и их дифференцировкой в целевой тип клеток для последующего изучения молекулярных и клеточных эффектов генетического дисбаланса. Транскриптомные исследования, проведенные на материале нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с числовыми и структурными аномалиями хромосом, обозначили общие закономерности изменения генной экспрессии в клетках пациентов с хромосомными болезнями: глобальная дисрегуляция экспрессии генов по всему геному; схожесть паттерна транскрипционных нарушений как при различных анеуплоидиях, так и при реципрокных микроструктурных абберациях хромосом; общность затронутых геномными мутациями биологических путей и процессов, аккумуляирование транскрипционных изменений в процессе развития организма с хромосомной абберацией.

В настоящее время появляется всё больше информации о патогенетической значимости моногенных и внутригенных CNV, нередко сопровождающихся

интеллектуальными нарушениями. Сужение спектра генов в регионе перестройки может существенно облегчить установление гено-фенотипических корреляций при данных хромосомных мутациях. Однако стоит отметить, что работ, нацеленных на изучение патогенеза микроделеционных и микродупликационных синдромов, обусловленных микроструктурными абберациями, разнонаправленно изменяющими число копий хромосомных регионов и генов, в них локализованных, в настоящее время не так много. Более того, в настоящий момент отсутствуют данные об особенностях генной экспрессии в нейронах с реципрокными моногенными CNV. Таким образом, возможность проведения работ, нацеленных на изучение экспрессионных профилей нейронов с микроделацией и микродупликацией единственного гена *CNTN6*, является уникальной и крайне перспективной. Результаты подобных исследований могут быть важны не только для понимания патогенеза хромосомных болезней, но и для разработки стратегий возможных способов коррекции проявлений данного патологического состояния, в том числе с использованием методов редактирования генома.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Выполнение данного исследования базировалось на создании линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6* (трисомия → дисомия (контрольная линия) → моносомия → функциональная нуллисомия (линия с нокаутом гена *CNTN6*)), направленной дифференцировки клеток данных линий в нейроны, проведении транскриптомного анализа на микрочипах и функциональной аннотации полученных ДЭГ. Схема проведения эксперимента представлена на рисунке 8.

Ранее в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ в рамках проведения молекулярно-цитогенетической диагностики микроструктурных aberrаций с помощью aCGH была исследована ДНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови 870 пациентов (500 мальчиков и 370 девочек) в возрасте от 1 месяца до 21 года лет с задержкой развития, недифференцированными формами УО ($IQ < 70$), ВПР, стигмами дизэмбриогенеза. Средний возраст пациентов составил $6 \pm 3,68$ лет. У пациентов было предварительно исключено носительство числовых и крупных структурных хромосомных аномалий, а также наличие наследственных нарушений обмена и моногенных наследственных синдромов, сопровождающихся нарушением нервно-психического развития.

При проведении диагностики выявлен 1 семейный случай микроделеции (сибсы с аналогичной перестройкой) и 1 случай микродупликации хромосомного субсегмента 3p26.3, затрагивающих единственный ген *CNTN6*. Наличие хромосомных мутаций у пациентов подтверждено с помощью метода qPCR. Фибробласты кожи данных пациентов послужили материалом для дальнейшего исследования.

1) На первом этапе исследования для оценки распространенности микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в выборке пациентов с нервно-психическими заболеваниями проведен скрининг с помощью методов qPCR (200 пациентов: 142 мальчика, 58 девочек, средний возраст $9 \pm 3,89$ лет) и aCGH (870 пациентов, 500 мальчиков, 370 девочек, средний возраст $6 \pm 3,68$ лет). Проведена ПЦР-диагностика микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3 для выявления вероятного носительства микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке больных шизофренией (86 пациентов, включая 45 мужчин и 41 женщины в возрасте от 18 до 68 лет (средний возраст составил $35,8 \pm 11$ лет)). В контрольную группу (популяционная выборка) вошли 97 здоровых мужчин и 103 женщины (всего 200 человек) в возрасте от 23 до 69 лет ($35 \pm 7,55$ лет). Обследование пациентов и сбор клинического материала осуществлялись на базе Генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и Томской клинической психиатрической больницы.

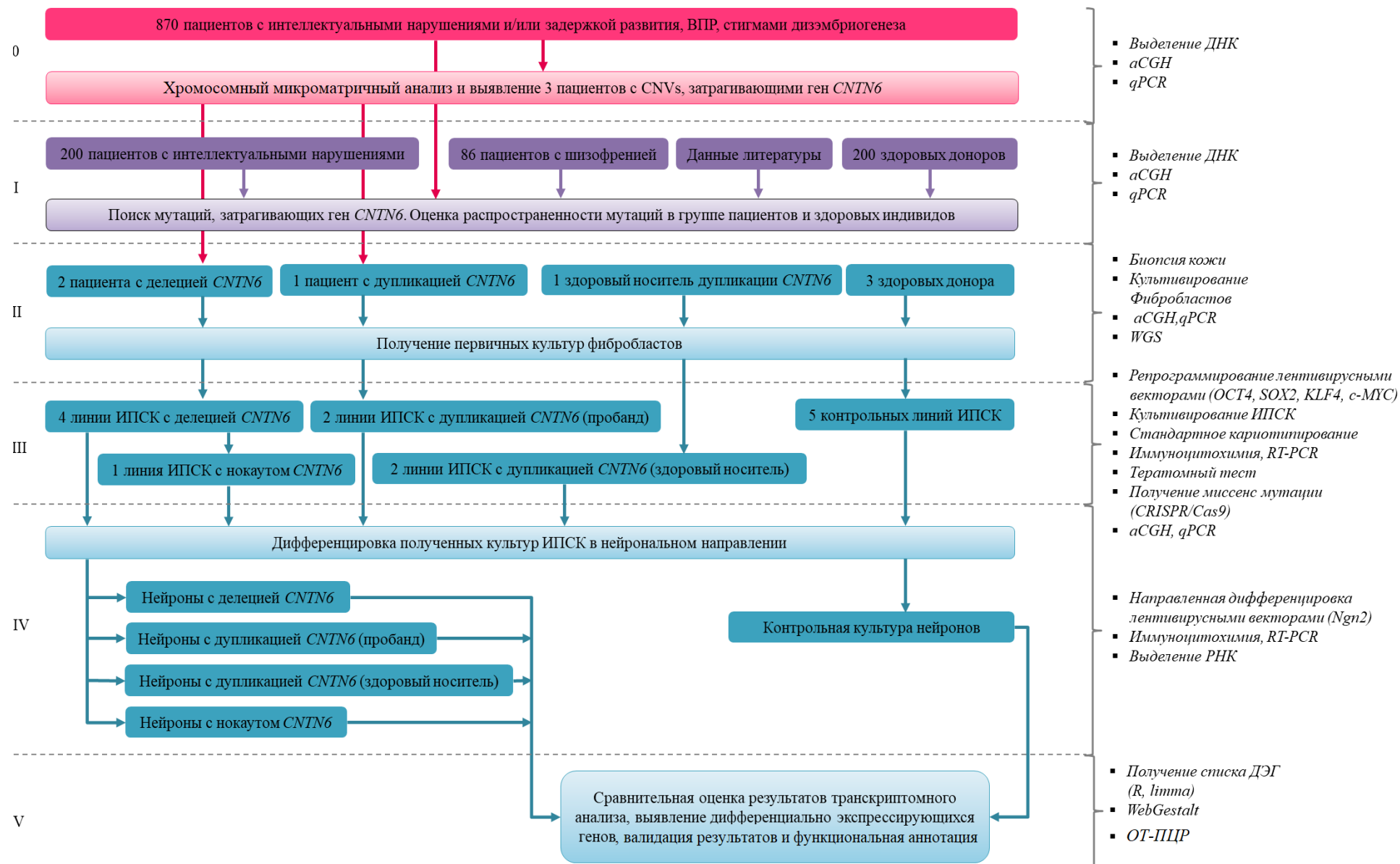


Рисунок 8 – Схема исследования. Слева римскими цифрами обозначены этапы работы. Цифрой «0» обозначен задел настоящей работы. Справа указаны методы, которые были использованы на соответствующем этапе работы

Работа проводилась в сотрудничестве с лабораторией молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья (заведующая – д.м.н., профессор С.А. Иванова).

2) На втором этапе исследования, проведенном на базе НИИ медицинской генетики и Генетической клиники Томского НИМЦ, путем стандартной процедуры биопсии получено 0,5 см² кожи предплечья пациентов с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6*, бессимптомного носителя хромосомной мутации (отца пациента с микродупликацией *CNTN6*), а также трех здоровых доноров. Получены первичные культуры фибробластов. С помощью aCGH и qPCR подтверждено носительство перестроек в культивируемых клетках. Структура перестройки и точки разрыва в регионе 3p26.3 уточнены с помощью WGS, также с помощью полноэкзомного секвенирования исключено наличие в геномах пациентов других патогенетически значимых вариантов.

3) На третьем этапе исследования применен способ экзогенной экспрессии транскрипционных факторов человека (*KLF4*, *OCT4*, *SOX2* и *c-MYC*) с помощью лентивирусных векторов LeGO. Получены 4 линии ИПСК пациентов с микроделецией (2 линии – от брата, 2 – от сестры), 2 линии ИПСК пациента с микродупликацией гена *CNTN6*, 5 линий ИПСК от трех здоровых доноров мужского пола (возраст на момент биопсии фибробластов кожи: 31, 32, 39 лет). С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 также получена линия ИПСК с нокаутом гена *CNTN6*. Стандартное цитогенетическое исследование подтвердило отсутствие в репрограммированных клетках числовых и крупных хромосомных мутаций. Матричная сравнительная геномная гибридизация и qPCR исключили присутствие дополнительных хромосомных мутаций. С целью подтверждения плюрипотентности полученных клеточных линий, колонии ИПСК были иммуноокрашены первичными антителами к *Nanog*, *Oct4*, *TRA-1-60* и *SSEA4*. Получены эмбриоидные тельца и проведен тератомный тест с последующим анализом «маркеров плюрипотентности».

4) На четвертом этапе исследования клетки полученных линий ИПСК были дифференцированы в нейрональном направлении по стандартному протоколу [Zhang et al., 2013b]. Для получения нейронов использованы 3 лентивирусные конструкции, одна из которых включала в себя последовательность гена, кодирующего транскрипционный фактор нейрогенин-2 (*Ng2*). Для стимулирования образования синапсов дифференцирующиеся клетки культивировали совместно с глиальными клетками мыши. Для подтверждения корректной дифференцировки оценен уровень экспрессии нейрональных маркеров с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (*FOXG1*, *BRN2*, *CUX1*, *CUX2*, *SYN1*, *vGLUT1*, *vGLUT2*, *FEZF2* и *BHLHE22*) и проведено иммуноокрашивание с первичными антителами к *Tubb3*, *NF200*, *MAP2*, *SYP* и *PSD95*. Этапы репрограммирования культур

фибробластов в ИПСК и последующей направленной дифференцировки ИПСК в нейроны реализованы на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск (заведующий – д.б.н, профессор О.Л. Серов).

5) На пятом этапе исследования проведен транскриптомный анализ для образцов тотальной РНК, выделенной из нейрональных культур и мышинных глиальных клеток, на поверхности которых проходила дифференцировка. Полученные результаты использованы в биоинформатическом анализе с использованием пакета *limma* [Ritchie et al., 2015], уровнем значимости $P_{FDR} < 0,05$ и значением параметров модели *robust = true*, *trend = true*. Для выявления функциональных групп генов проведен анализ обогащения генов с помощью ресурса Webgestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit). Транскриптомный анализ проведен на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Все этапы настоящего исследования проводились с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ. Информированные согласия от пробандов (пациентов с нарушением нервно-психического развития и шизофренией), законных представителей пробандов (родителей или опекунов) и здоровых доноров фибробластов кожи и периферической крови получены во всех случаях. Все этапы работы одобрены комитетами по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики и НИИ психического здоровья Томского НИМЦ.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

2.2 Структура и объем материала

При проведении молекулярно-цитогенетической диагностики в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ были выявлены три уникальных случая микроструктурных абберраций в регионе 3p26.3, затрагивающих единственный ген *CNTN6*. Согласно результатам хромосомного микроматричного анализа, установлено, что микроделеции у брата (Ф1) и сестры (Ф2) в одной семье имеют одинаковый размер (295,1 т.п.н.) и локализацию. Со стороны центромеры точка разрыва приходится на межгенный участок между генами *CNTN6* и *CNTN4*, а с теломерной стороны она локализована в области второго интрона гена *CNTN6*. Таким образом, делеция приводит к отсутствию большинства последовательности гена (экзоны 3-23), т.е. интактными остаются только экзоны 1 и 2.

Структура микроделеции региона 3p26.3 и прилегающих хромосомных регионов была подтверждена с помощью qPCR (Рисунок 9). Биологический материал отца не был доступен для анализа родительского происхождения мутации (сисбы Ф1 и Ф2 являются воспитанниками детского дома). ПЦР в режиме реального времени подтвердила наличие микроделеции, затрагивающей ген *CNTN6* и интактность последовательностей фланкирующих генов *CHL1* и *CNTN4*.

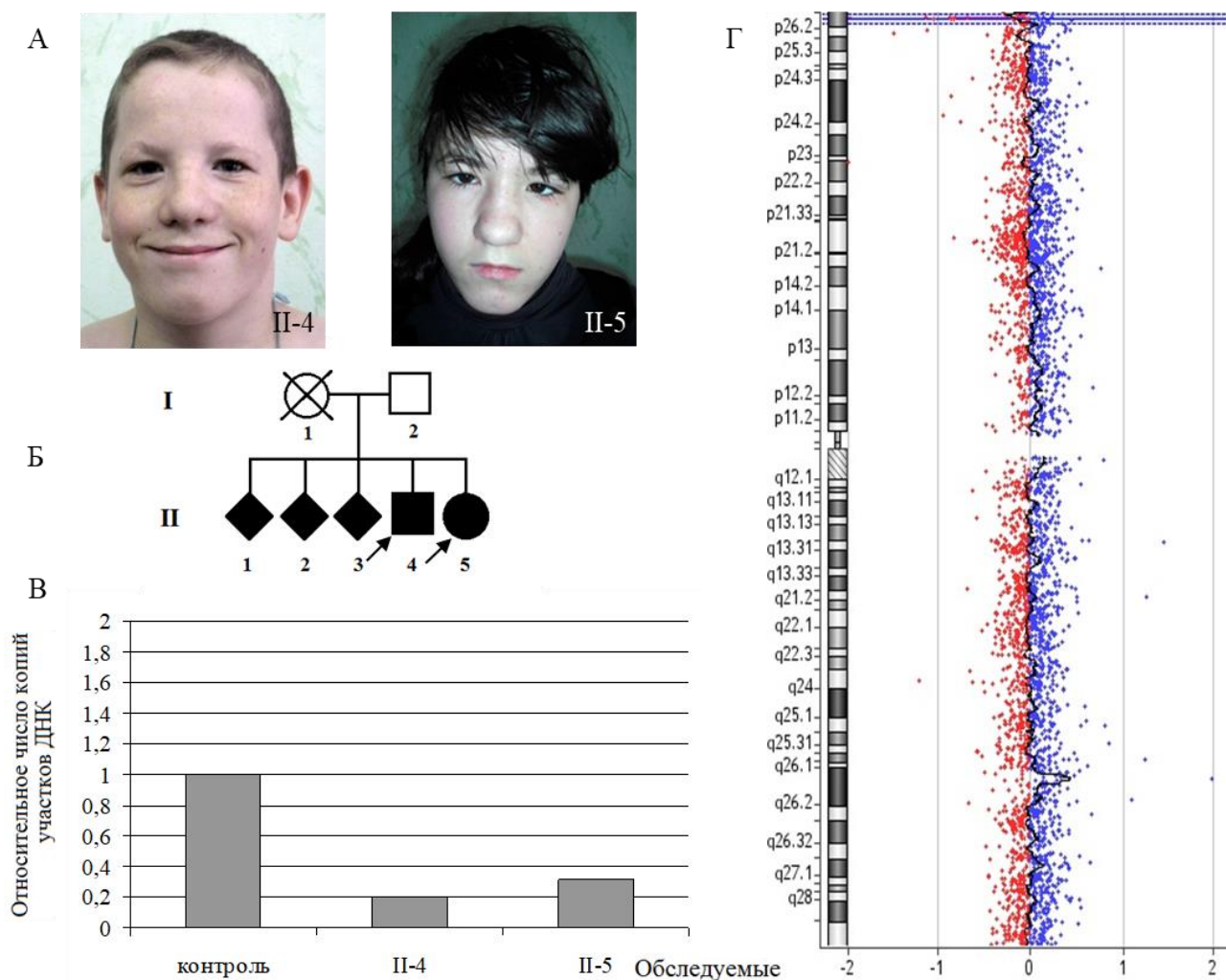


Рисунок 9 – Исследование семьи Ф. (А) Фенотип сисбов Ф1 и Ф2; (Б) Родословная семьи Ф.; (В) Подтверждение микроделеции 3p26.3 (*CNTN6*) у сисбов с помощью qPCR; (Г) – Гибридизационный профиль хромосомы 3 с делецией региона 3p26.3 (приведены результаты aCGH для пациента Ф1; профиль хромосомы 3 второго сисба аналогичен данному).

Приведены рисунки из статьи Kashevarova et al. (2014)

Размер микродупликации гена *CNTN6* у пациента К, по результатам хромосомного микроматричного анализа, составил 766,1 т.п.н. Точки разрывов приходились на области между генами *CHL1* и *CNTN6* с одной стороны, и *CNTN6* и *CNTN4* с другой стороны. Увеличение копийности целого гена *CNTN6* было подтверждено с помощью qPCR. Копийность генов *CHL1* и *CNTN4* не была нарушена. Результаты анализа родительского

происхождения микродупликации *CNTN6* у пациента К показали, что хромосомная перестройка унаследована от условно здорового отца, который, в свою очередь, унаследовал ее от своей здоровой матери (Рисунок 10). Детальное фенотипическое описание пациентов, анамнез жизни, результаты молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических тестов подробно представлены в статье Kashevarova et al. (2014).

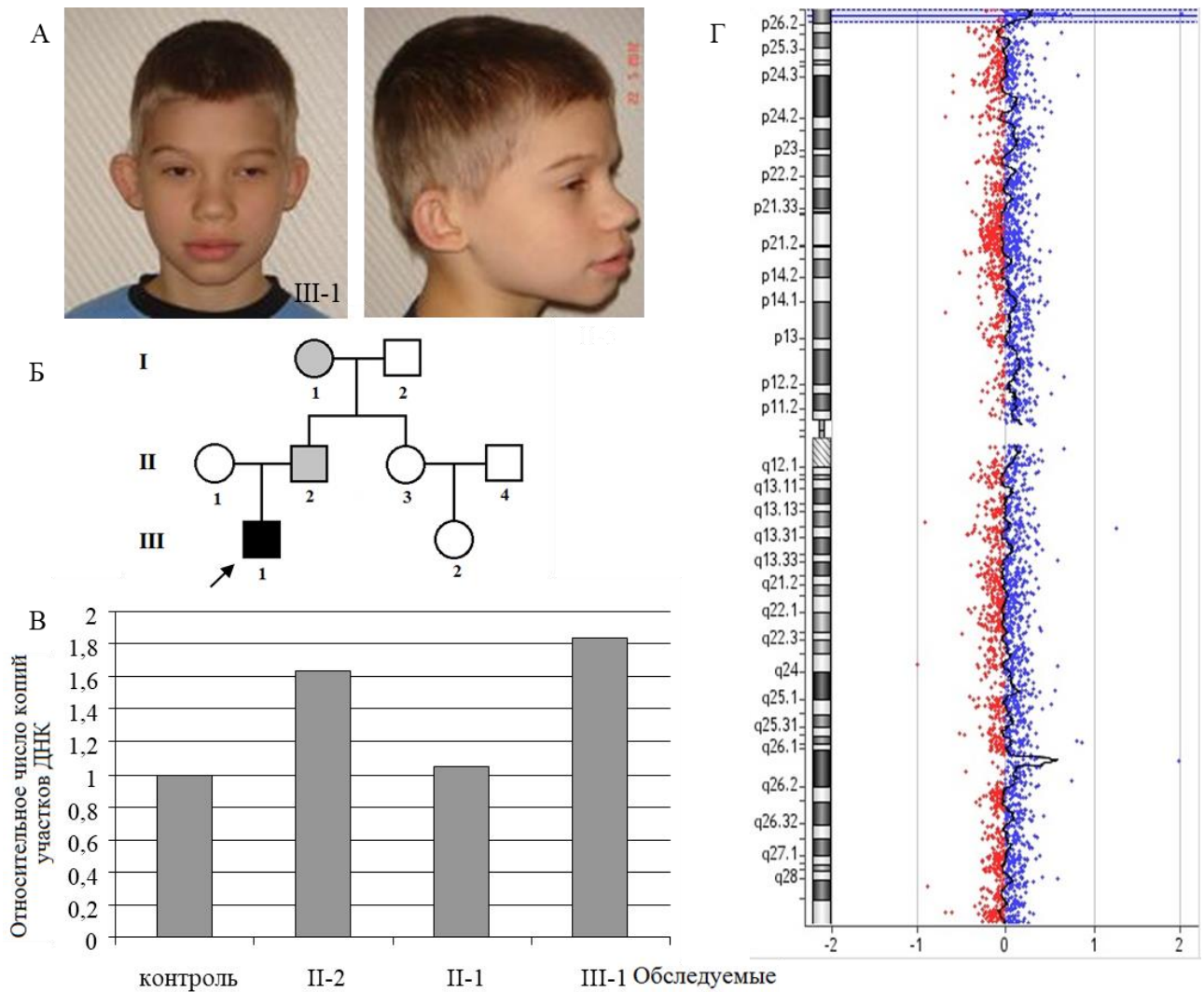


Рисунок 10 – Исследование семьи К (А) Фенотип пациента К; (Б) родословная семьи К (серым обозначены члены семьи – бессимптомные носители микродупликации *CNTN6*); (В) подтверждение микродупликации 3p26.3 (*CNTN6*) у пробанда (III-1) и его отца (II-2) с помощью qPCR; (Г) Гибридизационный профиль хромосомы 3 с дупликацией региона 3p26.3. Приведены рисунки из статьи Kashevarova et al. (2014)

Для получения первичных культур фибробластов и дальнейших этапов клеточного репрограммирования была проведена биопсия 0,5 см² кожи пациентов Ф1, Ф2, К, а также условного здорового отца пациента К и трех здоровых доноров мужского пола. Для подтверждения отсутствия числовых и крупных структурных перестроек в фибробластах перед репрограммированием клеток были проведены aCGH, qPCR и WGS.

Идентификаторы полученных линий ИПСК, половозрастные характеристики доноров фибробластов, молекулярный кариотип, а также краткая фенотипическая характеристика представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*

Идентификатор линии ИПСК	Результат aCGH (ISCN (2020))	Основные фенотипические особенности доноров фибробластов кожи ⁽¹⁾	Пол	Возраст на момент биопсии
iTAF3del17 ⁽⁴⁾ iTAF3del21	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (1155939_1451037)×1	Задержка развития, УО, микроцефалия, абсансная эпилепсия, дизартрия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа и пальцев рук, гипоплазия щитовидной железы	М	20 лет ⁽²⁾
iTAF13del26 ⁽⁴⁾ iTAF13del27 ⁽⁴⁾	46,XX.arr[hg38] 3p26.3 (1155939_1451037)×1	Задержка развития, УО, микроцефалия, дислексия, дисграфия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа и пальцев рук, гипоплазия щитовидной железы	Ж	18 лет ⁽³⁾
iTAF4dup14 ⁽⁵⁾ iTAF4dup22 ⁽⁵⁾	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (684961_1451037)×3 pat	Задержка развития, умеренная степень УО, микроцефалия, гиперкинезы, дизартрия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа	М	13 лет
iTAF14dup8(hc) ⁽⁶⁾ iTAF14dup10(hc) ⁽⁶⁾	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (591766_1516880)×3 mat	Бессимптомный носитель микродупликации <i>CNTN6</i>	М	40 лет
iTAF1nor25 iTAF1nor36	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	31 год
iTAF2nor5 iTAF2nor24	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	39 лет
iNAF1nor6	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	32 года

Примечание: 1 – Описание фенотипа пациентов Ф1, Ф2 и К опубликовано в статье Kashevarova et al. (2014); 2, 3 – Задержка психомоторного развития выявлена возрасте 6 и 4 лет, соответственно; 4 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Shnaider et al. (2019); 5 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Gridina et al. (2018); 6 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Gridina et al. (2019); . «hc» (healthy carrier) – здоровый носитель дупликации *CNTN6*; Ж, М – женский и мужской пол, соответственно.

Для проведения транскриптомного анализа на микрочипах использованы 29 образцов РНК (27 образцов выделены из нейронов, дифференцированных из 13 линий ИПСК, 2 – из

мышинных глиальных клеток). Все линии были дифференцированы в нейроны в двух биологических повторностях (за исключением линий iTAF2nor5, iNAF1nor6 – 1 реплика, iTAF4dup22 – 3 реплики). Список использованных для анализа экспрессии образцов приведен в Приложении Б (Таблица Б.1).

2.3 Выделение ДНК

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови пациентов с нарушением нервно-психического развития (УО и шизофрения) и здоровых доноров проводили по стандартной методике. К 0,7 мл крови в эппендорфе добавляли 0,8 мл 1×SSC, перемешивали. Центрифугировали в течение 3 мин при 13300 об/мин, осторожно удаляли супернатант. Добавляли в эппендорф 1,4 мл 1×SSC, перемешивали, чтобы разбить плотный осадок. Центрифугировали в течение 2 мин при 13300 об/мин, осторожно удаляли супернатант (повторяли данный этап дважды). Добавляли 270 мкл 0,2 М NaAc (pH 7,0), тщательно перемешивали на центрифуге-вортекс «Microspin» (Biosan, Латвия) до полной гомогенизации (6–10 мин). Добавляли 30 мкл 10 % SDS и 5 мкл протеиназы К, перемешивали. Оставляли в термостате на 1,5 ч при температуре 50 °С, периодически перемешивали. Дальнейшие этапы выделения ДНК проводили в вытяжном шкафу. Добавляли 300 мкл раствора фенол-хлороформ (1:1), и перемешивали на мини-ротаторе в течение 10 мин. Центрифугировали 8 мин при 13300 об/мин. Аккуратно переносили водную фазу, не захватывая интерфазу, в новый эппендорф. Добавляли 300 мкл хлороформа и перемешивали на центрифуге-вортекс в течение 10 мин. Центрифугировали в течение 8 мин при 13300 об/мин. Переносили водную фазу, не захватывая интерфазу, в чистый эппендорф. К супернатанту в эппендорфе добавляли 1 мл 96 %-го охлажденного этилового спирта, аккуратно перемешивали до осаждения ДНК. Центрифугировали 60 с при 12500 об/мин, удаляли спирт. Добавляли 1 мл 70 %-го этилового спирта комнатной температуры, перемешивали, центрифугировали 60 с при 12500 об/мин. Сливали спирт, снимали последнюю каплю фильтровальной бумагой, сушили в центрифужном испарителе «Concentrator plus» (Eppendorf, Германия) 7 мин при температуре 45 °С. Добавляли 100 мкл TE-буфера, оставляли на ночь для полного растворения ДНК в термостате при 37 °С.

2.4 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Количественная ПЦР была проведена с использованием двух пар праймеров на область перестройки и 1 пары контрольных праймеров на ген *HEXB* (Таблица 3). Данный ген кодирует β-субъединицу лизосомальной β-гексозаминидазы, катализирующий деградацию

Таблица 3 – Структура праймеров на гены *CNTN6* и *HEXB*

Регион	Праймер	Последовательность	Slope*
3p26.3	CNTN6_A F	5'-TTTGTTCACCTGATTGTATGG-3'	-3.58
	CNTN6_A R	5'-GAAGAGTTTATGAGTGGCAGCA-3'	
	CNTN6_B F	5'-CTGGACAGATGACTCCAAAGAA-3'	-3.78
	CNTN6_B R	5'-CCTGTCCCAGCAGTGTGTGTA-3'	
5q13.3	HEXB F	5'-CCGGGCACAATAGTTGAAGT-3'	-3.32
	HEXB R	5'-TCCTCCAATCTTGTCCATAGC-3'	

Примечание: Slope – показатель эффективности амплификации ДНК (рассчитывается как тангенс угла наклона между стандартной кривой и положительным направлением оси абсцисс)

ганглиозида GM-2, а также других молекул, содержащих терминальные N-ацетилгексозамины. Изменения числа копий *HEXB* у здоровых индивидов не зарегистрированы в базе данных Database of Genomic Variants (DGV) [<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home?ref=GRCh37/hg19>]. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы базы данных Ensembl [<http://www.ensembl.org/index.html>] и программ Primer-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] и Primer3 [<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>]. Проверку специфичности выбранных праймеров проводили с использованием программ Primer-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] и VectorNTI Advance®11.5.4 (Invitrogen, США).

Измерение концентрации и проверку чистоты ДНК опытных и контрольных образцов проводили с использованием спектрофотометра «NanoDrop 8000» (Thermo Fisher Scientific, США). Оптимальная концентрация ДНК в образце для проведения qPCR составляла 10 нг/мкл (9,8–10,2 нг/мкл). Чистота образцов определялась значениями соотношений A260/280 и A260/230, характеризующих оптическую плотность раствора при длинах волн 260 нм и 280 нм, 260 нм и 230 нм, соответственно. ДНК считалась свободной от белковых примесей при $A_{260}/A_{280} \approx 1,8-2,0$ и свободной от солей при $A_{260}/A_{230} > 1$.

ПЦР на материале пациентов с нарушением нервно-психического развития и здоровых доноров проводили в ПЦР-боксе в соответствии с составленным протоколом. В каждую лунку планшета вносили 2,5 мкл прямого и 2,5 мкл обратного праймеров (1 мкмоль/л) и помещали на холодовой планшет. Далее для каждого исследуемого образца ДНК смешивали следующие реакционные компоненты из расчета на одну лунку: 5 мкл воды, свободной от ДНКаз и РНКаз, 2,5 мкл ДНК (≈ 10 нг/мкл), 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия).

Вносили смесь в лунки в соответствии с протоколом проведения ПЦР. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой. Центрифугировали планшет в центрифужном испарителе «Concentrator plus» (Eppendorf, Германия) в течение 1 мин со скоростью 1000 об/мин. ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе «AriaMx Real-Time PCR System» (Agilent Technologies, США) при следующих условиях:

1) Предварительная денатурация: 95 °C – 10 мин

2) 40 циклов:

– денатурация: 95 °C – 15 с

– отжиг: 60 °C – 30 с

– элонгация: 72 °C – 30 с

Детекция флуоресцентного сигнала проводилась в конце каждого цикла после этапа элонгации. После завершения реакции для анализа графиков накопления ДНК использовался пороговый метод. Суть метода заключается в определении порогового цикла C_t , в котором количество ДНК в реакционной смеси достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины N_t (задается программой или пользователем). После получения и сравнения значений C_t для каждого образца можно сделать вывод о начальной концентрации ДНК в исследуемых образцах. Расчет производили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

2.5 Матричная сравнительная геномная гибридизация

Подтверждение выявленных при qPCR перестроек в образцах, полученных от пациентов с шизофренией, а также молекулярное кариотипирование образцов ИПСК после репрограммирования проводили с помощью матричной сравнительной геномной гибридизации (Рисунок 11) с использованием ДНК-микрочипов высокого разрешения «SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8×60K» и набора реактивов «SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8×60K» (Agilent Technologies, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (v. 7.5, Agilent Technologies, США).

2.5.1 Энзиматическое мечение

При подготовке геномной ДНК на первом этапе определяли степень чистоты ДНК от белковых примесей и солей путем определения соотношения A260/A280 и A260/A230 на спектрофотометре «NanoDrop 8000» (Thermo Fisher Scientific, США). Только ДНК, соответствующую требованиям ($A_{260}/A_{280} = 1,8–2,0$ и $A_{260}/A_{230} > 1$), использовали для гибридизации на микрочипе. После оценки качества для каждого из 8 образцов опытной и контрольной ДНК готовили его водный раствор объемом 13 мкл с общим содержанием ДНК

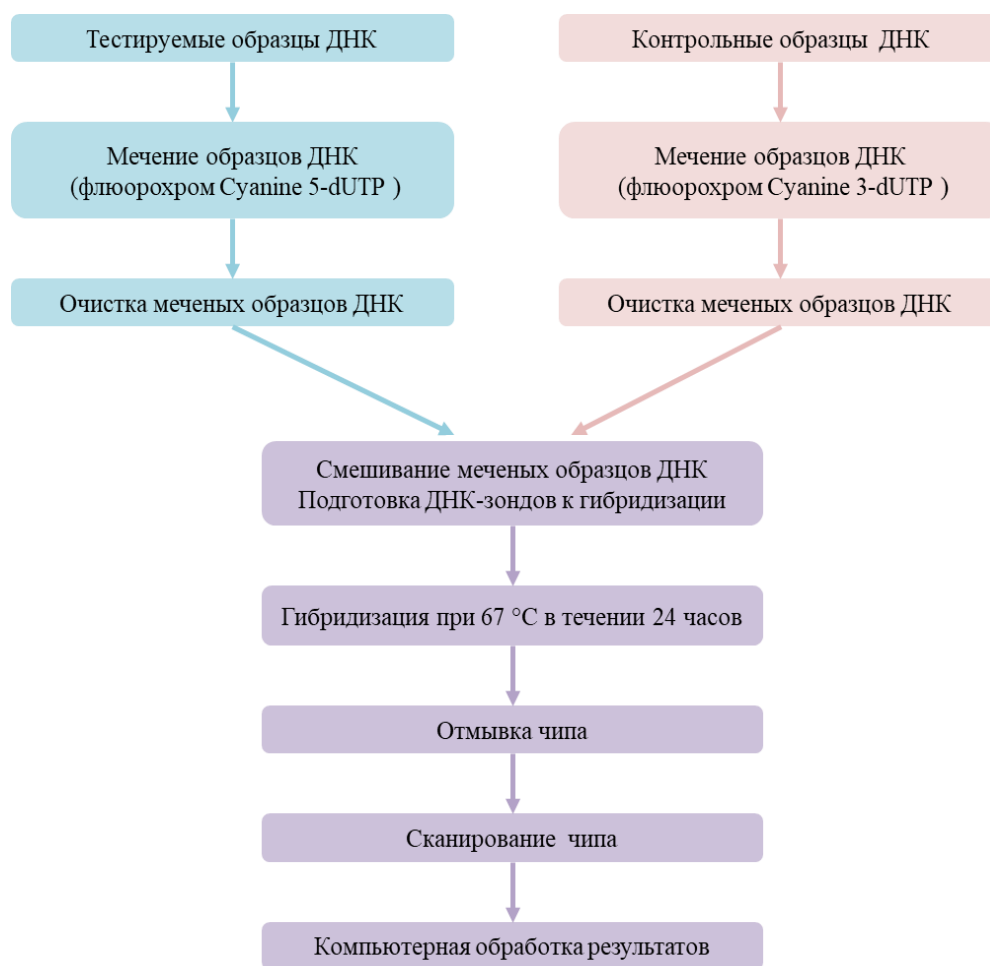


Рисунок 11 – Этапы матричной сравнительной геномной гибридизации

500 нг. Перемешивали случайный праймер «Random Primer» и добавляли по 2,5 мкл в каждую пробирку с 13 мкл раствора ДНК до конечного объема 15,5 мкл. Перемешивали все пробирки после добавления «Random Primer». Проводили денатурацию ДНК в течение 10 мин при температуре 98 °С в ДНК-амплификаторе «T100 Thermal Cycler» (Bio-Rad, США). После этого переносили образцы в штатив IsoFreeze.

Для мечения геномной ДНК готовили реакционную смесь «Master Mix», которая из расчета на один образец содержала 5 мкл «5×Buffer»; 2,5 мкл «10×dNTP»; 1,5 мкл «Cyanine 3-dUTP» (Cy3) (1,0 мМ) / «Cyanine 5-dUTP» (Cy5) (1,0 мМ) (для контрольной/тестируемой ДНК, соответственно) и 0,5 мкл фермента «Eco-Klenow fragment». В каждый образец добавляли по 9,5 мкл приготовленного «Master Mix», перемешивали, инкубировали образцы в ДНК-амплификаторе «T100 Thermal Cycler» в течение 2 ч при температуре 37 °С и 10 мин при 65 °С для инактивации фермента. После этого переносили образцы в штатив IsoFreeze.

2.5.2 Очистка меченых образцов

Центрифугировали меченые образцы в течение 1 мин при 6000 g для удаления конденсата со стенок и крышки пробирки. В колонки для очистки ДНК (Agilent Technologies, США) добавляли 430 мкл 1× ТЕ буфера (pH 8.0) и меченую ДНК, аккуратно перемешивали пипетированием. Образцы центрифугировали 10 мин при 14000 g при комнатной температуре. Удаляли фильтрат, после чего вновь добавляли в колонку 480 мкл 1× ТЕ буфера (pH 8.0), центрифугировали 10 мин при 14000 g при комнатной температуре. Колонки переворачивали, переносили в стерильные пробирки на 2 мл и центрифугировали 1 мин при 1000 g при комнатной температуре для извлечения очищенных меченых образцов ДНК (конечный объем 20–32 мкл). Образцы концентрировали в центрифужном испарителе «Concentrator plus» (Eppendorf, Германия), затем растворяли в 12 мкл 1× ТЕ буфера (pH 8.0). В 1 мкл образца с помощью спектрофотометра определяли выход ДНК.

С помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000» (опции MicroArray Measurement, DNA-50) оценивали концентрацию ДНК по показателю абсорбции при длине волны 260 нм, флуоресцентного красителя Cy3 – при 550 нм, флуоресцентного красителя Cy5 – при 650 нм (Рисунок 12).

Специфическую активность рассчитывали по формуле:

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{пмоль/мкл красителя}}{\text{мкг/мкл геномной ДНК}}$$

При изначальном содержании ДНК в растворе, равном 500 нг, специфическая активность Cy3-меченного образца составляла 20–35 пмоль/мкг, специфическая активность Cy5-меченного образца – 20–30 пмоль/мкг.

2.5.3 Подготовка меченой ДНК к гибридизации

Готовили рабочий раствор 10× блокирующего агента «Blocking Agent» путем добавления 1350 мкл стерильной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный 10× aCGH блокирующий агент. Раствор инкубировали при комнатной температуре 1 ч и перемешивали на мини-центрифуге Vortex (Biosan, Латвия). Рабочий раствор хранили при -20 °C.

Готовили гибридизационную смесь, которая из расчета на 1 образец содержала 2 мкл «Cot-1 DNA» (1 мг/мл), 4,5 мкл «10× Blocking Agent» и 22,5 мкл двукратного буфера для гибридизации «2× HI-RPM Hybridization Buffer». Смешивали в пробирке соответствующее рассчитанное количество меченых опытной и контрольной ДНК, добавляли 29 мкл

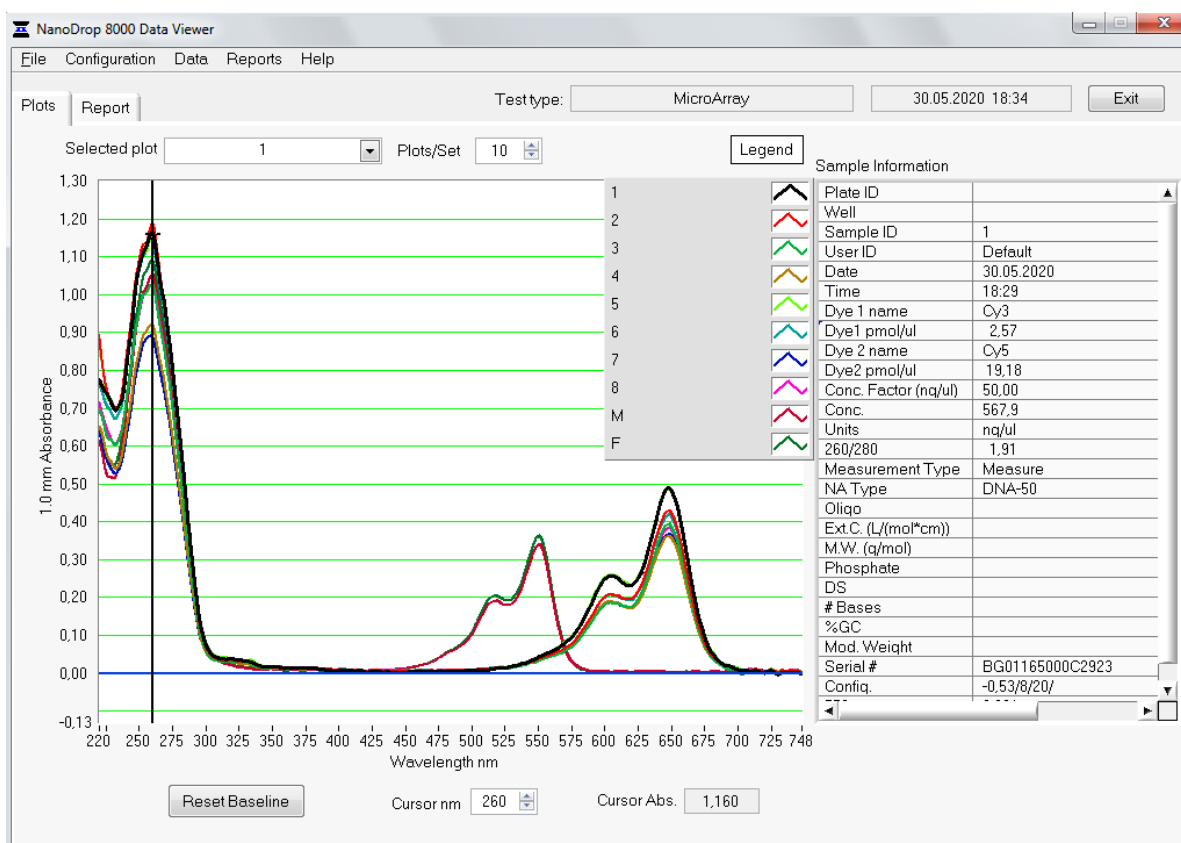


Рисунок 12 – Оценка мечения ДНК с помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000»

гибридизационной смеси, перемешивали пипетированием. Образцы инкубировали в течение 3 мин при 98 °С и 30 мин при 37 °С в ДНК-амплификаторе «T100 Thermal Cycler», затем центрифугировали в течение 1 мин при 6000 g.

2.5.4 Гибридизация и отмывка

Слайд с отсеками для образцов помещали в камеру «Agilent SureHyb». Медленно вносили 40 мкл гибридизационной смеси в каждый из 8 отсеков слайда. При этом остальные образцы до внесения их на слайд находились при 37 °С. После внесения всех образцов слайд с отсеками накрывали микрочиповым слайдом рабочей стороной (с надписью «Agilent») вниз. Слайды прочно прижимали друг к другу в камере. Вращали гибридизационную камеру для распределения смеси по всем 8 отсекам и оценки подвижности пузырька воздуха в них. Помещали камеру в гибридизационную печь и инкубировали в течение 24 ч при 20 об/мин и температуре 67 °С.

Для отмывки чипа использовали 2 буфера: «Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1» (отмывочный буфер 1) и «Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2» (отмывочный буфер 2). Второй отмывочный буфер предварительно нагревали до температуры 37 °С. Слайд с отсеками отделяли от микрочипового слайда в емкости с

буфером 1. После чего отмывали микрочиповый слайд в буфере 1 при комнатной температуре на магнитной мешалке в течение 5 мин, затем в буфере 2 в течение 1 мин. Извлекали слайд из буфера и помещали в держатель для слайдов. Сканирование проводили в сканере для чтения флуоресцентных сигналов с микрочипов «SureScan Microarray Scanner» (Agilent Technologies, США). Для анализа результатов использовали программы «Feature Extraction» (v. 12.0, Agilent Technologies, США) и «Cytogenomics» (v. 3.0.6.6, Agilent Technologies, США).

2.6 Полногеномное секвенирование ДНК фибробластов кожи

Секвенирование ДНК фибробластов кожи пациентов с моногенными реципрокными CNV проведено на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск (заведующий – д.б.н., профессор О.Л. Серов).

К культивируемым клеткам добавляли 0,25 % раствор трипсина (Sigma, США) и трижды промывали PBS. Геномную ДНК выделяли из фибробластов кожи пациентов с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6* (10-11 пассаж) с помощью стандартного метода фенол-хлороформной экстракции с предварительной обработкой протеиназой К в концентрации 20 мг/мл, СибЭнзим, Новосибирск) в течение 3–4 часов и проводили секвенирование парноконцевых прочтений (Illumina, США). Риды были выравнены на референсный геном (GRCh37) и проанализированы с помощью алгоритмов MANTA, CANVAS и SVDetect для выявления структурных вариаций [Chen et al., 2016; Roller et al., 2016; Zeitouni et al., 2010]. Кроме того, были секвенированы все 23 экзона гена *CNTN6*. Праймеры были подобраны с помощью ресурса Primer-BLAST. Список использованных праймеров представлен в статье Gridina с соавторами (2018). Секвенирование продуктов ПЦР выполнено с помощью набора для пробоподготовки BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) на приборе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (США) в соответствии с рекомендациями производителя.

2.7 Репрограммирование фибробластов кожи

Для выполнения этапа репрограммирования соматических клеток в Генетической клинике НИИ медицинской генетики при проведении стандартной процедуры биопсии получили 0,5 см² кожи предплечья пациентов с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6*, условно здорового носителя микродупликации *CNTN6* и здоровых доноров. Биопсийный материал дважды промывали раствором Хэнкса (HBSS) с содержанием 1 % раствора антибиотиков пенициллин/стрептомицин (Sigma, США), помещали в культуральную среду с содержанием 0,2 % коллагеназы (Sigma, США) на 3 ч при

температуре 37 °С. Фибробласты культивировали в среде DMEM (Gibco, США), с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и раствора антибиотиков пенициллин/стрептомицин с концентрацией 50 мг/мл (Gibco, США). С целью подтверждения наличия исследуемых хромосомных aberrаций в фибробластах пациентов (и их отсутствия у доноров) проведен анализ копийности гена *CNTN6* в клеточных культурах с помощью aCGH и qPCR.

Получение ИПСК проводили по протоколу, предложенному группой Яманака [Takahashi et al., 2007], с модификациями, увеличивающими эффективность перепрограммирования (в частности, с использованием вальпроевой кислоты). Линии ИПСК от пациентов и здоровых доноров были получены в сотрудничестве с Отделом молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН (заведующий – д.б.н, профессор О.Л. Серов) с помощью лентивирусных векторов LeGO (<http://www.lentigo-vectors.de/vectors.htm>), несущих репрограммирующие транскрипционные факторы OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC и репортерный ген *GFP* (green fluorescent protein), позволяющий оценивать эффективность трансфекции фибробластов лентивирусами по свечению зеленого флуоресцентного белка. Лентивирусы были получены с помощью клеточной линии HEK 293 Phoenix с использованием трансфекционного реактива Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Фибробласты трансдуцировали вирусами, несущими 4 репрограммирующих транскрипционных фактора в присутствии 5 мкг/мл полибрена (Millipore, США) в течение 2 дней (на второй день – без добавления c-MYC). До 10 дня ежедневно меняли культуральную среду с добавлением 1 мМ вальпроевой кислоты (Sigma-Aldrich, США). На 5 день трансдуцированные клетки высевали на чашки Петри (2×10^3 клеток /см²), содержащие обработанные митомицином-С фидерные клетки. Отбор колоний плюрипотентных клеток проводили на 19–24 дни после начала эксперимента.

ИПСК дополнительно культивировались для проведения стандартного цитогенетического анализа, подтвердившего отсутствие числовых и структурных перестроек в полученных линиях ИПСК. Кроме того, нами был проведен анализ копийности гена *CNTN6* в линиях ИПСК с микроделециями и микродупликациями 3p26.3 с помощью qPCR. Во всех линиях с микроделцией и микродупликацией *CNTN6* подтверждено уменьшение / увеличение числа копий гена *CNTN6*, соответственно.

Доказательство плюрипотентности выполнено тремя независимыми способами: 1) анализ экспрессии «маркерных генов плюрипотентности» в ИПСК методами ОТ-ПЦР (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *TDGF*, *ECAT15-1*, *TERT*, *REX1*, *PH34*) и иммунофлуоресцентного анализа (Nanog, Oct4, TRA-1-60, SSEA4); 2) дифференцировка ИПСК *in vitro* методом

формирования эмбрионидных телец в условиях суспензионной культуры с последующим проведением анализа маркеров трех зародышевых листков с помощью ОТ-ПЦР (*SOX1*, *PAX6*, *MAP2*, *BRACHYURY*, *FLK1*, *AFP*, *SOX17*) и иммунофлуоресцентного анализа; 3) дифференцировка ИПСК *in vivo* методом получения тератом у иммунодефицитных мышей линии SCID с последующим гистологическим анализом тератом.

Все полученные линии ИПСК криоконсервированы (не менее 5-ти образцов на разных пассажах от каждой линии).

2.8 Создание линии ИПСК с нокаутом гена *CNTN6*

Создание линий ИПСК с нокаутом гена *CNTN6* реализовано на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск (заведующий – д.б.н, профессор О.Л. Серов).

Для получения адресных мутаций в интактном аллеле гена *CNTN6* в линии iTAF3del17 созданы следующие компоненты системы CRISPR/Cas9:

- 1) вектор для экспрессии направляющей РНК (gRNA-CNTN6), содержащий gRNA и промотор U6. В качестве специфичной части gRNA выбрана 20-нуклеотидная последовательность AAGTGGAAATGAGGTTGCTATGG, включающая старт-кодон ATG гена *CNTN6* (подчеркнут) и фланкированная тринуклеотидом TGG (Рисунок 13).
- 2) вектор для гомологичной рекомбинации (pCNTN6_Arms_GFP), содержащий кодирующую часть гена GFP и стоп-кодон, фланкированный участками, гомологичными геномной ДНК человека в области старт-кодона гена *CNTN6*.
- 3) вектор для экспрессии гена Cas9 (phCas9-Neo), содержащий последовательность молекулы Cas9, промотора цитомегаловируса и гена устойчивости к неомицину.

Ко-трансфицировали gRNA-CNTN6 и плазмиду phCas9-Neo, обеспечивающую одновременную экспрессию гена *Cas9* и гена неомицин-резистентности, в клетки линии iTAF3del17. Суммарную популяцию клеток после трансфекции, содержащую 3–5 % целевых клеток, рассаживали на среду Matrigel. На следующий день добавляли в культуральную среду селективный антибиотик G418 (аналог неомицина). Оптимальный для выживаемости клеток режим селекции: добавление 400 мкг/мл G418 в течение первых двух дней после трансфекции, последующие 4 дня – 200 мкг/мл. Снижение концентрации G418 в культуре, начиная с третьего дня после трансфекции, обусловлено тем, что плазида phCas9-Neo присутствует в клетках лишь транзиторно, и со временем количество как белка Cas9, так и продукта гена неомицин-резистентности в трансфицированных клетках значительно снижается.

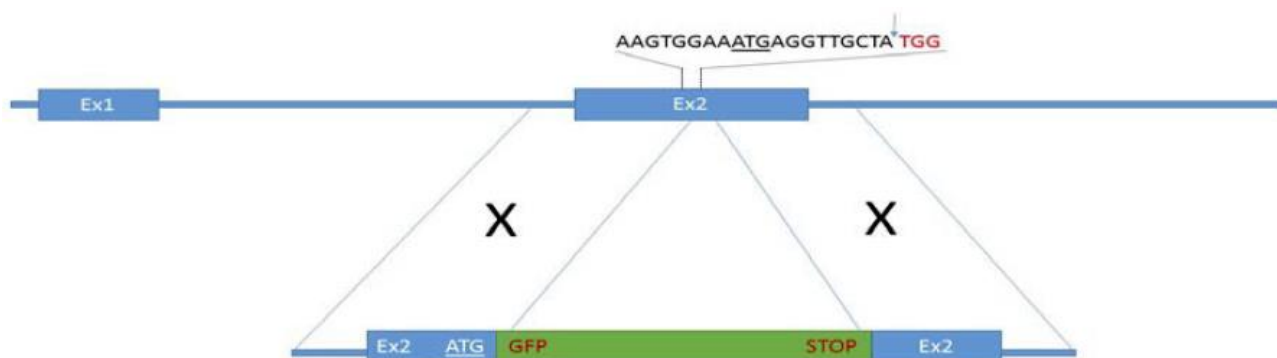


Рисунок 13 – Внесение направленной мутации в ген *CNTN6*. Сверху: эндогенный аллель гена *CNTN6* человека. Показаны первый нетранслируемый экзон (Ex1) и второй экзон (Ex2) гена *CNTN6* человека. Специфичная последовательность gRNA-*CNTN6*, включающая старт кодон ATG в виде выноски. Стрелка указывает место внесения в геном двухцепочечного разрыва системой CRISPR/Cas9. Снизу: вектор pCNTN6_Arms_GFP, содержащий кодирующую часть гена GFP и сигнал терминации трансляции (стоп-кодон), фланкированный участками, гомологичными геномной ДНК человека (участки гомологии обозначены символом «X»)

Через 2,5 недели после проведения селекции детектировали появление клонов ИПСК в культуре (серия клонов C9). Амплифицировали участок ДНК, включающий место предполагаемой мутации в гене *CNTN6* при помощи ПЦР. Наблюдали различие в электрофоретической активности амплифицированных участков ДНК. Для клонов с предполагаемой мутацией в гене *CNTN6* провели секвенирование участка генома в области предполагаемой мутации (смесь ПЦР-продуктов была клонирована в плазмиду, после чего проводилось секвенирование). Клоны, представленные только мутантными клетками, были использованы для дальнейшей работы.

2.9 Направленная дифференцировка линий ИПСК

Дифференцировка полученных линий ИПСК в нейрональном направлении проведена на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН по стандартному протоколу [Zhang et al., 2013b]. Для получения нейронов была использована система лентивирусных векторов для доставки в клетки двух генетических конструкций (Рисунок 14).

Одна из них содержала кДНК гена транскрипционного фактора нейрогенина-2 (Ngn2, для индукции дифференцировки) и гена устойчивости к пурамицину (Puro, для селекции клеток). В состав другой конструкции включен ген зеленого флуоресцирующего белка (EGFP), экспрессия которого надёжно позволяет маркировать трансфицированные вирусами клетки. Кроме того, в эксперименте использовалась доксициклин-индуцибельная система экспрессии генов, поэтому совместно с вирусами Ngn2:Puro и EGFP проводилась

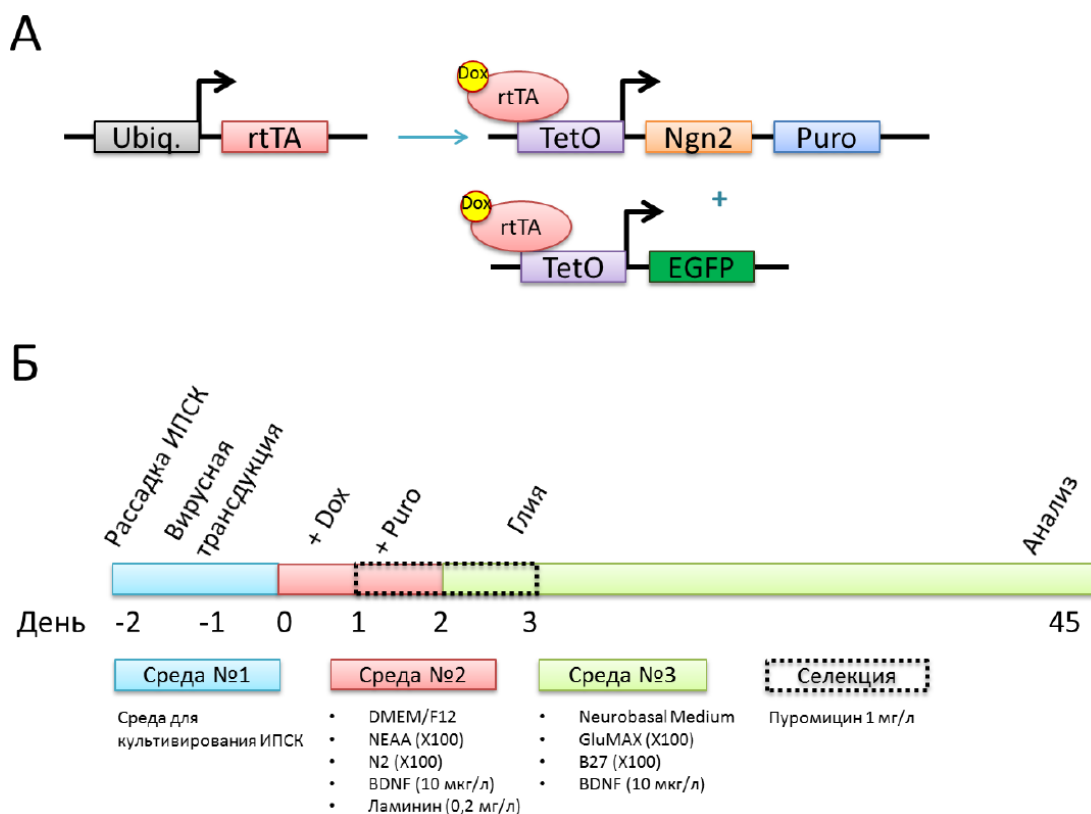


Рисунок 14 – Дизайн эксперимента по направленной дифференцировке линий ИПСК в нейроны. (А) Дизайн лентивирусных векторов, использованных для индукции дифференцировки ИПСК в нейроны; (Б) Схема эксперимента по индуцированной нейральной дифференцировке ИПСК с указанием состава сред и добавок

дополнительная трансфекция ИПСК вирусом, несущим ген белка-трансаактиватора (rtTA), который при добавлении доксициклина активируется, связывается со специфической последовательностью TetO, в результате чего активирует экспрессию целевого трансгена. Генетические конструкции были предоставлены проф. Т. С. Südhof, Stanford University School of Medicine (США).

Лентивирусы были получены с помощью клеточной линии Phoenix с использованием трансфекционного реактива Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. До дифференцировки ИПСК (пассажи 10-17) содержались на среде без фидера с использованием среды Matrigel hESC-Qualified Matrix (Corning, США). ИПСК были разделены с использованием TrypLE™ Express (Gibco, США) и пассажены в 6-луночные планшеты, содержащие среду Matrigel (3×10^5 клеток на лунку).

Клетки выращивались на среде mTeSR™1 (STEMCELL Technologies, Канада) с добавлением 10 мкМ ROCK ингибитора Y27632 (Abcam, Великобритания). На следующий день клетки были трансдуцированы лентивирусами в среде с содержанием 5 мкг/мл полибрена (Millipore, США). Множественность инфицирования оценивали с помощью проточного цитометра BD FACSAria (MOI > 10). Для индукции экспрессии гена Ngn2 в

трансдуцированных ИПСК, на следующий день после трансдукции добавляли 2 мкг/мл доксицилина (DOX; Sigma-Aldrich, США) в культуральную среду DMEM/F12, содержащую 1 % раствора заменимых аминокислот MEM NEAA (Gibco), 1 % раствора пенициллина/стрептомицина Pen Strep (Gibco), 1 % добавки N2-supplement, рекомбинантный человеческий белок BDNF (10 нг/мл) (Gibco), раствор ламинина мыши (0,2 мкг/мл, Sigma, США) и рекомбинантный белок нейротрофин-3 NT-3 (10 нг/мл, PeproTech, Великобритания). Клетки, экспрессирующие Ngn2, были отобраны с помощью пуромицина (1 нг/мл, Gibco, США) на следующий день после добавления доксицилина. Равные количества клеток (45×10^3 клеток/см²) были рассажены в планшеты с обработанными митомицином-С фидерными клетками на следующий день после селекции пуромицином. Начиная с этого дня и до конца дифференцировки, клетки культивировали в среде Neurobasal Medium (Gibco) с содержанием 2 % добавки B27 supplement (Gibco, США), 1 % GlutaMAX-I (Gibco, США), 1 % раствора пенициллина/стрептомицина Pen Strep (Gibco, США), рекомбинантного человеческого белка BDNF (10 нг/мл, Gibco, США) и рекомбинантного белка нейротрофин-3 NT-3 (10 нг/мл, PeproTech, Великобритания). Полная дифференцировка ИПСК занимала 45 дней.

Оценка корректной нейрональной дифференцировки произведена с помощью иммуноокрашивания с антителами к Tubb3, NF-H, MAP2, SYP и PSD95, а также электрофизиологического исследования полученных нейронов.

2.10 Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из культур нейронов проведено с использованием TRI Reagent в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Sigma-Aldrich, США). К суспензии клеток добавляли 1 мл TRI Reagent, периодически пипетировали. Оставляли пробирки на 5 мин при комнатной температуре, добавляли 0,2 мл хлороформа, закрывали эппендорф, энергично стряхивали, оставляли еще на 15 мин при комнатной температуре. Центрифугировали в течение 15 мин при 12000 g при температуре 4 °C, после чего смесь в пробирке разделялась на 3 фазы: красная органическая фаза (содержала белок), интерфаза (ДНК) и бесцветная верхняя водная фаза (РНК).

Переносили водную фазу в новый эппендорф и добавляли 0,5 мл изопропанола, перемешивали на центрифуге-вортекс «Microspin». Оставляли образец на 10 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g при температуре 4 °C, при этом осадок РНК оставался на дне и стенках пробирки. Удаляли супернатант и добавляли 1 мл 75 % этилового спирта. Перемешивали на центрифуге-вортекс. Сушили РНК в центрифужном испарителе в течение 5 мин при температуре 30 °C.

Добавляли 1 мкл ингибитора рибонуклеазы и 30 мкл воды, свободной от РНКаз для растворения РНК, хранили при -80 °С.

2.11 Анализ генной экспрессии с помощью ДНК-микрочипов

Оценку уровня экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделецией, микродупликацией и нокаутом гена *CNTN6*, а также здоровых индивидов, проводили с использованием экспрессионного анализа на микрочипах (Рисунок 15) «SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v3 Microarray Kit» (Agilent Technologies, США), содержащих последовательности 26083 РНК-транскриптов белок-кодирующих генов и 30606 транскриптов длинных некодирующих РНК в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (v. 6.9.1, Agilent Technologies, США).

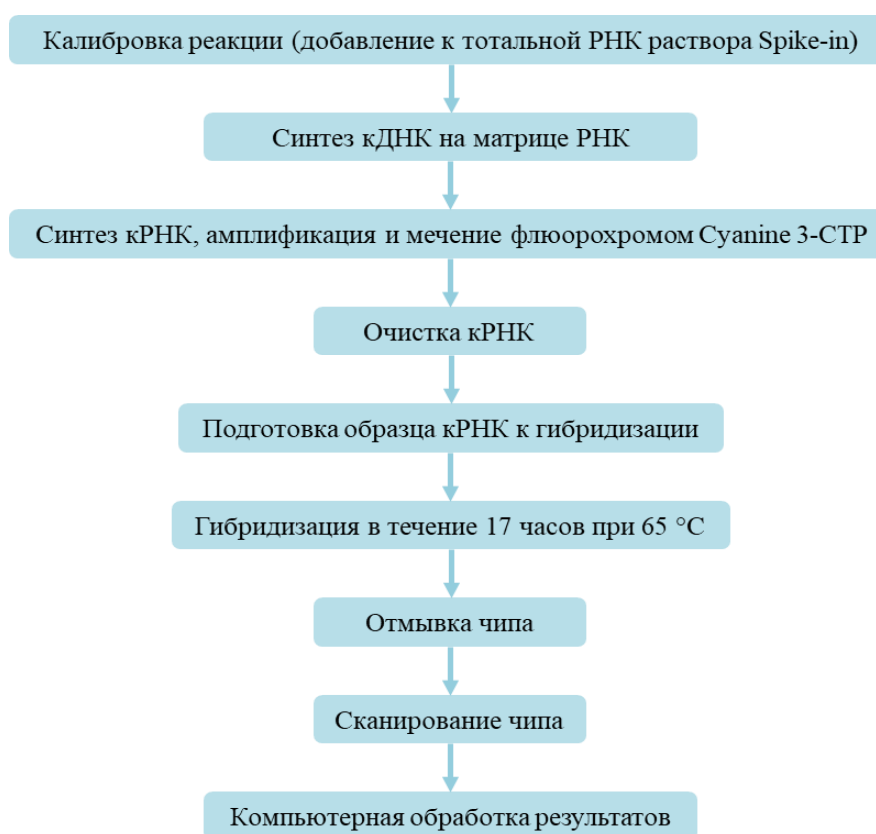


Рисунок 15 – Этапы транскриптомного анализа на микрочипах

2.11.1 Проверка качества РНК

Проверку качества тотальной РНК, выделенной из нейронов и мышинных глиальных клеток, проводили с помощью биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США), в основе работы которого заложен метод капиллярного электрофореза РНК на чипе. Для оценки целостности РНК определяли RIN (RNA integrity number).

В начале работы промывали электроды биоанализатора с использованием специального промывочного чипа с 350 мкл RNaseZAP в течение 1 мин, затем заменяли промывочный чип на новый с водой, свободной от РНКаз, и погружали в него электроды на 10 с. Ждали еще 10 с, пока вода на электродах испарится. Подготавливали рабочую станцию для заливки геля с новым чипом и запускали программу «2100 Expert Software».

Оставляли реактивы на 30 мин при комнатной температуре (краситель должен быть защищен от света). Перемешивали краситель «RNA 6000 Nano dye concentrate» в течение 10 с, затем сбрасывали капли со стенок и крышки пробирки. Добавляли 1 мкл красителя к 65 мкл геля для электрофореза (приготовлен заранее, отфильтрован, аликвотирован) и тщательно перемешивали. Центрифугировали в течение 10 мин при комнатной температуре при 13000 g. Добавляли 9 мкл смеси краситель-гель в маркированную ячейку на чипе (G). Закрывали рабочую станцию (до щелчка), быстро опускали поршень шприца (до фиксатора), ждали в течение 30 с. По истечении времени аккуратно освобождали поршень шприца и ждали, пока он остановится, затем поднимали его до отметки 1 мл. Открывали рабочую станцию, вносили в оставшиеся маркированные ячейки (G) по 9 мкл смеси краситель-гель. Вносили во все оставшиеся ячейки маркер «RNA 6000 Nano marker». Предварительно размораживали и нагревали смесь фрагментов РНК известной длины в течение 2 мин при 70 °С, затем вносили 1 мкл смеси в маркированную ячейку. Вносили 1 мкл РНК в ячейки для опытных проб. Помещали чип с образцами в вортекс «IKA MS 3 S36 Basic Chip Vortex», встряхивали в течение 60 с при 2400 об/мин. Помещали чип в биоанализатор, запускали программу, анализировали целостность РНК по значению RIN, форме и количеству пиков на электрофореграмме (Рисунок 16).

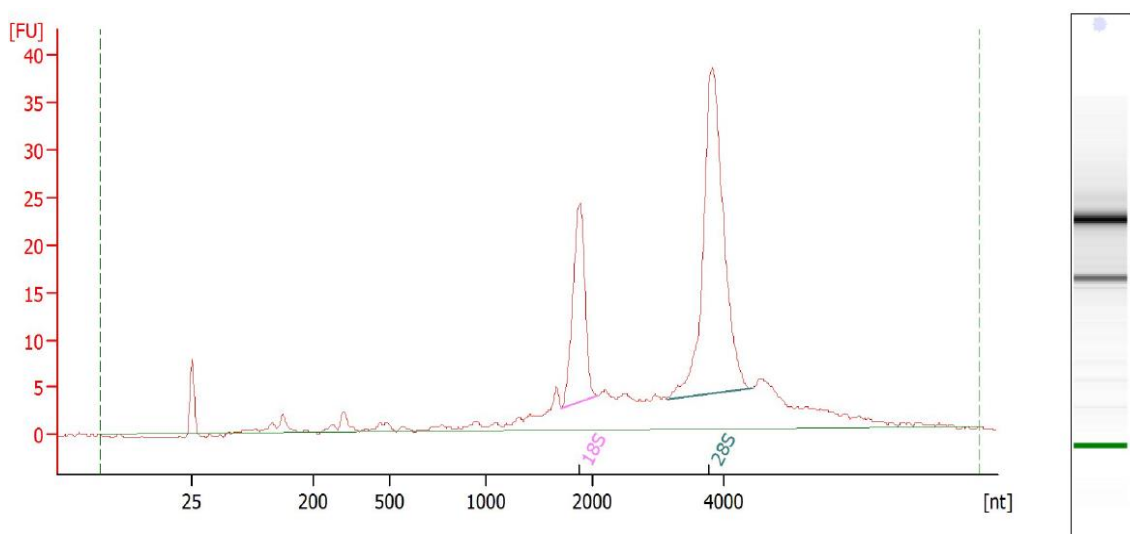


Рисунок 16 – Оценка целостности РНК с помощью биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США)

2.11.2 Калибровка измерений микроматричного анализа

Калибровку реакции проводили с помощью добавления к РНК соответствующего разведения раствора «RNA Spike-in», который представляет собой смесь молекул РНК известной последовательности и длины. Степень гибридизации между молекулами «RNA Spike-in» и контрольными зондами использовалась для нормализации измерений гибридизации образца РНК.

Проводили последовательные разведения «Spike Mix» для добавления к расчетному количеству РНК (Таблица 4). Для последующего анализа и нормализации результатов необходимо, чтобы начальное количество РНК в каждом образце совпадало.

Таблица 4 – Разведения «Spike Mix» для мечения РНК флуорохромом Cyanine 3-СТР

Начальное количество тотальной РНК, нг	Серии разведений				Объем «Spike Mix» для последующих разведений, мкл
	первое	второе	третье	четвертое	
10	1:20	1:25	1:20	1:10	2
25	1:20	1:25	1:20	1:4	2
50	1:20	1:25	1:20	1:2	2
100	1:20	1:25	1:20		2
200	1:20	1:25	1:10		2

Для образцов с начальным количеством РНК, равным 100 нг, брали стоковый раствор «Spike Mix», размораживали, перемешивали на центрифуге-вортекс «Microspin», инкубировали в течение 5 мин при 37 °С, затем вновь перемешивали и сбрасывали капли с крышки и стенок пробирки. В новом эппендорфе с надписью «Разведение 1» растворяли 2 мкл «Spike Mix» в 38 мкл буфера для разведения «Dilution Buffer» (1:20). Тщательно перемешивали и оставляли на 5 мин. В новом эппендорфе с надписью «Разведение 2» растворяли 2 мкл из эппендорфа «Разведение 1» в 48 мкл буфера для разведения «Dilution Buffer» (1:25). Тщательно перемешивали и оставляли на 5 мин. В новом эппендорфе с надписью «Разведение 3» растворяли 2 мкл из эппендорфа «Разведение 2» в 38 мкл буфера для разведения «Dilution Buffer» (1:20).

В каждую пробирку объемом 200 мкл добавляли 1,5 мкл раствора РНК, содержащую 100 нг РНК, и 2 мкл раствора «Spike Mix» («Разведение 3») до конечного объема 3,5 мкл.

2.11.3 Последовательный синтез кДНК на матрице РНК

Для синтеза кДНК на матрице РНК готовили реакционную смесь «T7 Primer Mix», которая из расчета на один образец содержала 0,8 мкл T7-Primer и 1 мкл воды, свободной от нуклеаз. Добавляли по 1,8 мкл смеси «T7 Primer Mix» к пробиркам с РНК и Spike-in до конечного объема 5,3 мкл. Инкубировали в течение 10 мин при температуре 65 °С в ДНК-амплификаторе «T100 Thermal Cycler», затем помещали образцы в штатив IsoFreeze на 5 мин.

Инкубировали «5× First Strand Buffer» в течение 4 мин при температуре 80 °С, перемешивали на центрифуге-вортекс «Microspin», сбрасывали капли с крышки и стенок пробирки. Готовили реакционную смесь «cDNA Master Mix», которая из расчета на один образец содержала 2 мкл «5× First Strand Buffer», 1 мкл «0.1M DTT», 0,5 мкл «10mM dNTP Mix» и 1,2 мкл «Affinity Script RNase Block Mix» (содержит смесь ферментов, добавляли в последнюю очередь). Добавляли в каждую пробирку по 4,7 мкл смеси «cDNA Master Mix» до конечного объема 10 мкл, аккуратно перемешивали на центрифуге-вортекс, инкубировали в ДНК-амплификаторе в течение 2 ч при температуре 40 °С, в течение 15 мин при температуре 70 °С, затем помещали образцы в штатив IsoFreeze.

2.11.4 Синтез кРНК, амплификация и мечение

Для синтеза кРНК на матрице кДНК готовили реакционную смесь «Transcription Master Mix», которая из расчета на один образец содержала 0,75 мкл воды, свободной от нуклеаз, 3,2 мкл «5× Transcription Buffer», 0,6 мкл «0.1 M DTT», 1 мкл «NTP Mix», 0,24 мкл «Cyamine 3-CTP» и 0,21 мкл «T7 RNA Polymerase Blend» (содержит смесь ферментов, добавляли в последнюю очередь). Добавляли в каждую пробирку по 6 мкл смеси «Transcription Master Mix» до конечного объема 16 мкл. Инкубировали образцы в амплификаторе в течение 2 ч при 40 °С.

2.11.5 Очистка образцов кРНК после мечения

Для очистки меченой кРНК использовали набор «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, Германия). Заранее охлаждали центрифугу до 4 °С. Готовили буфер «RPE» (из расчета 1 часть буфера + 4 части спирта): 200 мкл стокового раствора буфера и 800 мкл 96 % этилового спирта. Добавляли 84 мкл воды, свободной от нуклеаз, к каждому образцу меченой кРНК до конечного объема 100 мкл, переносили содержимое пробирок в новые эппендорфы объемом 1,5 мл. Добавляли 350 мкл буфера «RLT» и 250 мкл 96 % этилового спирта, переносили содержимое пробирок на колонки для очистки РНК. Центрифугировали в течение 60 с при 13000 об/мин, удаляли из пробирок фильтрат. Добавляли 500 мкл буфера

«RPE», центрифугировали 60 с при 13000 об/мин, удаляли из пробирок фильтрат (повторяли данный пункт дважды). Центрифугировали пустые пробирки с колонками в течение 60 с при 13000 об/мин. Переносили колонки в новые пробирки объемом 1,5 мл. Для элюирования кРНК с мембраны колонки добавляли 30 мкл воды, ждали 60 с, центрифугировали в течение 60 с при 13000 об/мин. Переносили пробирки с очищенной кРНК на лед.

С помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000» (опции MicroArray Measurement, RNA-40) оценивали концентрацию кРНК, красителя и абсорбцию РНК на длинах волн 260 нм и 280 нм (Рисунок 17).

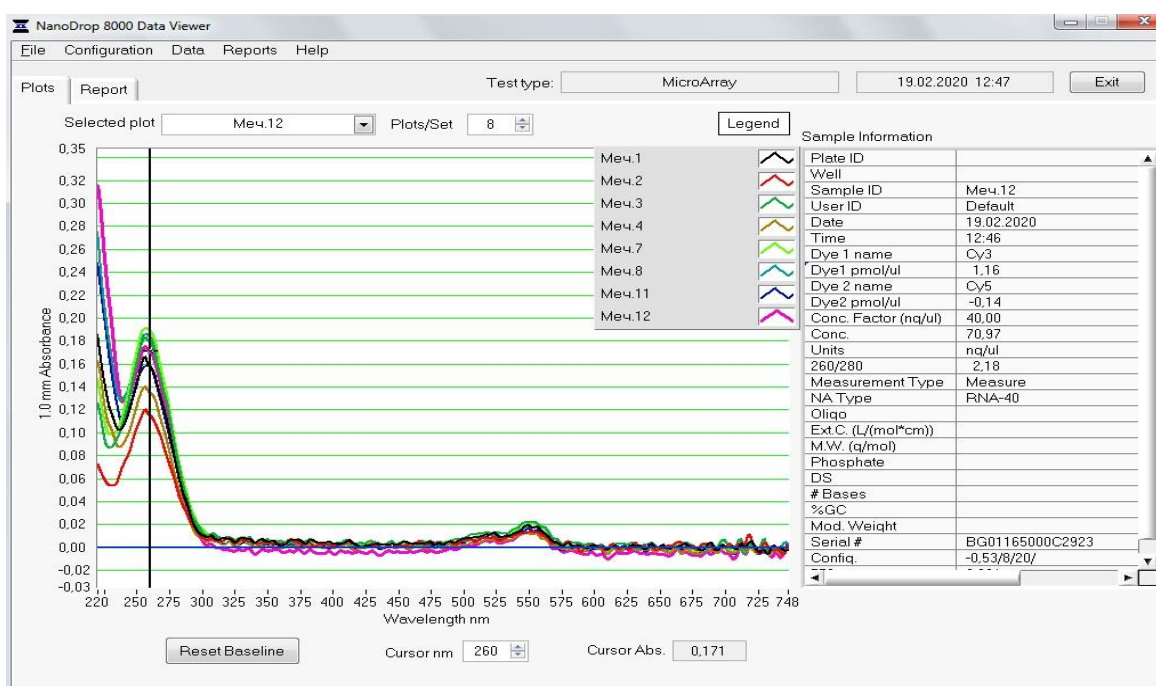


Рисунок 17 – Оценка качества мечения кРНК с помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000»

Специфическую активность рассчитывали по формуле (рекомендованное значение специфической активности для образца кРНК ≥ 6):

$$\text{Специфическая активность} = \frac{\text{пмоль/мкл красителя}}{\text{мкг/мкл кРНК}}$$

2.11.6 Подготовка кРНК к гибридизации

Готовили рабочий раствор блокирующего агента «10× Gene Expression Blocking Agent» путем добавления 1250 мкл стерильной воды в пробирку, содержащую лиофилизированный 10× аCGH блокирующий агент. Перемешивали содержимое пробирки на центрифуге-вортекс «Microspin» (Biosan, Латвия). Рабочий раствор «10× Gene Expression Blocking Agent» аликвотировали и хранили при -20 °C.

Готовили гибридизационную смесь: смешивали раствор меченой кРНК с содержанием РНК 600 нг, 5 мкл «10× Gene Expression Blocking Agent», 1 мкл «25× Fragmentation Buffer» и доводили объем смеси до 25 мкл водой, свободной от нуклеаз. Инкубировали смесь в течение 30 мин при 60 °С для фрагментации кРНК и переносили образцы на лед. Для остановки реакции добавляли в пробирки 25 мкл «2× Hi-RPM Hybridization Buffer», осторожно перемешивали пипетированием, избегая образования пузырей.

2.11.7 Гибридизация и отмывка

Слайд с отсеками для образцов помещали в камеру Agilent SureHyb. Медленно вносили 40 мкл гибридизационной смеси в каждый из 8 отсеков слайда. После внесения всех образцов слайд с отсеками накрывали микрочиповым слайдом рабочей стороной с надписью «Agilent» вниз. Слайды прочно прижимали друг к другу в камере. Вращали гибридизационную камеру для распределения смеси по всему отсеку и оценки подвижности пузырька воздуха в нем. Помещали камеру со слайдами в гибридизационную печь и инкубировали в течение 17 ч при 10 об/мин и 65 °С.

Для отмывки слайдов использовали 2 буфера: «Gene Expression Wash Buffer 1» (отмывочный буфер 1) и «Gene Expression Wash Buffer 2» (отмывочный буфер 2). Второй отмывочный буфер предварительно нагревали до 37 °С. Слайд с отсеками отделяли от микрочипового слайда в емкости с буфером 1. Отмывали микрочиповый слайд в буфере 1 при комнатной температуре на магнитной мешалке в течение 1 мин, затем в буфере 2 в течение 1 мин. Извлекали слайд из буфера и помещали в держатель для слайдов. Сканирование проводили в сканере для чтения флуоресцентных сигналов с микрочипов «SureScan Microarray Scanner» (Agilent Technologies, США) с использованием цветового профиля AgilentG3_GX_1Color Profile программного обеспечения Agilent ScanControl 8.1.3 (Agilent Technologies). Полученный при сканировании микрочипа TIF-файл использовали в программе «Feature Extraction» (v. 10.7.3.1, протокол GE1_107_Sep09, Agilent Technologies, США) для извлечения данных об интенсивности флуоресцентного сигнала.

2.12 Биоинформатический анализ и функциональная аннотация ДЭГ

Биоинформатический анализ выполнен в программной среде R с использованием пакета *limma* [Ritchie et al., 2015]. Проведена квантильная нормализация и кластеризация полученных данных об интенсивности сигнала каждой гибридизовавшейся на чипе пробы. Из дальнейшего анализа исключены данные об экспрессии генов в образцах iNAF1nor6 (1), iTAF2nor5 (1) и iTAF4dup22 (3) вследствие неадекватных результатов кластеризации. Для

получения списка ДЭГ был выбран Байесовский статистический анализ с поправкой на множественную проверку гипотез (метод Бенджамини-Хохберга) с уровнем значимости (скорректированное значение $p\text{-value}$) $< 0,05$. Значения параметров выбранной модели ROBUST и TREND, которые предотвращают влияние гипер- и гиповариабельных генов в выборках на результат анализа, были установлены как «истинные» (true) [Phipson et al., 2016]. Уровни экспрессии в сравниваемых группах отличались минимум в 2 раза. Из конечного списка ДЭГ были исключены гены, экспрессирующиеся в мышинных глиальных клетках (образцы mGlia (1, 2)).

Для выявления функциональных групп генов был проведен анализ обогащения генов с помощью ресурса WEB-based GENE Set Analysis Toolkit [<http://www.webgestalt.org/option.php>] со следующими установленными параметрами (Таблица 5). Древовидные карты были построены в программной среде R с использованием пакета *treemap*.

Таблица 5 – Параметры, установленные в программе WebGestalt

Метод	Анализ обогащения (Over-Representation Analysis)
Базы данных	- Генная онтология (Биологический процесс, Локализация, Функция в клетке) - Фенотип (Онтология фенотипа человека)
Референсный набор генов	Agilent Sureprint G3 GE 8×60k v2
Поправка на множественную проверку гипотез	Метод Бенджамини-Хохберга
Уровень значимости	TOP 50 (обогащенные категории ранжируются согласно P_{FDR} , а затем выбираются 50 наиболее значимых категорий)
Число категорий после уменьшения избыточности	20
Число категорий, представленных в отчете	50
Уменьшение избыточности списка категорий	Метод взвешенного покрытия множества (Weighted set cover)

2.13 Валидация результатов микрочипового анализа

2.13.1 Очистка образцов РНК методом ДНКазной обработки

ДНКазную обработку РНК проводили с помощью набора Fermentas согласно рекомендациям производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Готовили реакционную смесь: в пробирку добавляли раствор РНК (1 мкг), 1 мкл 10× реакционного буфера с $MgCl_2$, 1 мкл раствора ДНКазы, свободного от РНКаз. Доводили объем смеси до 10 мкл водой

высокой степени очистки, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК). Добавляли к реакционной смеси 0,25 мкл ингибитора РНКаз «RiboLock» (Thermo Fisher Scientific, США). Инкубировали смесь в течение 30 мин при 37 °С. Для остановки реакции добавляли 1 мкл 50 мМ раствора ЭДТА и инкубировали в течение 10 мин при 65 °С. После окончания реакции переносили образцы на лёд.

2.13.2 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией

Добавляли следующие реагенты в стерильную, свободную от нуклеаз пробирку на льду в следующем порядке: раствор РНК после ДНКазной обработки (1 мкг), 1 мкл олиго(dT)16 праймера, 0,5 мкл ингибитора РНКаз «RiboLock». Доводили объем реакционной смеси до 12 мкл водой, обработанной ДЭПК. Аккуратно перемешивали и сбрасывали капли центрифугированием. Прогревали смесь 3 мин при 70 °С для расплавления вторичных структур и перемещали пробирку на лёд. Добавляли в пробирку предварительно приготовленную смесь следующего состава: 4 мкл 5× реакционного буфера с KCl, 2 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотдифосфатов, 1 мкл «М-MuLV-RH» ревертазы (100 ед./мкл). Аккуратно перемешивали и сбрасывали капли центрифугированием. Инкубировали 10 мин при 25 °С и затем 60 мин при 42 °С. Останавливали реакцию нагревом реакционной смеси до 70 °С в течение 10 мин. Переносили пробирки на лёд.

Количественная ПЦР была проведена с использованием шести пар праймеров (*CNTN6*, *CHL1*, *NOTCH1*, *CBLN2*, *OXR1*, *PEG3*) и одной пары контрольных праймеров на ген *TFRC* (Таблица 6). Подбор праймеров, проверку специфичности проводили с использованием программ, описанных в подпункте 2.3 главы 2.

ПЦР на кДНК нейронов, полученных из ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*, проводили в ПЦР-боксе в соответствии с составленным протоколом. Для каждого образца реакцию проводили в двух повторностях. Сначала в каждую лунку планшета вносили 1 мкл кДНК нейронов и помещали на холодовой планшет. Далее для каждой пары праймеров смешивали следующие реакционные компоненты из расчета на одну лунку: 6,5 мкл воды, свободной от ДНКаз и РНКаз, 2,5 мкл прямого и 2,5 мкл обратного праймера, 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия).

Вносили смесь в лунки в соответствии с протоколом проведения ПЦР. Планшет накрывали оптически прозрачной пленкой. Центрифугировали планшет в центрифужном испарителе «Concentrator plus» (Eppendorf, Германия) в течение 1 мин со скоростью 1000 об/мин. ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе «AriaMx Real-Time PCR System» (Agilent Technologies, США) при следующих условиях:

Таблица 6 – Структура праймеров для валидации результатов экспрессионного анализа

Регион	Праймер	Последовательность
3p26.3	CNTN6_F	5'-TTTGTTCACCTGATTGTATGG-3'
	CNTN6_R	5'-GAAGAGTTTATGAGTGGCAGCA-3'
3p26.3	CHL1_F	5'-TCTTGGGAACAGCCACTCAC-3'
	CHL1_R	5'-GGTTCTCCTTCAGCCTCACA-3'
9q34.3	NOTCH1_F	5'-TGAATGAGTCTGTTGTGTGTCA-3'
	NOTCH1_R	5'-AATCAACATCTTGGGACGCA-3'
18q22.3	CBLN2_F	5'-TGTATTGTCGTCCCAACGGA-3'
	CBLN2_R	5'-ATGTCAAGGACTGTCCAGCA-3'
8q23.1	OXR1_F	5'-GCAACAACTAAACAGCAAAGGG-3'
	OXR1_R	5'-GTGCAGAACTTTCTATGTGTCCA-3'
19q13.43	PEG3_F	5'-ACCCTGTCAATCAAGGCTCA-3'
	PEG3_R	5'-GTACTCCCGACTGTCAACCA-3'
3q29	TFRC_F	5'-AGGTGTAGTGGAAGTATCTGCT-3'
	TFRC_R	5'-CAATAGCCCAAGTAGCCAATCA-3'

1) Предварительная денатурация: 95 °C – 7 мин

2) 45 циклов:

– денатурация: 95 °C – 30 с

– отжиг и элонгация: 60 °C – 45 с

Детекция флуоресцентного сигнала проводилась в конце каждого цикла после этапа элонгации. После завершения реакции для анализа экспрессии гена использовали $\Delta\Delta C_t$ метод. Расчет производили в программе Microsoft Excel (Microsoft, США).

После проведения реакции оценивали C_t каждого образца – номер цикла, на котором уровень флуоресценции начинал превышать фоновый шум. Рассчитывали среднее C_t двух повторностей для контрольного и целевого генов. Далее считали ΔC_t по формуле:

$$\Delta C_t = C_t (\text{целевой ген}) - C_t (\text{контрольный ген})$$

Рассчитывали среднее ΔC_t (average ΔC_t) для образцов, полученных от индивидов с различным кариотипом (пациента с микроделецией *CNTN6* и его сестры, пациента с микродупликацией *CNTN6* и его клинически здорового отца, а также образцов с нокаутом гена *CNTN6*). Считали $\Delta\Delta C_t$ по формуле: по формуле:

$$\Delta\Delta C_t = \text{average } \Delta C_t (\text{целевой ген}) - \text{average } \Delta C_t (\text{контрольный ген})$$

Относительное изменение экспрессии генов рассчитывали по формуле:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

На снижение экспрессии целевого гена в опытных образцах относительно контрольных образцов без хромосомной мутации указывало значение «Fold change», не превышающее единицы.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Частота микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития

Одной из задач настоящего исследования являлась оценка распространенности микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе пациентов с нервно-психическими заболеваниями и здоровых индивидов. Для подсчета частоты микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3 мы воспользовались результатами скрининга пациентов с интеллектуальными нарушениями и задержкой развития, проведенного методами aCGH (объем выборки $n = 870$) и qPCR ($n = 200$), пациентов с клиническим диагнозом шизофрении (метод qPCR, $n = 86$) и здоровых индивидов (метод qPCR, $n = 200$). При проведении данного исследования нами не было выявлено ни одного нового индивида с измененным числом копий гена *CNTN6*.

Для 86 пациентов с шизофренией проведен ПЦР-анализ микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3. Данные о вероятном носительстве микродупликаций *CNTN6* получены для 6 пациентов (Приложение В, Таблица В.1). Для уточнения точек разрыва была проведена aCGH, результаты которой не подтвердили наличие выявленных при qPCR CNV (Таблица 7). Тем не менее, у одного пациента была выявлена потенциально патогенная мутация – микродупликация региона 11q22.3, которая может быть ассоциирована с нарушением психического развития.

Гены *CARD16*, *CARD17*, *CARD18*, локализованные в регионе 11q22.3, кодируют домены активации и рекрутирования каспаз. По данным литературы, продукт гена *CARD18* выступает в качестве отрицательного регулятора активации воспаления и может быть вовлечен в патогенез псориаза [Göblös et al., 2016]. Продукты генов *CASP1*, *CASP4*, *CASP5* и *CASP12* кодируют молекулы каспаз, протеолитических ферментов, играющих важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспаления. SNP в гене *CASP12* приводит к синтезу полной молекулы профермента Csp12L, что может рассматриваться в качестве фактора риска развития сепсиса. Показано, что продукты данных генов вовлечены в патогенез различных нейродегенеративных состояний (болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, хореи Гентингтона и др.) [Wang et al., 2017]. У пациентов с шизофренией выявлена повышенная экспрессия гена *CASP1* [Ni et al., 2020]. Дифференциальная экспрессия гена *CASP4* показана для нейронов, полученных от пациентов с шизофренией, БАР и индивидов без психических расстройств при посмертном исследовании [de Baumont et al., 2015]. Стоит отметить, что усиление экспрессии проапоптотических белков рассматривается в качестве одного из возможных этиологических факторов развития психических нарушений, в частности,

Таблица 7 – Результаты молекулярного кариотипирования пациентов с шизофренией

Пациент	Результаты aCGH (ISCN 2020)	Протяженность перестройки	Гены в регионе перестройки
SCH647	arr(X,1–22)×2	—	—
SCH446	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	—	—
SCH773	arr[hg19] 11q22.3(104050764_105252671)×3	1,2 м.п.н.	<i>CASP1, CASP4, CASP4LP, CASP5, CASP12, CARD16, CARD17, CARD18 MIR7641-1, LINC02552</i>
SCH443	arr[hg19] 3q12.2(100354612_100428336)×3	73,7 т.п.н.	<i>GPR128, TFG1</i>
KS203	arr(X,1–22)×2	—	—
SCH180	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	—	—

шизофрении [Catts et al., 2006]. Высказано предположение о локальном апоптозе в коре головного мозга пациентов с шизофренией, приводящем к потере терминалей аксона, но не сомы нейрона, и уменьшению плотности синаптических контактов [Glantz et al., 2006].

На сегодняшний момент в литературе представлена информация о 103 пациентах с микроделециями и микродупликациями, затрагивающими ген *CNTN6*. Поскольку микроструктурные aberrации гена *CNTN6* у родственников в одной семье не могут быть рассмотрены как изолированные отдельные случаи хромосомной аномалии, общее число мутационных событий составило 100. Для 97 из 100 событий в литературе доступны данные об объемах выборок, в которых были проведены исследования (68942 индивида). С учетом описанных нами ранее пациентов и данных литературы оценена суммарная частота микроделений и микродупликаций, затрагивающих единственный ген *CNTN6*, которая составила 1 : 711 (0,14 %) (Приложение В, Таблица В.2). Стоит отметить, что хромосомные мутации, затрагивающие ген *CNTN6*, также встречаются у здоровых людей [Huang et al., 2017; Mercati et al., 2017]. С учетом результатов настоящего исследования, а также данных литературы частота микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке здоровых индивидов составила 1 : 917 (0,11 %) (17 случаев выявленных CNV в контрольной выборке объемом 15596 человек). Соотношение случаев микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* среди здоровых индивидов составило 1 : 4,7. Примечательно, что аналогичный показатель в группе пациентов составил 1 : 1,3. Таким образом, в группе здоровых индивидов в сравнении с группой пациентов с нарушением нервно-психического развития

отмечено статистически значимое преобладание микродупликаций гена *CNTN6* (точный критерий Фишера, $p = 0,0372$) (Рисунок 18). Следовательно, отсутствие фенотипических проявлений перестройки у индивида более вероятно в случае наличия у него микродупликации *CNTN6*. Недостаток микроделений среди всех выявленных хромосомных мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе здоровых индивидов, вероятно, может указывать, с одной стороны, на их более тяжелое клиническое проявление, а с другой – на неполную пенетрантность микродупликаций *CNTN6*.

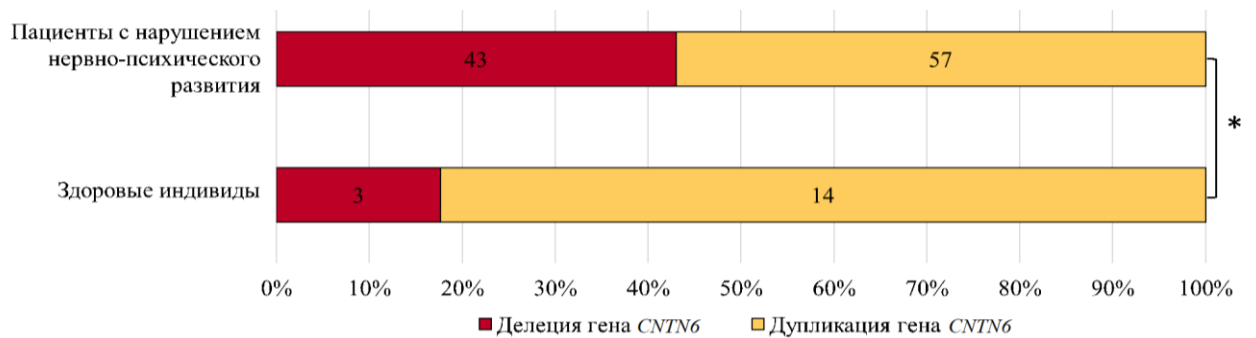


Рисунок 18 – Соотношение частоты микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в группе пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов; * – точный критерий Фишера ($p = 0,0372$)

Для 100 описанных в литературе случаев микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* данные о наследовании хромосомной перестройки были получены в 46 случаях (25 мутаций материнского, 18 – отцовского происхождения, 1 *de novo* мутация) (Рисунок 19). В двух случаях авторами были представлены данные о том, что перестройка унаследована, но неизвестно от кого из родителей. Соотношение частоты перестроек материнского и отцовского происхождения у пациентов с делециями и дупликациями *CNTN6* составило 1,2 : 1 и 1,6 : 1, соответственно. Статистически значимых различий в частотах материнских и отцовских CNV у пациентов в зависимости от типа перестройки установлено не было ($p = 0,43$). В 6 случаях микроделения и микродупликации *CNTN6* были унаследованы от родителей с различными нервно-психическими нарушениями (БАР, СДВГ, РАС, трудностями в обучении, депрессивным расстройством, врожденным нарушением слуха, дислексией, судорогами). В 12 случаях в семьях с известным семейным анамнезом отмечено наследование хромосомной мутации от условно здоровых родителей и ее фенотипическое проявление у детей [Hu et al., 2015; Kashevarova et al., 2014; Mercati et al., 2017; Repnikova et al., 2020]. Примечательно, что у четырех пациентов семейный анамнез по линии бессимптомного носителя перестройки был отягощен случаями нервно-психических

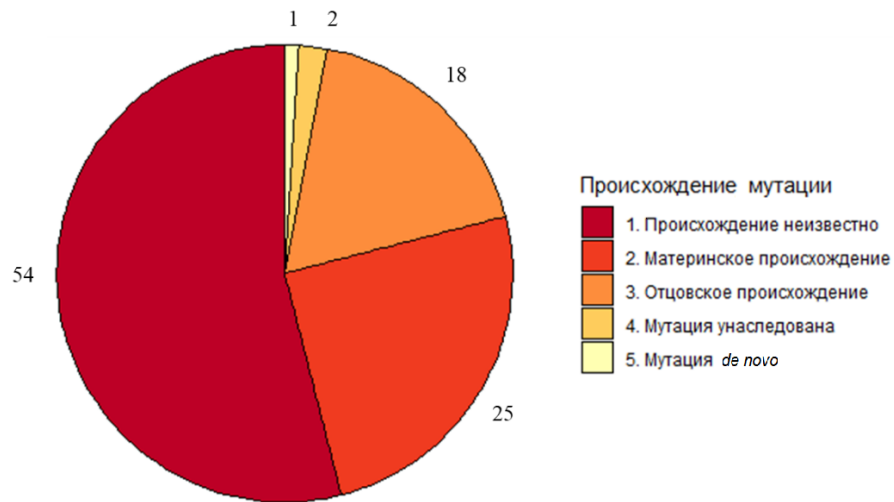


Рисунок 19 – Происхождение перестройки у 100 описанных в литературе случаев микроделений и микродупликаций гена *CNTN6*

нарушений [Mercati et al., 2017; Repnikova et al., 2020]. Отсутствие данных о возникновении перестройки *de novo* или наследовании микроделений и микродупликаций *CNTN6* у здоровых индивидов не позволяет в настоящее время однозначно оценить влияние родительского происхождения мутации на её фенотипическое проявление в группе пациентов с нарушением нервно-психического развития.

3.2 Получение линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*

3.2.1 Анализ CNV в фибробластах кожи пациентов с микроделениями и микродупликациями 3p26.3

Получение линий ИПСК путем репрограммирования фибробластов кожи и последующая дифференцировка клеток в нейроны являлись ключевыми задачами в данном исследовании. Проверка корректного выполнения каждого из этапов работы была обязательным условием при переходе к ее следующему этапу.

В качестве репрограммируемых клеток были выбраны фибробласты кожи носителей микроделений и микродупликаций 3p26.3 и здоровых индивидов. С целью подтверждения наличия исследуемых хромосомных aberrаций в клетках пациентов (и их отсутствия у донора) нами был проведен анализ копийности гена *CNTN6* в клеточных культурах с помощью aCGH и qPCR с праймерами на последовательность гена *CNTN6*. Количественная ПЦР подтвердила наличие микроделений и микродупликаций *CNTN6* у пациентов, а также отсутствие хромосомных aberrаций в фибробластах донора. В фибробластах пациента Ф1 с микроделением 3p26.3 с помощью aCGH дополнительно идентифицировано 5 CNV, из которых 4 были зарегистрированы в Базе данных геномных вариантов (DGV), а одна

микроделеция 14q22.3 (601 т.п.н.) представлялась патогенетически значимой, поскольку пересекалась с областью синдрома микроделеции 14q22 (OMIM 609640) и содержала кандидатный ген *LGALS3*, играющий важную роль в обеспечении апоптоза, врожденного иммунитета, клеточной адгезии и регуляции Т-клеток (Рисунок 20). Мутации в данном гене ассоциированы с развитием болезни Альцгеймера.

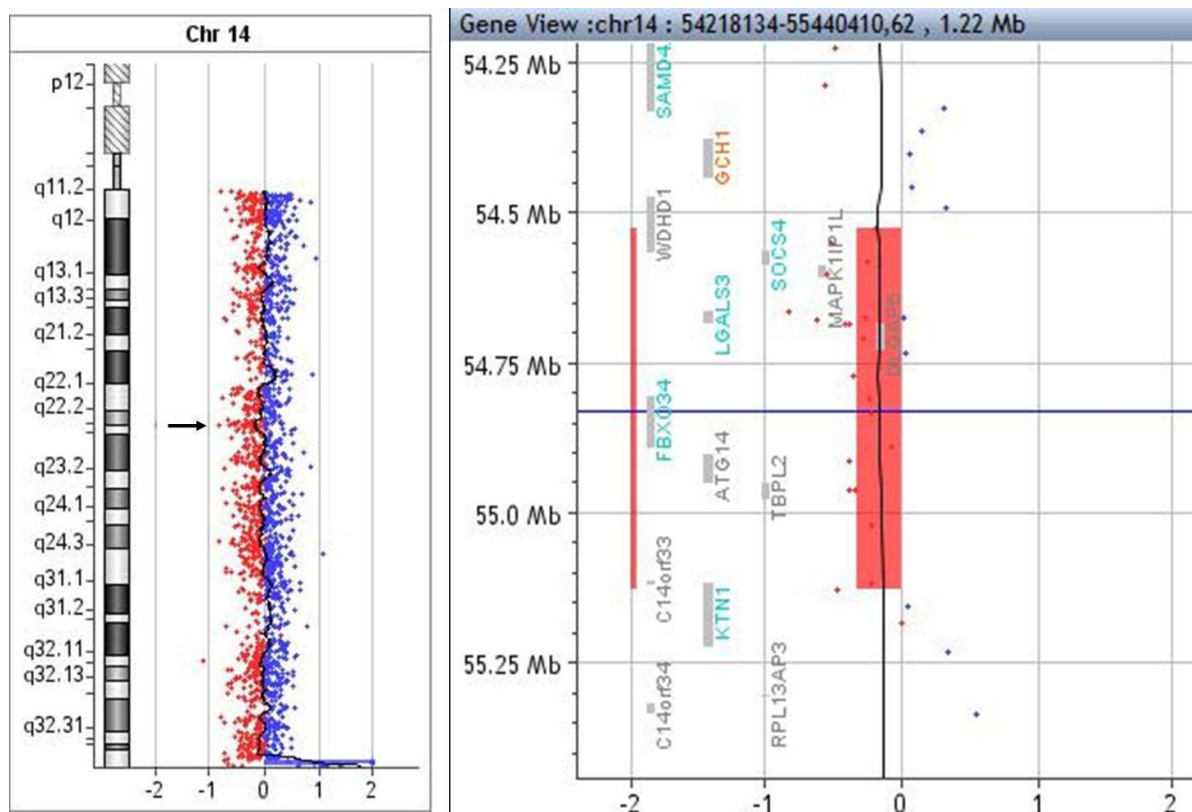


Рисунок 20 – Делеция 14q22.3 в фибробластах пациента Ф1 с недифференцированной УО, являющегося носителем микроделеции 3p26.3

Количественная ПЦР с праймерами на гены *LGALS3* и *TBPL2* не показала изменений числа копий данных генов у пациента Ф1 в его лимфоцитах и фибробластах, а также у его сестры Ф2 (Рисунок 21).

При проведении aCGH в фибробластах пациента К с микродупликацией 3p26.3 дополнительно, кроме, собственно, dup3p26.3, было обнаружено 6 CNV, из которых 5 ранее были описаны у условно здоровых индивидов и представлены в DGV. Дупликация 16p13.3–p13.2 (5565717–7904339), размером 2,3 м.п.н. в DGV не представлена и содержит ген *RBFOX1* (синоним *A2BP1*), кодирующий РНК-связывающий белок, участвующий в сплайсинге мРНК в нервных клетках (Рисунок 22). По данным литературы, данный ген может быть ассоциирован с развитием аутизма, шизофрении, СДВГ, тревожного

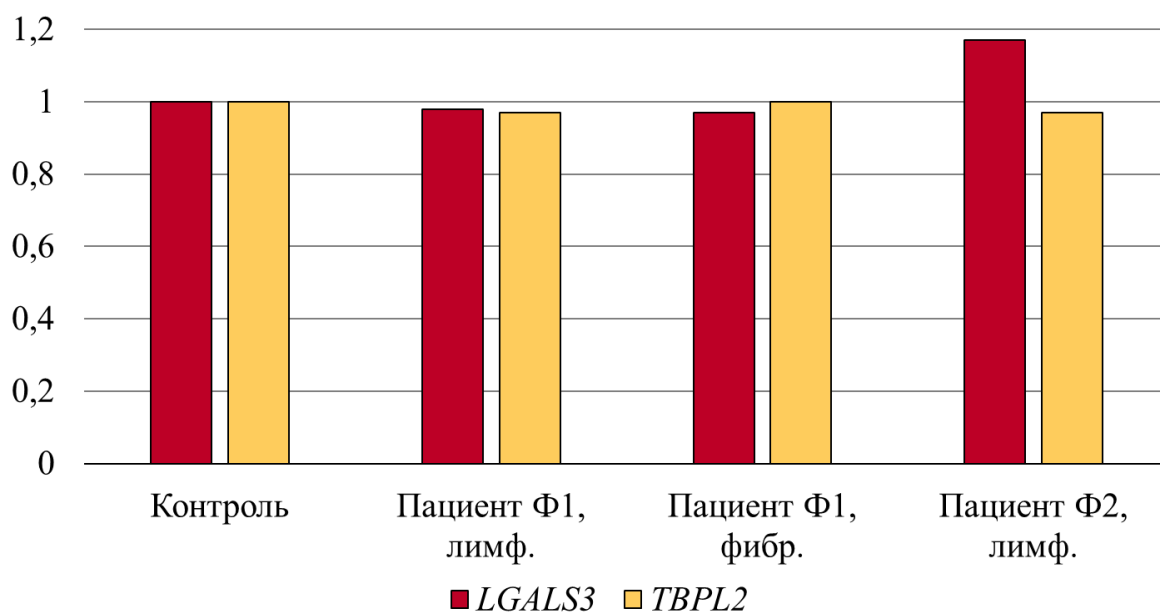


Рисунок 21 – Нормальная копийность локуса 14q22.3 у пациента Ф1 с микроделецией Зр26.3 и его сестры Ф2 по результатам qPCR; оранжевым и желтым показаны результаты qPCR с праймерами на ген *LGALS3* и *TBPL2*, соответственно; «фибр.» – фибробласты; «лимф.» – лимфоциты

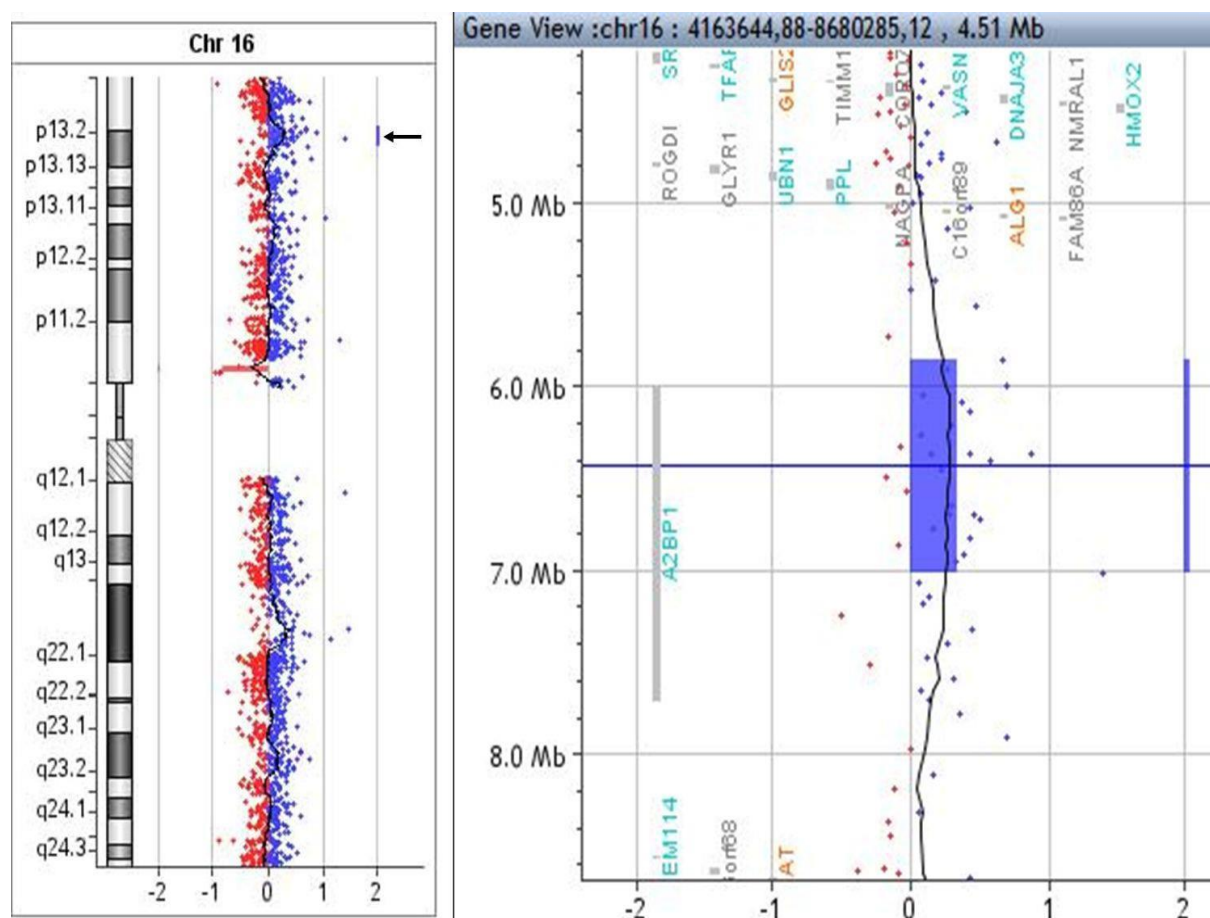


Рисунок 22 – Дупликация 16p13.3–13.2 в фибробластах пациента К с недифференцированной УО, являющегося носителем микродупликации Зр26.3

расстройства, БАР и агрессивного поведения [Ayhan, Konopka, 2019; Fernández-Castillo et al., 2020]. В области 16p13.3 зарегистрирован синдром микродупликации 16p13.3 (OMIM 613458), пациенты с которым характеризуются УО, нарушением речи, гипоплазией средней зоны лица, крупным носом, монголоидным разрезом глаз, птозом, тонкой верхней губой, низко расположенными, оттопыренными ушами, проксимально расположенным большим пальцем, длинными пальцами, коротким пятым пальцем, короткими стопами, камптодактилией. Таким образом, CNV в области 16p13.3-p13.2 является потенциально патогенетически значимой.

Как и в предыдущем случае, qPCR с праймерами на ген *RBFOX1* не подтвердила дупликации 16p13.3-p13.2 у пациента К в фибробластах и не обнаружила изменений числа его копий у родителей пробанда, а также бабушки и дедушки по отцовской линии (Рисунок 23).

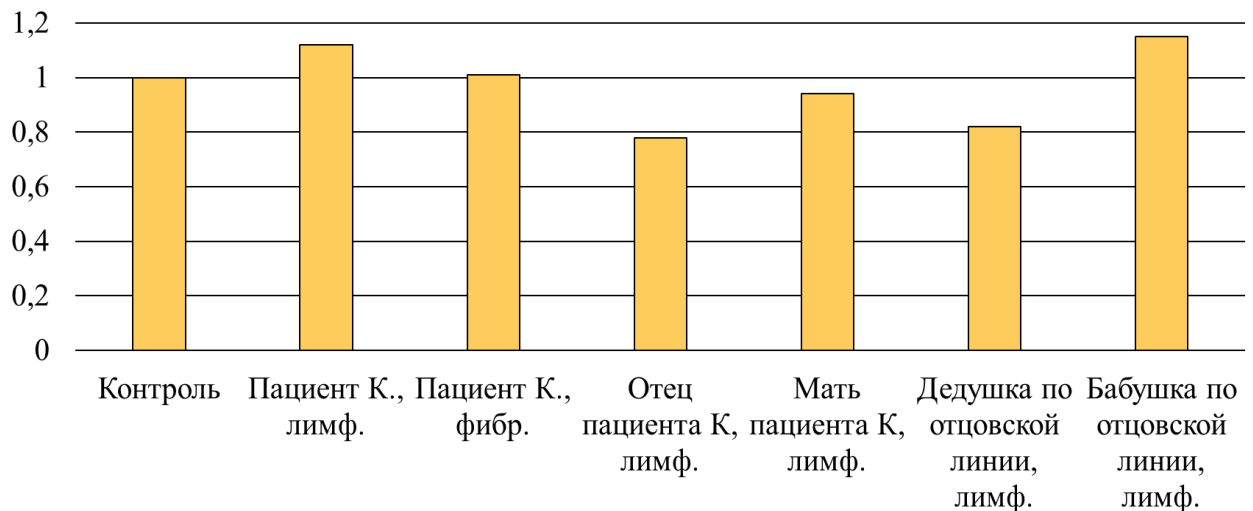


Рисунок 23 – Нормальная копийность локуса 16p13.3–13.2 у пациента К с микродупликацией 3p26.3 и его родственников по данным ПЦР в режиме реального времени; «фибр.» – фибробласты; «лимф.» – лимфоциты

Одним из объяснений этого факта, может являться вариабельность гибридизационных профилей в некоторых хромосомных сегментах на ДНК-микрочипах. Именно поэтому, верификация результатов aCGH-экспериментов независимыми методами (qPCR, FISH) является обязательным этапом в интерпретации результатов молекулярно-цитогенетических исследований.

Таким образом, проведенный анализ исключил присутствие дополнительных патогенетически значимых CNV в фибробластах пациентов с микроделецией и микродупликацией 3p26.3 и обеспечил использование для репрограммирования клеток, содержащих только исследуемую микроделецию гена *CNTN6*.

Для первичных культур фибробластов, полученных от пациентов Ф1 и К, было проведено WGS, результаты которого позволили более точно картировать границы хромосомных перестроек. Установлено, что в фибробластах TAF3 границы делеции оказались фланкированы двумя однонаправленными Alu-повторами: AluSx1 (chr3:1158383–1158694) и AluSc (chr3:1568190–1568478), гомологичность последовательностей которых составляет 76,3 % (рекомбинация между данными SINE элементами может лежать в основе возникновения перестройки). Протяженность делетированного участка хромосомы составляет ~409 815 п.н., а его координаты – chr3:1158415–1568230. Делеция практически полностью удаляет ген *CNTN6*: начало делеции находится в первом интроне гена, а конец в межгенном регионе, на 120 т.п.н. за пределами гена. В нормальной копии *CNTN6* не было обнаружено никаких структурных перестроек или точковых мутаций, нарушающих функционирование этого гена. Других крупных хромосомных перестроек в геноме пациента также обнаружено не было.

В фибробластах TAF4 с микродупликацией гена *CNTN6* протяженность дублированного участка составила 943993 п.н., а его координаты – chr3:560685–1504678. Данная дупликация тандемная, в правильной ориентации – «голова к хвосту» и содержит только один ген *CNTN6*. Точка стыка двух копий находится в межгенных промежутках и не нарушает известные регуляторные последовательности гена *CNTN6* (Рисунок 24). Таким образом, было сделано заключение, что в геноме пациента К нет других крупных хромосомных перестроек.

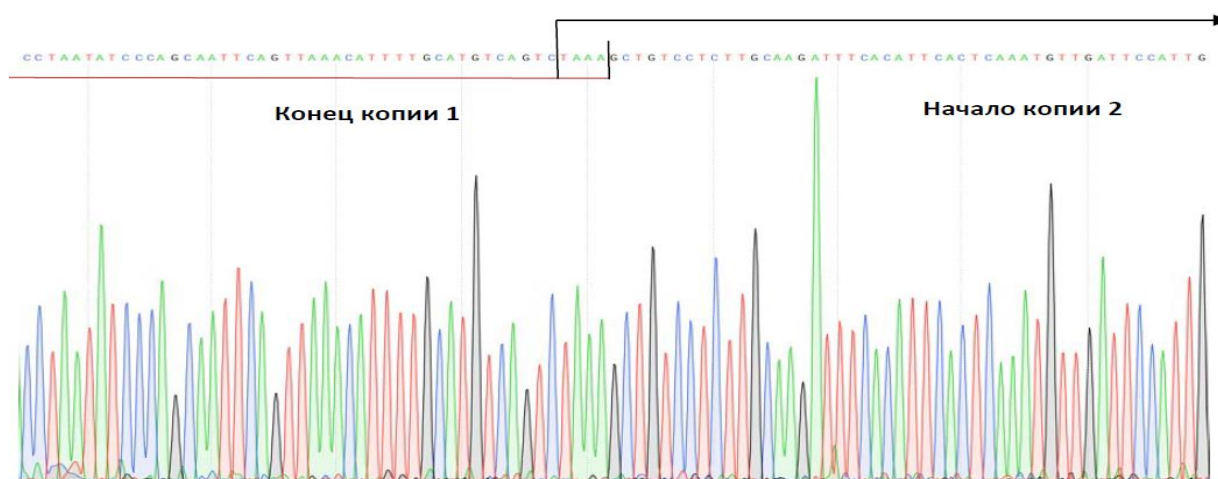


Рисунок 24 – Тандемная дупликация *CNTN6* на хромосоме 3 в фибробластах кожи пациента К

3.2.2 Исключение присутствия дополнительных хромосомных aberrаций в ИПСК

Для исключения присутствия дополнительных числовых и крупных структурных мутаций проведено стандартное цитогенетическое исследование и отобраны линии с нормальным диплоидным кариотипом.

Для всех линий ИПСК проведен сбор клеточного материала для выделения ДНК и РНК. ДНК, выделенная из клеток линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*, использована для проведения aCGH и qPCR. Для линий, полученных от пациента Ф1, с помощью qPCR показано наличие микроделеции *CNTN6* в клетках каждой исследуемой линии (Рисунок 25).

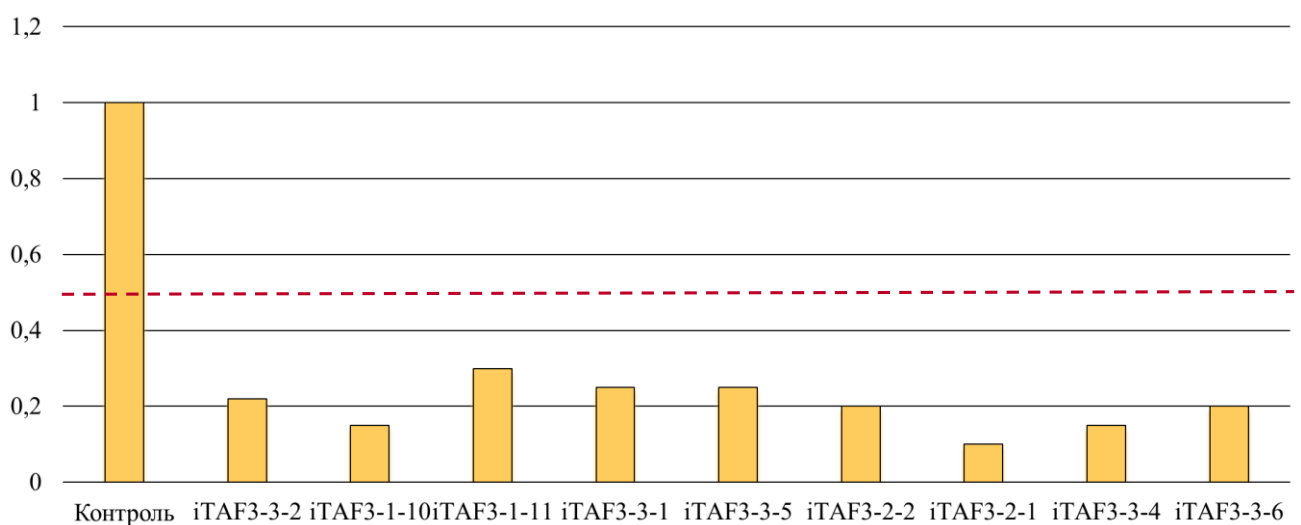


Рисунок 25 – Наличие делеции гена *CNTN6* в линиях ИПСК (iTAF3) пациента Ф1 по данным qPCR; Контроль – линия ИПСК, полученная из фибробластов здорового донора с нормальным кариотипом (iTAF2); красной пунктирной линией показана верхняя граница для идентификации микроделеции

Подтверждающий анализ наличия микродупликации 3p26.3 в полученных линиях ИПСК дал неожиданные результаты. С помощью aCGH протестировано 9 линий ИПСК с микродупликацией 3p26.3 с целью исключения в них дополнительных CNV, возникновение которых возможно в ходе репрограммирования (Таблица 8). Патогенетическая значимость вновь обнаруженных вариаций была интерпретирована с использованием базы данных DGV и NCBI Gene [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>]. Потенциально патогенными были признаны те CNV, которые не встречались в DGV и содержали кандидатные гены. Полиморфные вариации были ранее обнаружены у здоровых индивидов и зарегистрированы в DGV. В линиях TAF4-1, TAF4-3, TAF4-6, TAF4-14, TAF4-22 обнаружены только исследуемая dup3p26.3 и полиморфная микроделеция 15q11.2, соответственно эти линии оказались пригодными для дальнейшей дифференцировки их в нейроны.

Таблица 8 – Анализ CNV в ИПСК, полученных из фибробластов пациента с микродупликацией гена *CNTN6*

Линия ИПСК	Результат aCGH	Размер CNV	Классификация CNV	Кандидатный ген
TAF4-1	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-3	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-4	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del4q31.1	646 т.п.н.	Потенциально патогенная	<i>MGARP</i>
				<i>NAA15</i>
				<i>SETD7</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-6	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-14	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-22	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-24	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	dup4p12	92 т.п.н.	Потенциально патогенная	<i>NFXL1</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
TAF4-35	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
	dup18q12.2	503 т.п.н.	Потенциально патогенная	<i>SLC39A6</i> <i>ELP2</i>
TAF4-36	dup3p26.3	859 т.п.н.	Потенциально-патогенная	<i>CNTN6</i>
	del3p22.2	120 т.п.н.	Потенциально патогенная	–
	del15q11.2	1,2 м.п.н.	Полиморфная	–
	del16q23.3	232 т.п.н.	Потенциально патогенная	<i>CDH13</i>

Важно отметить, что, согласно aCGH, для всех 9 исследуемых линий было показано наличие микродупликации 3p26.3 (Рисунок 26), однако с помощью реал-тайм ПЦР микродупликация была детектирована только в 4 из 9 проанализированных линий (Рисунок 27).

В пяти линиях ИПСК, полученных из фибробластов пациента с микродупликацией 3p26.3, присутствовало нормальное (дисомное) число копий *CNTN6*. Линиями с подтвержденной обеими методами микродупликацией оказались iTAF4-14, iTAF4-22, iTAF4-24 и iTAF4-35. Полученные данные указывают на наличие мозаицизма по микродупликации в линии ИПСК в сочетании с нормальным клеточным клоном, детекция которого зависит как от чувствительности используемых методов – aCGH или qPCR, так и от распространенности в исследуемой ткани.

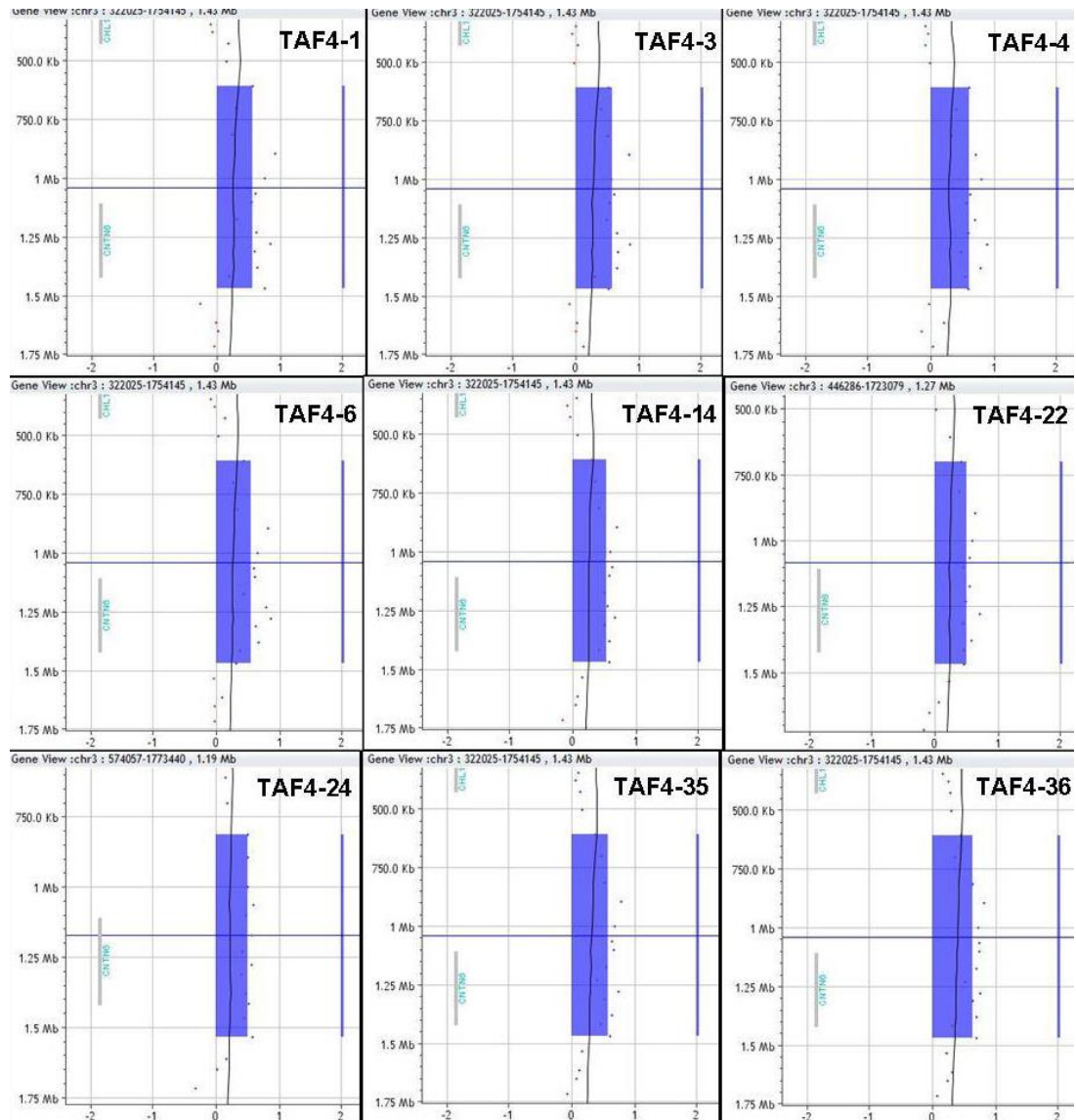


Рисунок 26 – Микроудупликация 3p26.3 в линиях ИПСК по данным aCGH-анализа

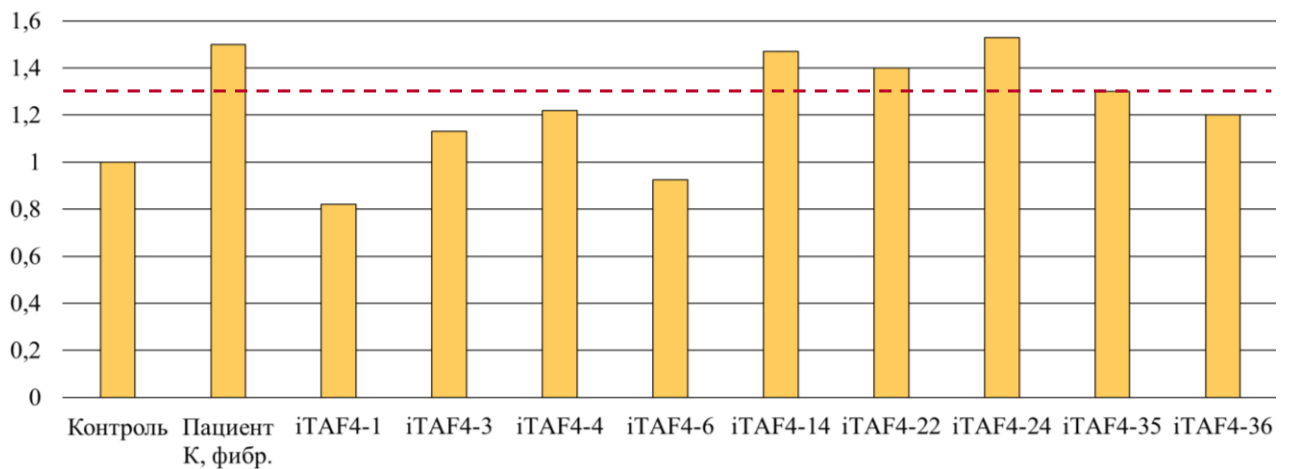


Рисунок 27 – Вариабельность числа копий *CNTN6* в линиях ИПСК (iTAF4) пациента с микроудупликацией 3p26.3 по данным qPCR; Контроль – линия ИПСК, полученная из фибробластов здорового донора с нормальным кариотипом (iTAF2); пунктирной линией показана нижняя граница для идентификации микроудупликации; «фибр.» – фибробласты

Учитывая тот факт, что каждая линия ИПСК есть потомство единственной репрограммированной клетки, вопросы о происхождении и распространении мозаицизма должны быть отнесены к первичной культуре фибробластов. Вероятно, что мозаицизм присутствовал в фибробластах кожи пациента, взятых для репрограммирования, но доля клеток с нормальным кариотипом была, по всей видимости, невелика, поэтому и метод aCGH, и qPCR, продемонстрировали сходные результаты, основываясь на анализе доминирующей клеточной линии с микродупликацией и не детектируя низкоуровневый мозаицизм с присутствием нормальной клеточной линии. Таким образом, в процессе исследования неожиданно было обозначено принципиально новое направление использования линий ИПСК для детекции низкоуровневого мозаицизма у пациентов с хромосомной патологией.

Важным вопросом является происхождение данного мозаицизма. Одним из объяснений может быть ситуация, связанная с возникновением мозаицизма в ходе клеточного репрограммирования фибробластов в ИПСК. Но такой сценарий маловероятен, поскольку речь идет о нормализации числа копий в дублицированном гомологе. Для его реализации клетки должны были бы сначала потерять дублицированную хромосому 3, а затем заменить ее второй нормальной копией через хроматидное нерасхождение в митозе, что должно привести к однородительскому наследованию. В результате часть клеток в линиях ИПСК могла иметь кариотип с микродупликацией, а часть с нормальным кариотипом, но с однородительской дисомией по хромосоме 3. Учитывая, что культуры ИПСК анализировались на ранних пассажах, прохождение такой цепочки событий представляется маловероятным по временным параметрам. Более вероятным выглядит предположение о наличии мозаицизма в исходной культуре фибробластов для репрограммирования.

Мы сформулировали несколько предположений о возможных причинах постзиготического мозаицизма по унаследованной микродупликации 3p26.3. Так, наличие в зиготе трисомии по хромосоме 3 (две копии хромосомы без дубликации унаследованы от матери вследствие хромосомного нерасхождения в оогенезе, а третья копия с микродупликацией была получена от отца) и последующая ее коррекция в результате постзиготического хромосомного нерасхождения или отставания дополнительной хромосомы могут объяснить наличие клеток с нормальным кариотипом и клеток с гетерозиготной микродупликацией 3p26.3. При утрате одной из материнских хромосом возникает «нормальный» (в отношении числа копий хромосомы 3) кариотип, но с микродупликацией 3p26.3 отцовского происхождения, вероятно, и детектируемый нами при кариотипировании лимфоцитов и фибробластов. В случае потери отцовской хромосомы с

микродупликацией, клетка восстановит нормальное число хромосом 3, однако оба гомолога будут иметь материнское происхождение – возникнет однородительская дисомия хромосомы 3. Вероятно, ее мы детектируем в качестве клеток с «нормальным» кариотипом как в субклонированных фибробластах, так и в ИПСК. В случае нерасхождения материнских хромосом в оогенезе во втором мейотическом делении, возникнет изодисомия, приводящая к гомозиготизации возможных рецессивных мутаций на хромосоме 3 материнского происхождения. Если нерасхождение произошло в сперматогенезе, в таком случае при коррекции трисомии может теряться как нормальная отцовская хромосома, так и хромосома с микродупликацией. Очевидно, что последний вариант приведет к мозаицизму с нормальной клеточной линией, в которой будут присутствовать и материнская и отцовская хромосома 3 без микродупликации.

Для направленной дифференцировки ИПСК в нейроны необходимо было отобрать линии, действительно несущие микродупликацию 3p26.3 в чистом, а не в мозаичном состоянии. С данной целью проведено субклонирование культур фибробластов, и выполнен поиск микродупликации несколькими независимыми способами (aCGH, qPCR, FISH, анализ наследования полиморфных SNP-маркеров, FISH с набором уникальных ДНК-зондов, специфичных с последовательности гена *CNTN6* и к субтеломерному региону 3p26.3). Только те клеточные линии (iTAF4-14, iTAF4-22 и iTAF4-24), которые оказались позитивными в отношении тестируемой микродупликации 3p26.3 независимо по всем использованным системам анализа, были использованы для дальнейшей направленной дифференцировки в нейрональном направлении).

3.2.3 Анализ плюрипотентности полученных линий ИПСК

Для изучения плюрипотентных свойств отобранных линий ИПСК мы воспользовались тремя подходами: анализ экспрессии генов, маркирующих уровень плюрипотентности линий ИПСК, *in vitro* дифференцировка ИПСК методом образования эмбрионидных телец в условиях суспензионной культуры и *in vivo* тест на формирование тератом после введения ИПСК иммунодефицитным мышам линии SCID.

Список восьми «маркерных» генов плюрипотентности, экспрессия которых была исследована в различных линиях ИПСК, включал *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *TDGF*, *ECAT15-1*, *TERT*, *REX1* и *PH34*. Анализ экспрессии был проведен с помощью ОТ-ПЦР. Полученные результаты представлены в таблице 9. Согласно результатам данного анализа, во всех линиях ИПСК детектирована экспрессия генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *TDGF* и *ECAT15-1*. В двух линиях ИПСК не выявлена экспрессия гена *REX1* и *PH34* и еще в одной гена *PH34*.

Таблица 9 – Анализ экспрессии «маркерных генов плюрипотентности» в линиях ИПСК методом ОТ-ПЦР

Гены	Линии ИПСК							
	iTAF3-7	iTAF3-17	iTAF3-20	iTAF3-21	iTAF3-22	iTAF3-37	iTAF3-38	iTAF4-22
<i>OCT4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>NANOG</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>SOX2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>TDGF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>ECAT15-1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>TERT</i>	н/д	+	+	н/д	н/д	+	+	+
<i>REX1</i>	–	+	+	+	–	+	+	+
<i>PH34</i>	–	+	+	–	–	+	+	+

Примечание: «+» – ген экспрессируется; «–» – ген не экспрессируется; н/д – нет данных

Во всех линиях ИПСК проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентных клеток: OCT4, SOX2, TRA1-60 и SSEA-4 (Таблица 10). На рисунке 28 представлены результаты окрашивания на эти маркеры на примере клеток линии iTAF3-37. Присутствие OCT4 и SOX2 выявлено в ядрах клеток, а TRA1-60 и SSEA-4 – на клеточной поверхности. Результаты молекулярного и иммуноцитохимического анализа позволяют сделать вывод о том, что в исследованных линиях ИПСК экспрессируются маркеры, характерные для плюрипотентных клеток.

Таблица 10 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа белковых маркеров плюрипотентности в разных линиях ИПСК

Гены	Линии ИПСК							
	iTAF3-7	iTAF3-20	iTAF3-21	iTAF3-22	iTAF3-37	iTAF3-38	iTAF4-22	iTAF4-35
<i>OCT4</i>	н/д	+	н/д	н/д	+	+	н/д	н/д
<i>SOX2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>TRA1-60</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>SSEA-4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» – белок экспрессируется; «–» – белок не экспрессируется; н/д – нет данных

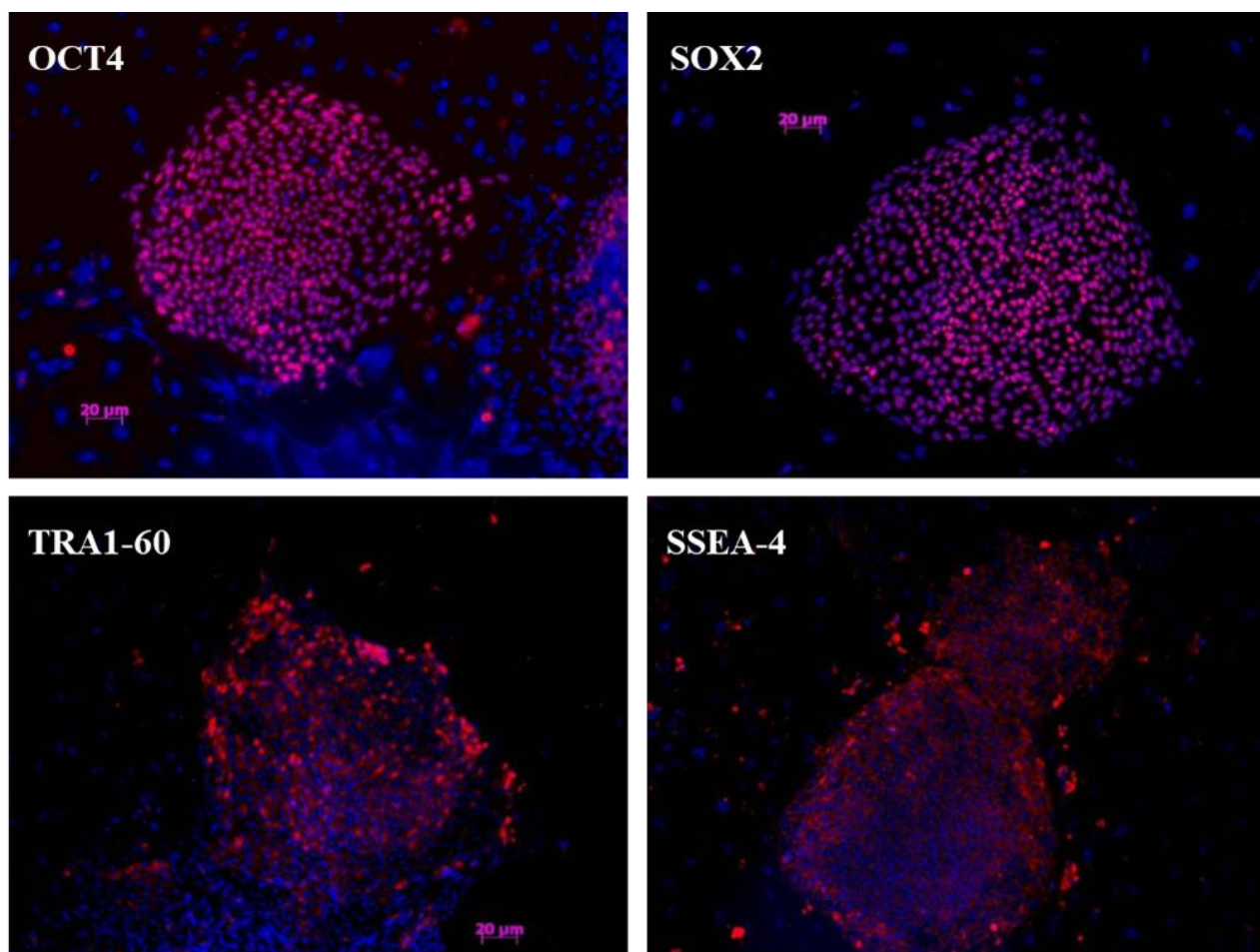


Рисунок 28 – Иммунофлуоресцентный анализ транскрипционных факторов OCT4 и SOX2 и поверхностных антигенов TRA1-60 и SSEA-4 в клетках линии iTAF3-37. Позитивные клетки по данным маркерам окрашиваются в красный цвет. Ядра клеток дополнительно окрашены DAPI (синий цвет)

Одним из тестов клеток на плюрипотентность является оценка их способности дифференцироваться *in vitro* при формировании эмбрионных телец в клетки, производные трех зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. Дифференцировка ИПСК проводилась в условиях суспензионной культуры. Примеры формирования эмбрионных телец представлены на рисунке 29.

Далее из полученных эмбрионных телец была выделена РНК и методом ОТ-ПЦР проведен анализ экспрессии генов, характерных для типов клеток, производных разных зародышевых листков: *SOX1*, *PAX6* и *MAP2*, являющихся маркерами эктодермы, *BRACHYURY* и *FLK1* – маркерами мезодермы, *AFP* и *SOX17* – маркерами энтодермы. Результаты анализа показали, что при дифференцировке линий ИПСК в эмбрионных тельцах выявляются маркеры всех трех зародышевых листков (Таблица 11).

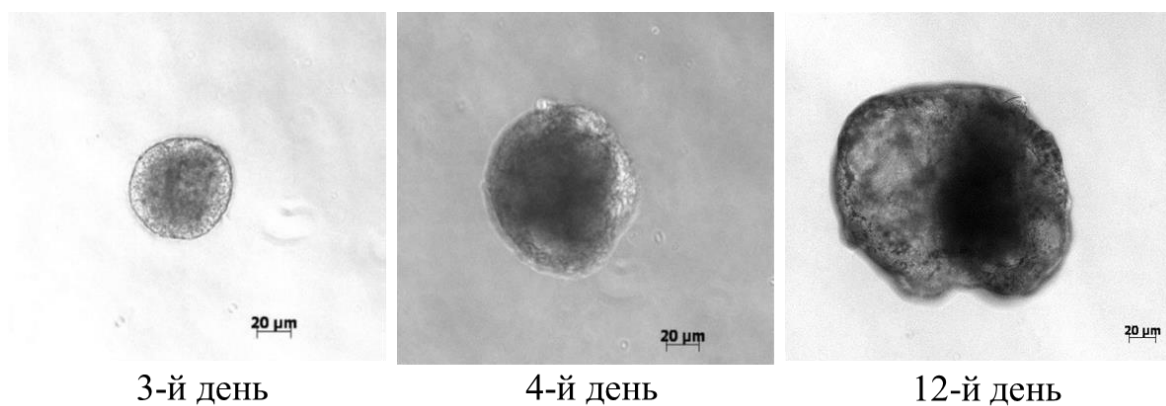


Рисунок 29 – Эмбрионидные тельца, сформированные из клеток ИПСК линии iTAF3-37 с микроделецией 3p26.3, захватывающей ген *CNTN6*

Таблица 11 – Данные анализа экспрессии генов-маркеров трех зародышевых листков в эмбрионидных тельцах, полученных из ИПСК разных линий

Гены	Линии ИПСК							
	iTAF3-7	iTAF3-17	iTAF3-20	iTAF3-21	iTAF3-22	iTAF3-37	iTAF3-38	iTAF4-22
<i>SOX1</i>	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>PAX6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>MAP2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>BRACHYURY</i>	+	—	+	+	+	+	—	+
<i>FLK1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>AFP</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>SOX17</i>	+	—	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» – ген экспрессируется; «—» – ген не экспрессируется

Тератомный тест является одним из самых информативных способов доказательства плюрипотентности ИПСК по присутствию или отсутствию дериватов трех зародышевых листков в тератомах. Мы провели тестирование плюрипотентности *in vivo* путем введения ИПСК иммунодефицитным мышам линии SCID, согласно опубликованному ранее протоколу [Hentze et al., 2009]. Данные по числу инъекций ИПСК и полученных тератом приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Число тератом, полученных в опытах по инъекциям ИПСК разных линий иммунодефицитным мышам SCID

Линия ИПСК	Число введений клеток	Число тератом
iTAF2-3	4	0
iTAF2-4	8	4
iTAF3-7	5	1
iTAF3-17	5	2
iTAF3-20	3	3
iTAF3-21	10	5
iTAF3-22	8	7
iTAF3-37	3	3
iTAF3-38	2	2
iTAF4-14	4	3
iTAF4-22	3	2
iTAF4-24	4	4
iTAF4-3	6	0
iTAF4-35	3	0
iTAF4-36	3	0

Тератомы, сформировавшиеся из ИПСК в течение 1-3 месяцев, вырезали, фиксировали и проводили гистологический анализ. Результаты гистологического анализа тератом представлены в таблице 13. Из полученных данных следует, что ИПСК всех исследованных линий: iTAF2-4 (контроль), iTAF3-20, iTAF3-21, iTAF3-22, iTAF3-17, iTAF3-37, iTAF4-14, iTAF4-22 и iTAF4-24 дифференцируются в клеточные производные всех трех зародышевых листков, свидетельствуя о высокой плюрипотентности полученных линий ИПСК.

Таким образом, было сделано заключение о плюрипотентности полученных линий ИПСК. Клетки данных линий экспрессируют «маркеры плюрипотентности» как на уровне мРНК, так и белков (по результатам ОТ-ПЦР и иммуноцитохимии), способны спонтанно дифференцироваться в производные 3-х зародышевых листков как в условиях *in vitro* (образование эмбрионидных телец), так и *in vivo* (тератомный тест). Список отобранных для дифференцировки в нейроны линий ИПСК, включающий 14 линий с различным числом копий гена *CNTN6*, приведен в Приложении Б.

Таблица 13 – Типы клеток в тератомах, полученных инъекцией ИПСК

Зародышевый листок	Тип клеток	Линии ИПСК								
		iTAF2-4	iTAF3-20	iTAF3-21	iTAF3-22	iTAF3-17	iTAF3-37	iTAF4-14	iTAF4-22	iTAF4-24
Эктодерма	Примитивный нейроэпителий	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Глиальные клетки	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Кератинизированный эпителий					+		+		+
	Пигментированный эпителий	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мезодерма	Соединительная ткань	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Хрящ	+	+	+	+	+		+	+	+
	Кость	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Мышцы	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Жировая ткань		+	+		+		+	+	+
	Эритропоэтическая ткань		+	+			+	+	+	+
	Лимфоидная ткань				+	+	+	+	+	+
Энтодерма	Реснитчатый эпителий					+				+
	Кишечный эпителий	+	+	+	+	+		+	+	+
	Секреторный эпителий	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Гепатоциты или панкреоциты	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2.4 Получение линии ИПСК с нокаутом гена *CNTN6*

Для получения адресных мутаций нами была выбрана линия ИПСК iTAF3del17 от пациента, гетерозиготного по микроделеции 3p26.3. Использование данной линии в эксперименте имело ряд преимуществ. Во-первых, будучи гетерозиготными по микроделеции 3p26.3, клетки iTAF3del17 несли только одну копию гена *CNTN6*. Поэтому вносимые мутации находились в гемизиготном состоянии, что облегчало их детекцию и секвенирование. Кроме того, линия iTAF3del17 в ходе культивирования была адаптирована к

выживанию после диссоциации на единичные клетки, что являлось несомненным плюсом, поскольку для успешного создания мутантной линии, необходимо проводить субклонирование ИПСК.

Для подтверждения адресной мутации была проведен ПЦР-анализ (Рисунок 30 А).



Рисунок 30 – Анализ субклонов ИПСК человека, полученных после трансфекции векторами системы CRISPR/Cas9; (А) ПЦР-анализ фрагмента гена *CNTN6* в клонах серии C9 и исходной линии ИПСК iTAF3del17. Изменение подвижности ПЦР продукта в клонах, отмеченных стрелкой, свидетельствует о возникновении мутаций в исследуемом гене; (Б)

Результаты секвенирования фрагмента экзона 2 гена *CNTN6* в клонах C9-8 и C9-11.

Возникшие адресные делеции (отмечены красным цветом) гена *CNTN6* приводят к либо к элиминации стартового кодона в клоне C9-11, либо к сдвигу рамки считывания в клоне C9-8.

Рамкой выделен стартовый кодон ATG

Для клонов (C9-1, 11, 18) наблюдалось наличие двух ПЦР продуктов с различающейся электрофоретической подвижностью. Продукт большего молекулярного веса, совпадающий с продуктом, детектированным в исходной линии iTAF3del17, отражал наличие в культуре клеток, содержащих нормальный аллель гена *CNTN6*. Продукт меньшего молекулярного веса предположительно представлял собой индуцированные мутантные аллели *CNTN6*. В клоне C9-8 присутствовал исключительно мутантный аллель. Этот клон, по всей видимости, был образован клеткой, в которой адресная модификация генома произошла сразу после трансфекции, до первого деления трансфицированной клетки.

Проведено секвенирование участка генома в области предполагаемой мутации для субклонов C9-8 и C9-11. Для субклона C9-11 смесь ПЦР-продуктов была клонирована в плазмиду, после чего проводилось секвенирование. Это позволило определить последовательность каждого из ПЦР-продуктов, представленных в клоне C9-11. Результаты секвенирования (Рисунок 30 Б) показали, что возникшая под действием системы CRISPR/Cas9 делеция приводит к элиминации стартового кодона в клоне C9-11, а в клоне

С9-8 к сдвигу рамки считывания. Поскольку клон С9-8 был представлен только мутантными клетками, они были размножены для дальнейшей работы.

Таким образом, создана нуллисомная линия ИПСК человека (генотип *CNTN6*^{del/mut}), в которой один из гомологов хромосомы 3 имеет обширную делецию, полностью элиминирующую кодирующую часть гена *CNTN6*, а второй гомолог содержит адресно-индуцированную мутацию *CNTN6*, кодирующую нефункциональный белок.

3.3 Направленная дифференцировка ИПСК в нейроны

Для дифференцировки ИПСК человека *in vitro* был использован протокол, согласно которому форсированная экспрессия транскрипционного фактора Ngn2 (кодирует белок нейрогенин-2), действующего на самых ранних этапах развития ЦНС, вызывает дифференцировку ИПСК в нейроны. Данный протокол предполагает контроль морфологии и анализ экспрессии нейрональных маркеров на всех этапах направленной дифференцировки.

Динамика дифференцировки ИПСК с нормальным числом копий *CNTN6* и с дупликацией гена представлена на рисунке 31 А. Уже на 3-5-й дни после индукции дифференцировки были видны клетки, морфологически сходные с незрелыми нейронами – биполярные клетки с короткими отростками, экспрессирующие один из ранних нейрональных маркеров, бета-тубулин (Рисунок 32 А, Б) В последующие дни происходило изменение их морфологии: удлинение отростков, ветвление и образование сетей. К 26-му дню образовавшиеся нейроны формируют густую сеть отростков как в контрольной линии ИПСК iTAF1-25 (Рисунок 31 А), так и в линии iTAF4-22 с дупликацией гена *CNTN6* (Рисунок 31 Б).

Таким образом, в нескольких независимых экспериментах получены сопоставимые результаты по дифференцировке в нейроны линий ИПСК с нормальным и дуплицированным геном *CNTN6*. Однако следует отметить, что во всех трех линиях ИПСК с дупликацией гена *CNTN6* небольшая часть клеток избегала дифференцировки в нейроны несмотря на то, что эффективность вирусной трансдукции в этих линиях и в ИПСК контрольных линий с нормальным геном *CNTN6* была сопоставимой. Чтобы избавиться от недифференцированных клеток, в культуральную среду был добавлен цитарабин (cytarabine, Ara C), ингибирующий синтез ДНК (за счет встраивания в ДНК) и конкурентно ингибирующий ДНК-полимеразу.

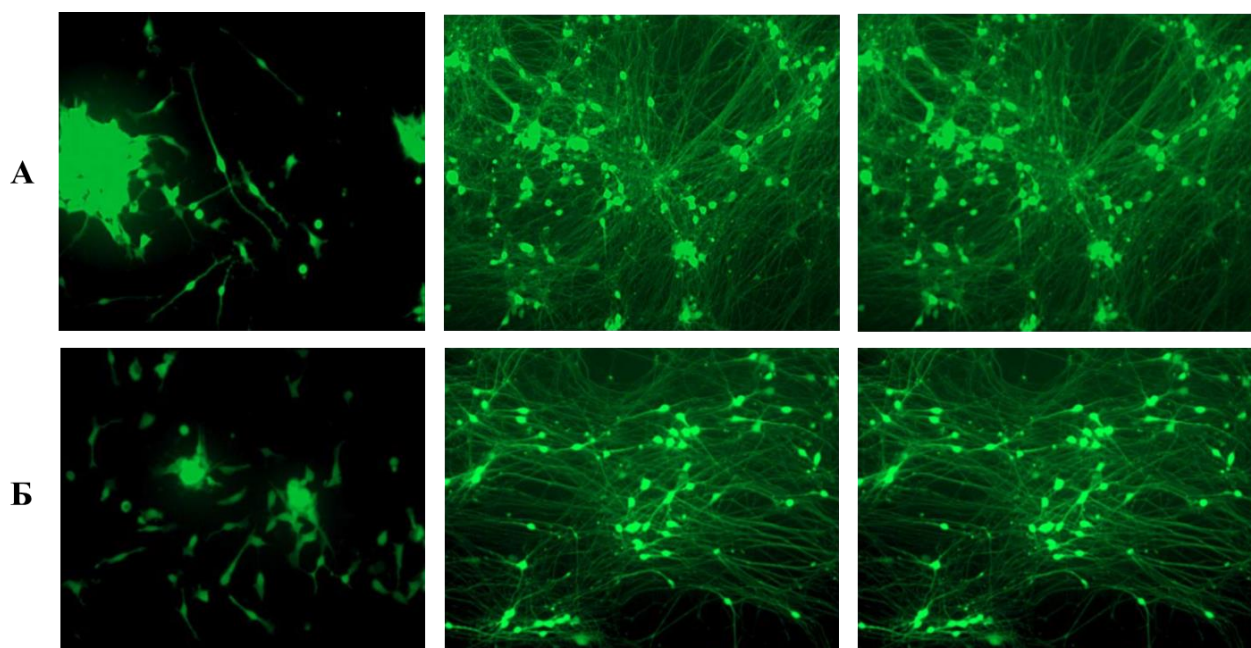


Рисунок 31 – (А) Динамика дифференцировки в нейроны ИПСК линии iTAF1-25 с нормальным числом копий гена *CNTN6* на 3-й, 7-й и 26-й дни после индукции форсированной экспрессии экзогенного транскрипционного фактора *Ngn2*; (Б) Дифференцировка ИПСК линии iTAF4-22 с дупликацией гена *CNTN6* на 3-й, 15-й и 26-й дни. Клетки, в которые произошла встройка вводимых генетических конструкций, прижизненно маркированы зеленым флуоресцентным белком (EGFP)

При добавлении цитарабина делящиеся клетки погибали, тогда как дифференцированные неделящиеся нейроны выживали. Показано, что дифференцировка ИПСК в нейроны, и даже прямая конверсия фибробластов в нейроны, может происходить без деления клетки [Fishman et al., 2015; Zhang et al., 2013]. Таким образом, в дальнейшем анализе были использованы только дифференцированные нейроны.

Иммуноцитохимический анализ на наличие маркёров нервных клеток показал, что в процессе индукции дифференцировки ИПСК экспрессия бета-тубулина 3 (*bTubb3*) в части клеток появлялась уже на 2-й день, когда клетки еще не имели видимых признаков дифференцировки (Рисунок 32 А). На 3-й день бета-тубулин 3 маркировал формирующиеся отростки нервных клеток (Рисунок 32 Б), а на более поздних сроках дифференцировки выявлялся во всей сети нейронов (Рисунок 32 В, Г).

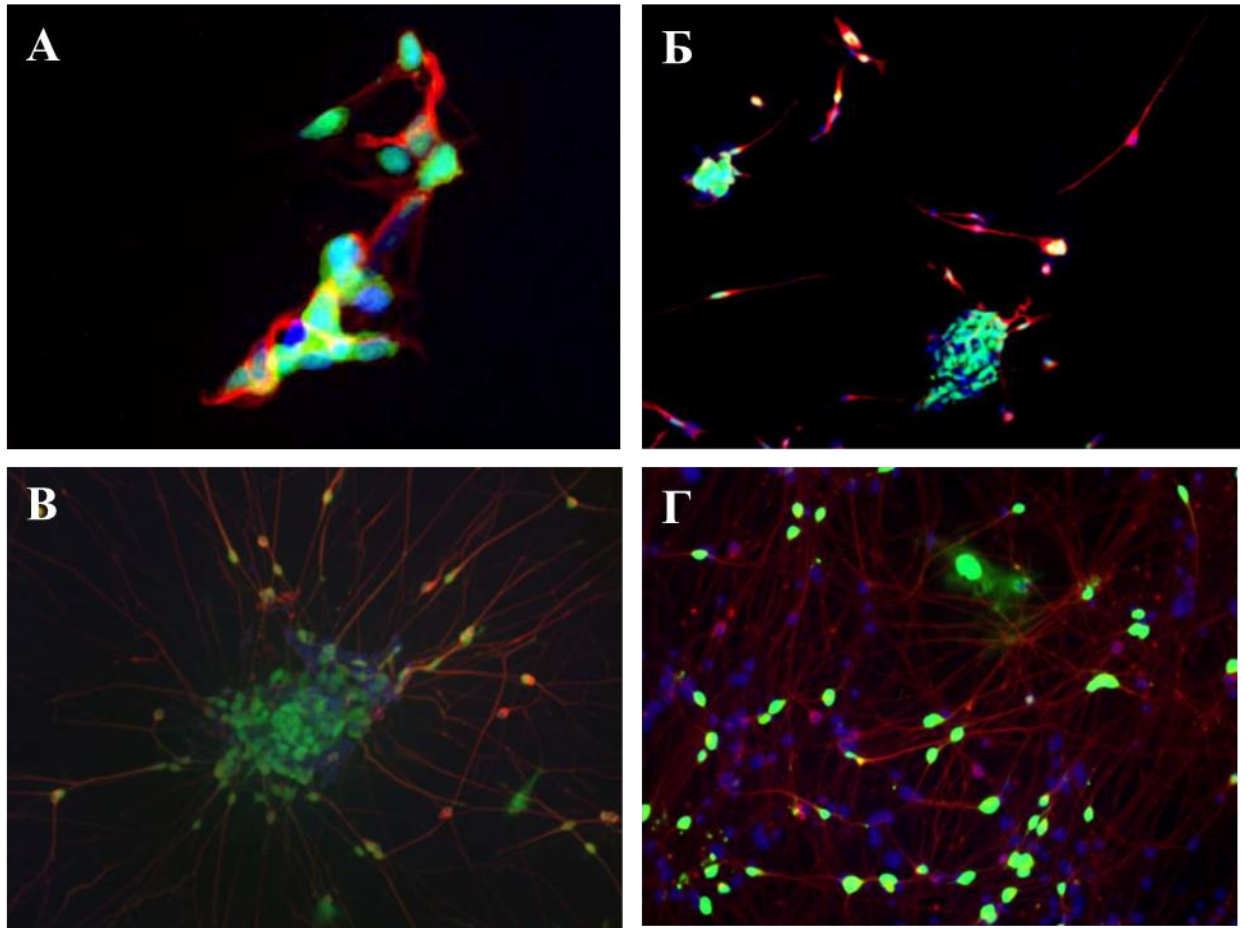


Рисунок 32 – Иммунофлуоресцентный анализ на бета-тубулин 3 клеток линии iTAF4-24 на 2-й (А), 3-й (Б), 7-й (В) и 22-й (Г) дни после индукции дифференцировки в нейроны с помощью форсированной экспрессии Ngn2. Красный цвет – окрашивание клеток с использованием антител против бета-тубулина 3 (β Tubb3); синий цвет – окрашивание ДНК ядер клеток DAPI. Клетки, в которые произошла встройка вводимых генетических конструкций, прижизненно маркированы зеленым флуоресцентным белком (EGFP). Хорошо видна сеть нейронов, позитивных по бета-тубулину 3 (нижний ряд)

После 25 дней дифференцировки полученные нейроны оценивали на присутствие маркеров зрелых нейронов: нейрофиламента Н (NF-H), белка MAP2, ассоциированного с микротрубочками и участвующего в формировании и поддержании формы дендритов, а также маркера синапсов – синаптофизина (SYP). Результаты анализа показали, что все анализируемые клетки экспрессировали маркеры зрелых нейронов и, таким образом, индукция дифференцировки ИПСК в нейроны с помощью форсированной экспрессии Ngn2 происходила с высокой эффективностью (Рисунок 33).

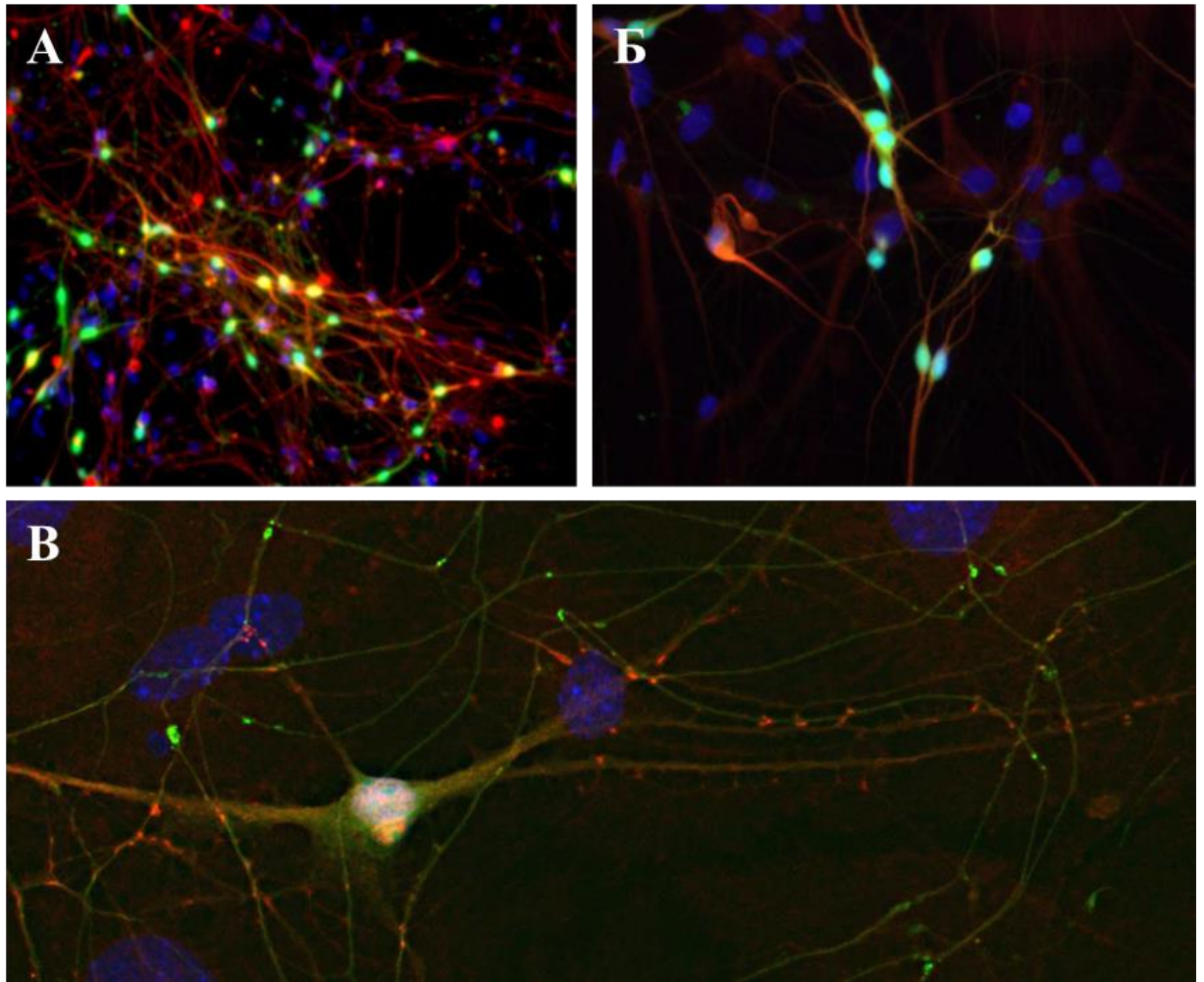


Рисунок 33 – Маркеры зрелых нейронов NF-H, MAP2 и SYP в нейронах, полученных после 25 дней дифференцировки ИПСК iTAF4-22 и iTAF4-14 с дупликацией гена *CNTN6*. (А) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против нейрофиламента (NF-H), дифференцировка в нейроны линии iTAF4-22; (Б) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против MAP2, дифференцировка в нейроны линии iTAF4-14; (В) Окрашивание (красный цвет) с использованием антител против синаптофизина (SYP), дифференцировка в нейроны линии iTAF4-14; синий цвет – ядра клеток, окрашенные DAPI; зеленый цвет – флуоресценция зеленого белка указывает на экспрессию гена *EGFP* в трансдуцированных клетках

Для проверки функциональности нейронов, полученных в результате индукции дифференцировки ИПСК, мы проводили регистрацию их электрофизиологических параметров. На рисунке 34 показано, что в исследуемых нейронах, полученных как из ИПСК с нормальным числом копий *CNTN6*, так и из ИПСК с дупликацией гена *CNTN6*, зарегистрированы записи токов, длительностью 100 мсек при ступенчатом смещении мембранного потенциала от -80 мВ в положительную сторону с шагом 10 мВ (в конфигурации Whole-cell, режим «Voltage clamp»). Удерживаемый потенциал -70 мВ, интервал между «ступеньками» – 2 сек. В анализируемых клетках удалось зарегистрировать

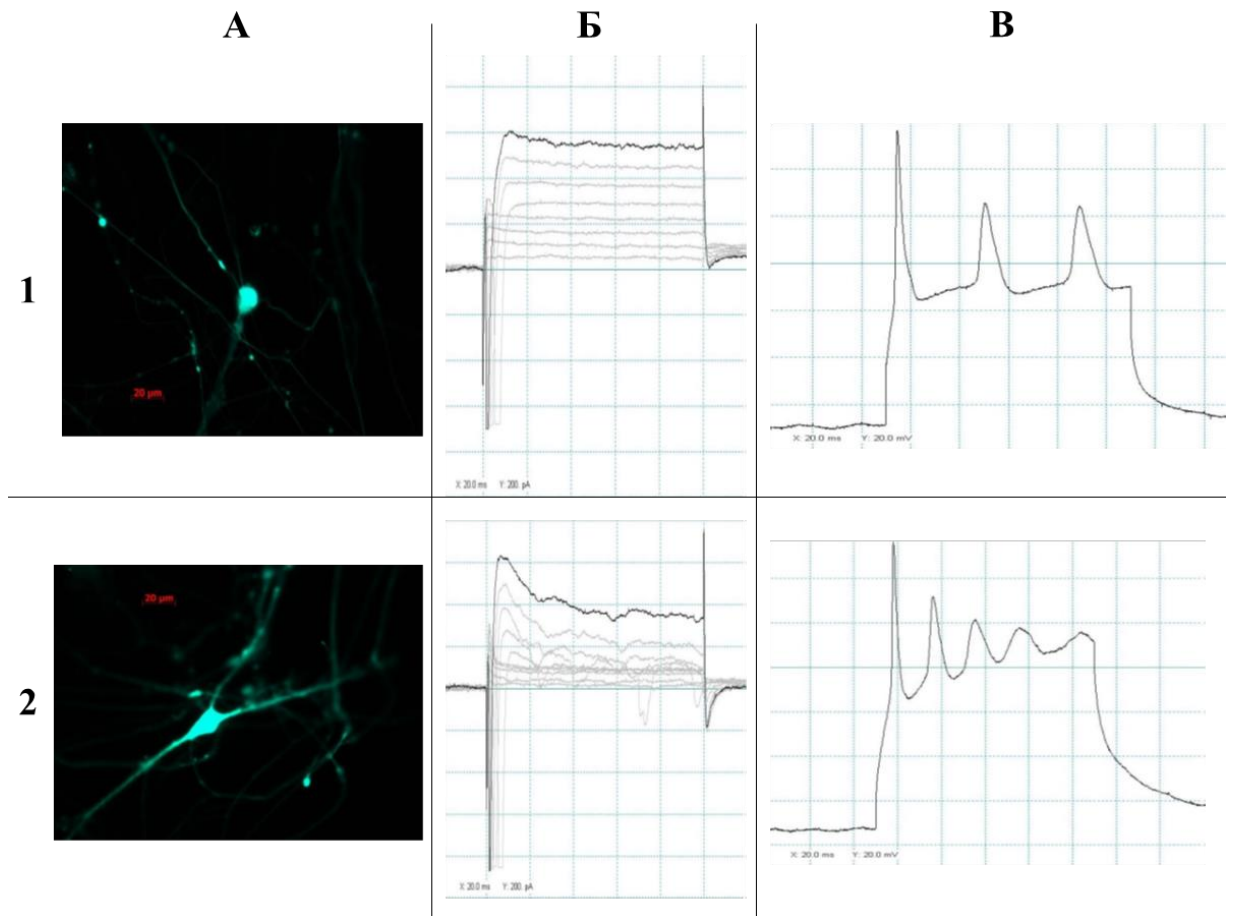


Рисунок 34 – Электрофизиологические характеристики нейрона, полученного на 45-й день нейрональной дифференцировки ИПСК линии iTAF1-36 с нормальным числом копий гена *CNTN6* (1) и iTAF4-14 с дупликацией гена *CNTN6* (2). (А) Флуоресцентное изображение нейрона, полученного в результате дифференцировки линии ИПСК iTAF1-36 и iTAF4-14. (Б, В) Записи токов этого нейрона. Хорошо виден высокоамплитудный натриевый ток отрицательной направленности (Б) и потенциал действия при подаче стимула амплитудой 100 пкА длительностью 100 мсек (В)

как входящие, так и выходящие токи, что свидетельствует о полноценной функциональности полученных нейронов. Таким образом, функциональные характеристики нейронов, полученных при параллельной дифференцировке линий ИПСК с нормальным и дуплицированным геном *CNTN6*, совпадают.

3.4 Анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с умственной отсталостью и здоровых доноров

Нормализованные данные экспрессии генов в 27 образцах нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов и их родственников с различным числом копий гена *CNTN6*, и здоровых доноров фибробластов кожи, а также двух образцов глиальных клеток мыши использованы для проведения анализа главных компонент (PCA), иерархической кластеризации и построения тепловой карты (Рисунок 35, 36).

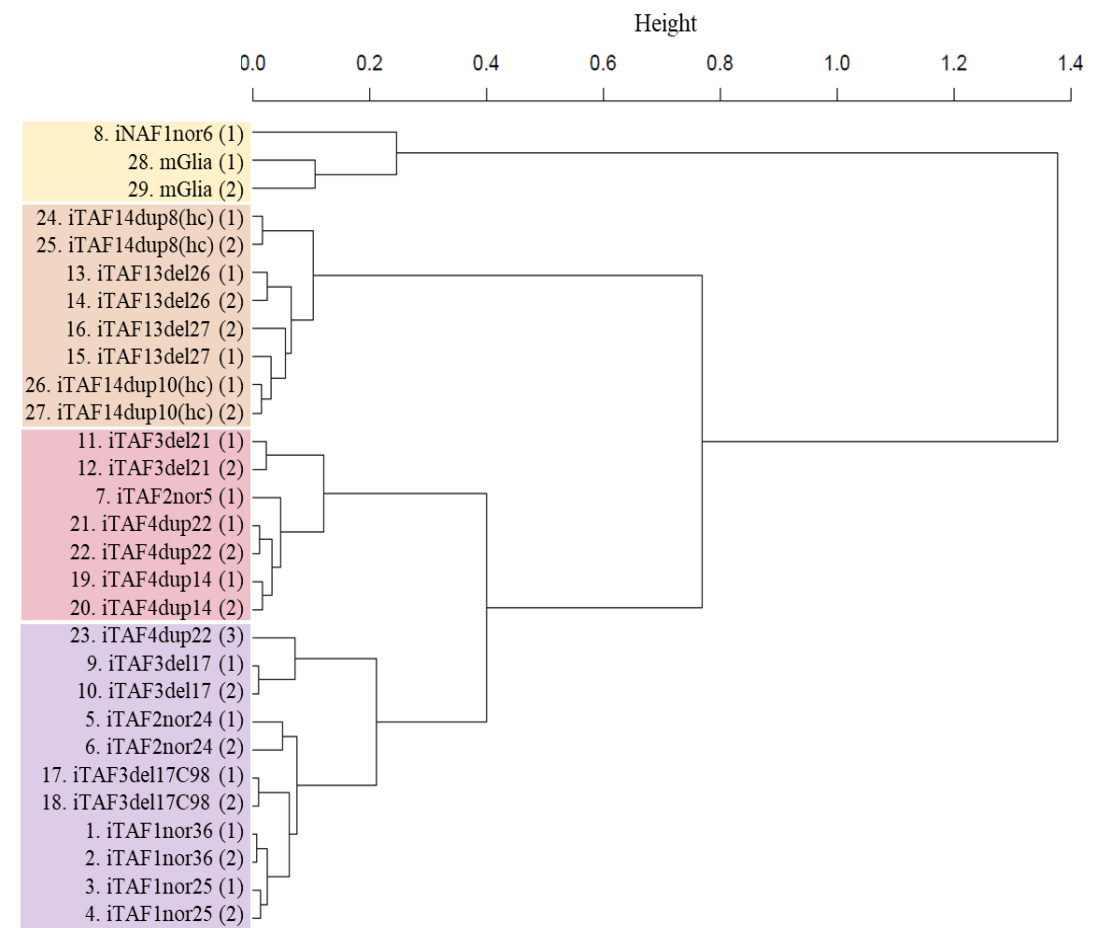
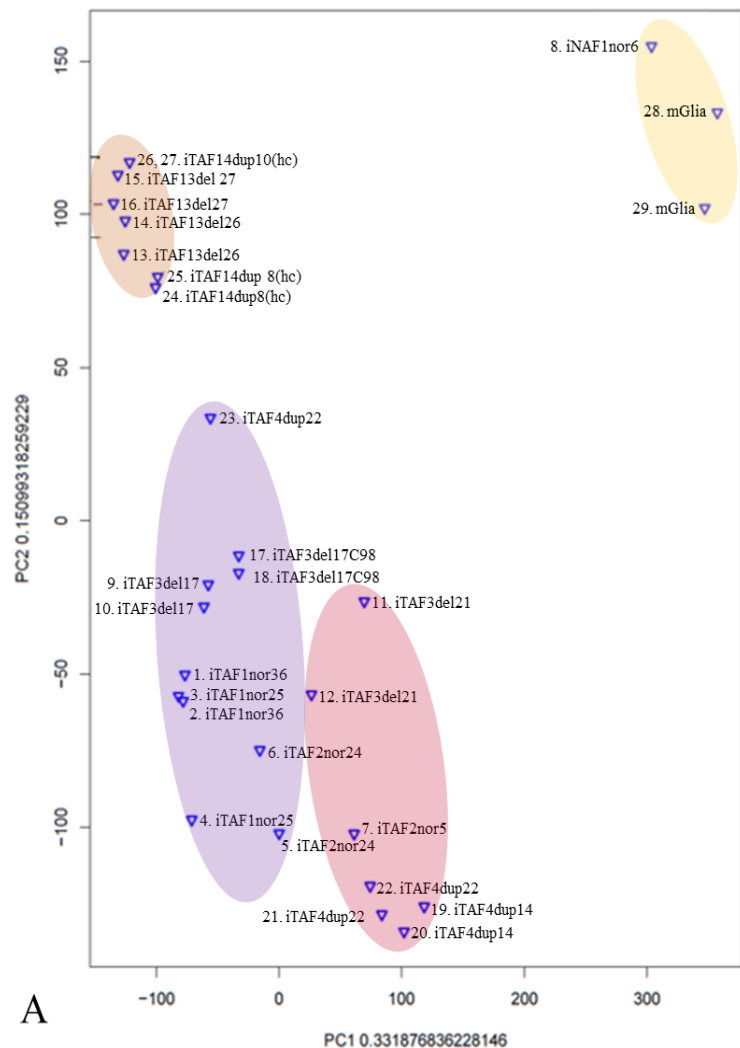


Рисунок 35 – (А) Диаграмма рассеяния PCA. Первая (PC1) и вторая главные компоненты (PC2) объясняют 33 % и 15 % общей дисперсии, соответственно. Номера реплик, указанные в Приложении Б в круглых скобках рядом с названием образца, не отмечены на графике. «hc» (healthy carrier) – здоровый носитель дупликации *CNTN6*. (Б) Кластерная дендрограмма. Цветные области на графике PCA соответствуют цветным кладам на дендрограмме

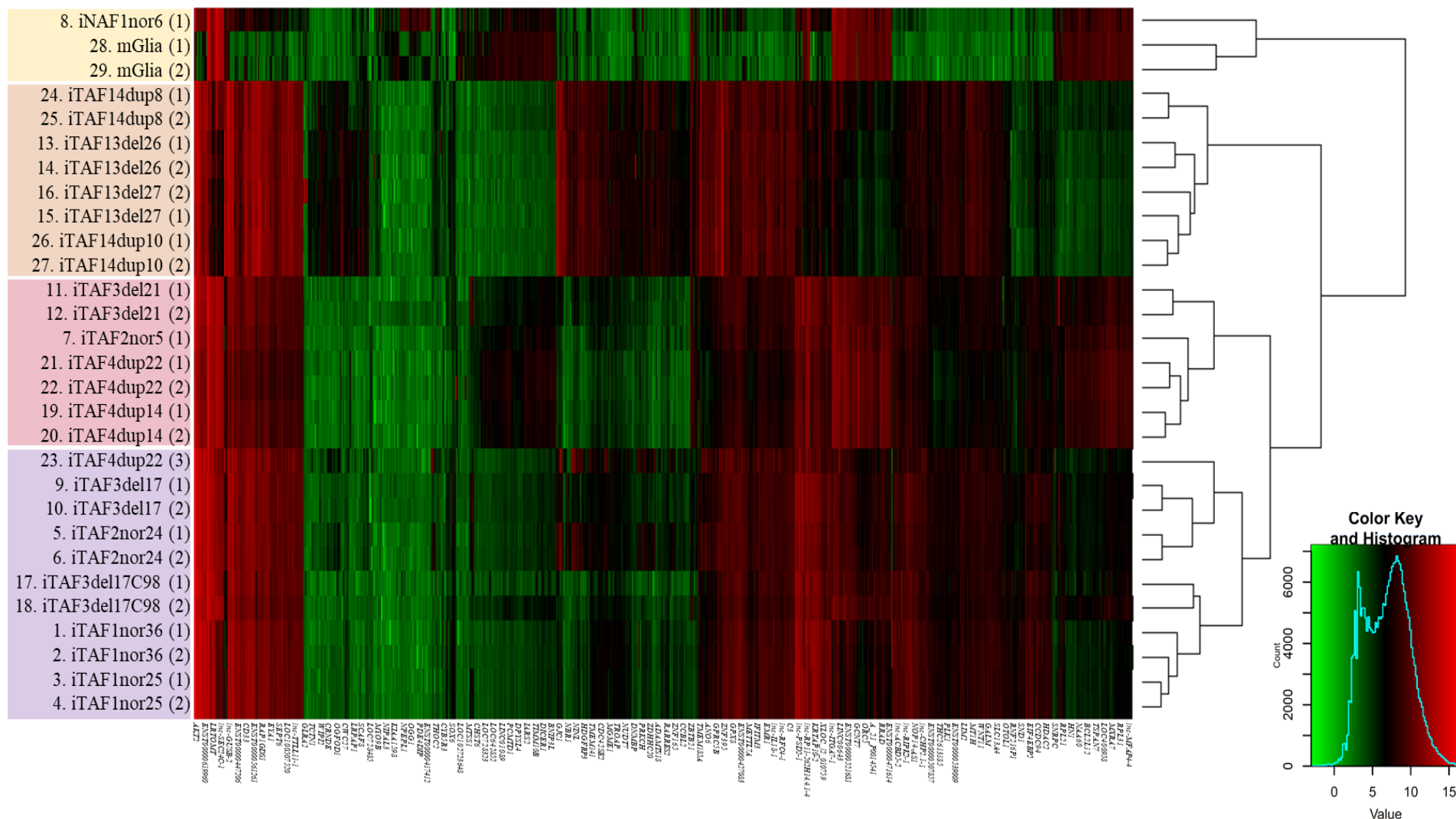


Рисунок 36 – Тепловая карта дифференциальной экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК, и глиальных клетках мыши по сравнению с контрольной линией клеток. В строках на тепловой карте представлены образцы. На карте отображена экспрессия 15 % наиболее вариабельных ДЭГ. В правой части рисунка показана кластерная дендрограмма и цветовая шкала тепловой карты. Красный цвет указывает на повышение, а зеленый цвет – на снижение экспрессии генов. Цветные обозначения названий образцов соответствуют обозначениям на диаграмме рассеяния PCA и дендрограмме на рисунке 35

РСА традиционно используется в качестве одного из основных способов уменьшения размерности данных, сопровождающегося потерей наименьшего количества информации. Полученная в ходе выполнения анализа диаграмма рассеяния позволяет визуализировать результаты и оценивать потенциальную связь между анализируемыми образцами (показывает кластеры образцов на основе сходства экспрессии их генов). Стоит отметить, что оси на полученном графике не равнозначны – близость по оси X важнее, чем по оси Y (на осях указано, какую долю различий между образцами они объясняют). В нашем случае первая главная компонента (PC1) описывает 33 % дисперсии, а вторая главная компонента (PC2) – 15 % дисперсии (Рисунок 35).

Наше изначальное предположение заключалось в том, что клетки с одним генотипом (гетерозиготной делецией, гомозиготной делецией, гетерозиготной дупликацией и нормальным числом копий гена *CNTN6*) будут кластеризоваться вместе. Однако проведенный РСА дал несколько противоречивые результаты. С одной стороны, часть образцов кластеризовались так, как мы и ожидали. Так, на диаграмме рассеяния РСА мы можем наблюдать, что реплики одних и тех же линий ИПСК, из которых дифференцировались нейроны, кластеризовались близко друг к другу. Образцы № 17 и 18 (iTAF3del17C98 (1, 2)) с генотипом *CNTN6*^{del/mut} были сгруппированы рядом с образцами с гетерозиготной делецией *CNTN6* (iTAF3del17 (1, 2)), которые были использованы для создания нокаутной линии клеток. Мышинные глиальные образцы № 28 и 29 (mGlia (1) и mGlia (2)) образовывали отдельный, далеко отстоящий от других, кластер, что можно объяснить их видовой тканевой и специфичностью.

С другой стороны, некоторые результаты оказались весьма неожиданными. Образец № 23 (iTAF4dup22 (3)) не кластеризовался с репликами той же линии ИПСК (образцы № 21, 22). Образец № 8 (iNAF1nor6 (1)) кластеризовался отдельно от клеток, полученных от других здоровых доноров (№ 1–7), образуя при этом группу с глиальными образцами. Несмотря на тот факт, что направленная дифференцировка для клеток каждой линии ИПСК проводилась в двух повторностях, конечный этап нейрональной дифференцировки линий iTAF2nor5 и iNAF1nor6 смогла пройти только одна из двух реплик (образцы № 7 и 8). Мы предполагаем, что наблюдаемые «отклонения» от ожидаемой кластеризации могут быть объяснены нарушениями в процессе нейрональной дифференцировки и пробоподготовки для проведения микроматричного анализа экспрессии генов. Образцы № 7, 8 и 23 были исключены из дальнейшего биоинформатического анализа.

Одним из самых неожиданных стал результат кластеризации нейрональных образцов № 24–27 (iTAF14dup8(hc) (1, 2), iTAF14dup10(hc) (1, 2)), дифференцированных из ИПСК условно здорового носителя микродупликации *CNTN6*, с образцами № 13–16 (iTAF13del26

(1, 2), iTAF13del27 (1, 2)), полученных из ИПСК пациента Ф2 с микроделецией *CNTN6* (Рисунок 35, оранжевый кластер). На рисунке 36 представлена тепловая карта, отражающая дифференциальную экспрессию 15 % наиболее вариабельных генов в клетках с микроделецией и микродупликацией по сравнению с образцами с нормальным числом копий гена *CNTN6*. Данная карта позволяет визуальное оценить характер изменения экспрессии части генов в каждом из анализируемых образцов. Так, изменение экспрессии глиальных мышечных клеток заметно отличается от паттерна дифференциальной экспрессии нейронов. «Оранжевый кластер», включающий в себя образцы с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*, характеризуется схожими изменениями экспрессии ряда генов. В данном случае мы исключаем вероятность ошибки, приведшей к случайной дифференцировке линий с одинаковым генотипом. Вероятно, причина такой кластеризации может быть связана как с нарушениями в процессе дифференцировки и микрочиповой пробоподготовки, так и существованием общего паттерна экспрессии некоторых генов, на которые не влияют исследуемые CNV в нейронах как с микроделецией, так и с микродупликацией *CNTN6*.

3.4.1 Дифференциальная экспрессия генов в нейронах с разным числом копий *CNTN6*

Для получения и последующего анализа списков ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с нарушением нервно-психического развития и несущих разное число копий гена *CNTN6*, было проведено сравнение уровней экспрессии генов в следующих шести группах (Таблица 14).

Таблица 14 – Группы сравнения для идентификации ДЭГ

№	Группа сравнения	Повышение экспрессии	Снижение экспрессии	Общее число ДЭГ
1	Гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i> (брат) – норма	338	803	1141
2	Гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i> (сестра) – норма	1832	1386	3218
3	Нокаут <i>CNTN6</i> ^{del/mut} – норма	49	168	217
4	Нокаут <i>CNTN6</i> ^{del/mut} – гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i>	98	285	383
5	Гетерозиготная дупликация <i>CNTN6</i> (пробанд) – норма	384	3138	3522
6	Гетерозиготная дупликация <i>CNTN6</i> (родитель) – норма	1835	1393	3228

Примечание: «норма» – нейроны, дифференцированные из ИПСК пациентов с нормальным числом копий гена *CNTN6*

В таблице 14 представлена информация об общем числе ДЭГ в разных группах сравнения. Данное число варьирует в широких пределах: минимальное в группе «Нокаут *CNTN6*^{del/mut} – норма» и максимальное в группе «Гетерозиготная дупликация *CNTN6*

(пробанд) – норма» (217 и 3522 гена, соответственно). Стоит отметить, что при выявлении ДЭГ мы воспользовались поправкой на множественные сравнения (метод Бенджамини-Хохберга), минимизируя вероятность принять ложноотрицательный результат. Результаты сравнения отношений гипер- и гипоэкспрессирующихся генов указывают на тенденцию к преобладанию сниженной экспрессии среди ДЭГ во всех группах, за исключением групп «Гетерозиготная дупликация *CNTN6* (родитель) – норма» и «Гетерозиготная делеция *CNTN6* (сестра) – норма» (Рисунок 37), в которых, наоборот, преобладают гиперэкспрессирующиеся гены.

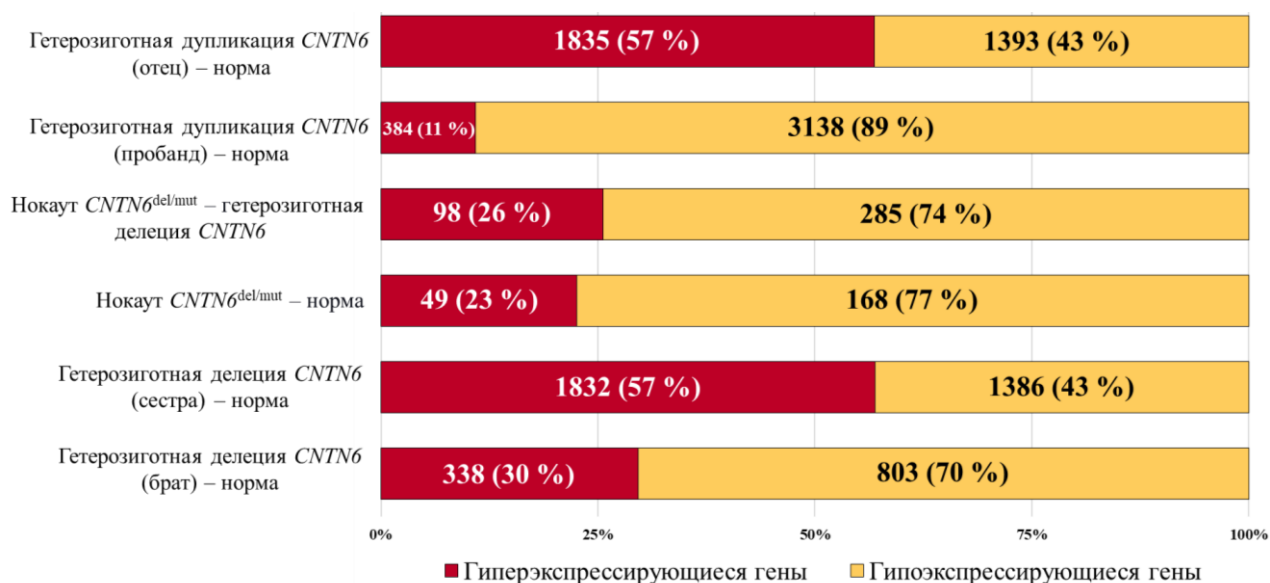


Рисунок 37 – Нормированная диаграмма распределения числа гипер- и гипоэкспрессирующихся генов в шести группах сравнения (в скобках указаны процент от общего числа ДЭГ для каждой из групп сравнения)

1) Общее число ДЭГ в группе сравнения «Гетерозиготная делеция *CNTN6* (брат) – норма» составило 1141 (338 гипер- и 803 гипоэкспрессирующихся гена) (Таблица 14). Для того, чтобы установить, есть ли среди выявленных нами ДЭГ какие-либо значимо обогащенные группы генов, мы воспользовались веб-ресурсом WebGestalt (Приложение Г, Таблица Г.1). Анализ выявил 17 обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$), в частности: ответ на действие интерферона-альфа, клеточный ответ на алкалоиды, организация цитоскелета, процессы гестации, локализация белка на периферии клетки, движение клетки или субклеточного компонента, положительная регуляция каталитической активности, регуляция жизненного цикла вируса и репликации вирусного генома (Рисунок 38).

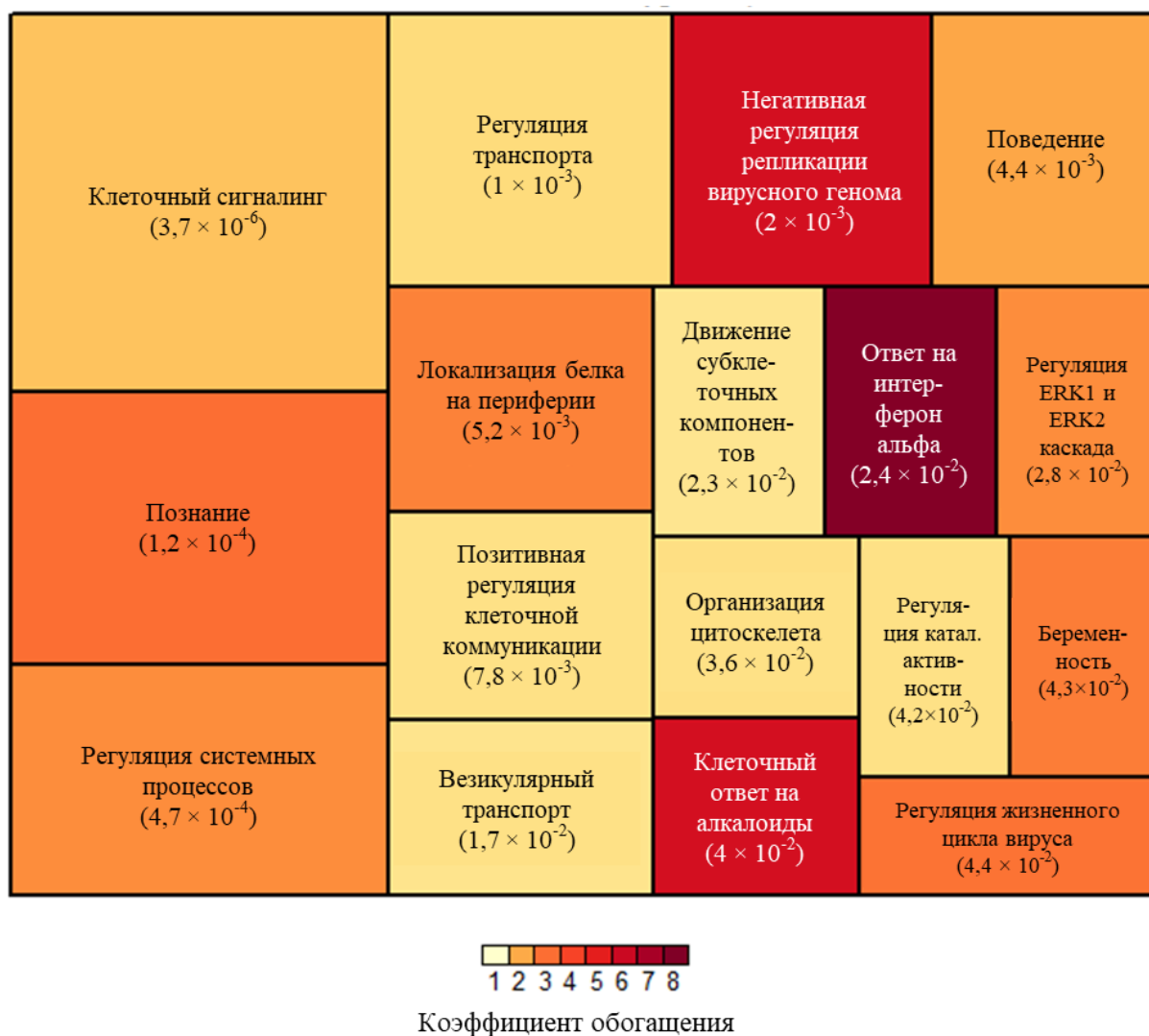


Рисунок 38 – Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микроделецией *CNTN6*, полученных из ИПСК брата, относительно нейронов без хромосомной мутации. Здесь и далее для всех представленных древовидных карт: размер прямоугольника пропорционален уровню значимости P_{FDR} (указан в скобках под названием категории). Цвет каждого прямоугольника отражает величину коэффициента обогащения, измеренного как отношение количества наблюдаемых генов и количества ожидаемых генов из каждой категории в списке ДЭГ

Примечательно, что следующие категории, связанные с развитием ЦНС, также были статистически значимо обогащены: познание, поведение, клеточная коммуникация, регуляция процессов транспорта, системных процессов и ERK каскада. Стоит отметить, что при проведении анализа обогащения только лишь для гипохеэкспрессирующихся генов из данной группы сравнения (803 ДЭГ), были выявлены следующие статистически значимо обогащенные категории биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$): синаптическая передача сигналов, цикл синаптических везикул, регуляция транспорта, локализация рецептора в синапсе, развитие нейрона и регуляция синаптической пластичности.

Среди категории генных онтологий для молекулярных функций статистически значимо оказались обогащены следующие категории: активность канала ($P_{FDR} = 0,043$), связывание фосфолипидов ($P_{FDR} = 0,049$), ионов кальция ($P_{FDR} = 0,02$), пуриновых рибонуклеотидов ($P_{FDR} = 0,042$), а также регуляция молекулярных функций ($P_{FDR} = 0,045$). Статистически значимо обогащенные категории генных онтологий для клеточных компартментов включали в себя ($P_{FDR} < 0,05$): синапс, нейрон, рецепторный комплекс, апикальная часть клетки, плазматическая мембрана, клеточный контакт, эндосомы, секреторные пузырьки, протеиновый комплекс, связанный с плазматической мембраной, цитоскелет, вакуоль и внутренняя поверхность плазматической мембраны.

Среди гиперэкспрессирующихся можно выделить гены, кодирующие кальций-связывающие белки S100P и S100A16 (увеличение экспрессии в 37,6 раза и 21,5 раза, соответственно), белок 7, связывающий инсулиноподобный фактор роста (*IGFBP7*, увеличение экспрессии в 20,8 раза), актин (*ACTG2*, увеличение экспрессии в 18,5 раза), катепсин V (*CTSV*, увеличение экспрессии в 15,6 раза) и миоферлин (*MYOF*, увеличение экспрессии в 15,5 раза). Наибольшее снижение экспрессии среди гипоекспрессирующихся ДЭГ было показано для генов, кодирующих натрий-активируемый калиевый канал (*KCNT1*, снижение экспрессии в 13,9 раза) и транскрипционный фактор PEG3 (снижение экспрессии в 13 раз). В данной группе сравнения снижение экспрессии было показано для гена *NRXN3*, кодирующего нейрональную молекулу нейрексин-3, выступающую в роли рецептора и молекулы межклеточной адгезии; генов *NLGN3* (нейролигин 3), *SYN3* (синапсин III), *SYP* (синаптофизин), *SYT6* и *SYT13* (синаптотагмин 6 и 13), кодирующих вовлеченные в синаптогенез белки. Сниженной оказалась экспрессия генов, продукты которых являются субъединицами лиганд-зависимых ионных каналов глутаматных AMPA- и NMDA-рецепторов (*GRIA2*, *GRIN1*).

Стоит отметить, что большинство биологических процессов, в которые вовлечены гипоекспрессирующиеся гены в нейронах с гетерозиготной микроделецией 3p26.3, связано с развитием и функционированием ЦНС. Нарушение данных процессов вследствие изменения экспрессии ряда генов, непосредственно не вовлеченных в хромосомную перестройку, вероятно, может приводить к развитию интеллектуальных нарушений, характерных для пациентов с микроделецией *CNTN6*. Преимущественная локализация белковых продуктов гипоекспрессирующихся генов – пре- и постсинаптические мембраны, синаптические пузырьки, сома и отростки нервных клеток – также указывает на возможную связь изменения экспрессии данных генов и развития в ЦНС патологических процессов, приводящих к нарушению интеллекта.

2) Общее число ДЭГ в группе сравнения «Гетерозиготная делеция *CNTN6* (сестра) – норма» составило 3218 (1832 гипер- и 1386 гипозэкспрессирующихся генов) (Таблица 14). Анализ обогащения категорий генных онтологий для биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$) выявил следующие категории: долгосрочная память, развитие сердечного клапана, позитивная регуляция синаптической передачи, репликация ДНК, развитие мезенхимы, развитие костной системы, миграция клеток (Рисунок 39).

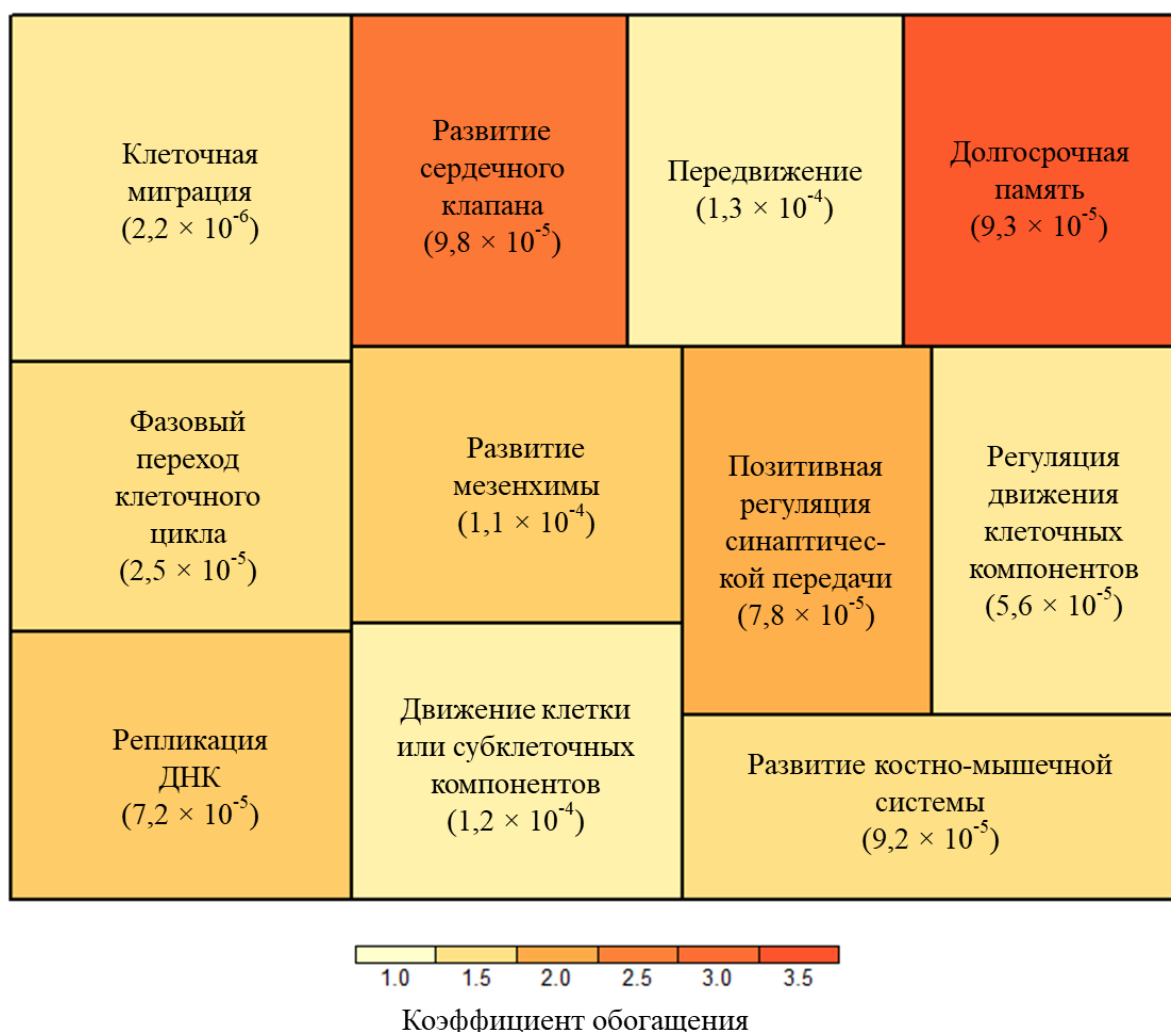


Рисунок 39 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микроделецией *CNTN6*, полученных из ИПСК сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации

Среди категорий генных онтологий для молекулярных процессов статистически значимо обогащенными ($P_{FDR} < 0,05$) оказались такие категории, как: сульфотрансферазная активность, связывание фосфолипидов, специфическое связывание белковых доменов, пуриновых рибонуклеотидов и молекул лекарственных средств. Статистически значимо обогащенные категории генных онтологий для клеточных компартментов включали в себя: внеклеточный матрикс, цитоскелет клетки, цитоплазматическая мембрана, митохондрии,

аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, ядрышки и ядро клетки, а также клеточные контакты и нейрон ($P_{FDR} < 0,05$).

Анализ обогащения, проведенный только для гипохеэкспрессирующихся ДЭГ данной группы сравнения, показал вовлеченность генных продуктов с регуляцию газообмена, организацию синапсов, поведение, межклеточную передачу сигнала, нейрогенез, морфогенез клеток, ионный транспорт, развитие ЦНС, движение клетки или субклеточных компонентов, организацию цитоскелета клетки и опосредованный везикулами транспорт ($P_{FDR} < 0,05$). Продукты гипохеэкспрессирующихся генов локализованы в синапсах, эндосомах, аппарате Гольджи и белковых комплексах цитоплазматической мембраны ($P_{FDR} < 0,05$). Таким образом, при сравнении ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК брата и сестры с микроделецией гена *CNTN6*, выявлены гены, снижающие свою экспрессию относительно нормы. Продукты данных ДЭГ участвуют в развитии ЦНС, нейрогенезе, образовании и функционировании синаптических контактов.

Наибольшее сильное увеличение экспрессии с данной группе сравнения было показано для генов, кодирующих индуцированные интерфероном трансмембранные белки 3 и 1 (*IFITM3* и *IFITM1*, увеличение экспрессии в 513 раз и 415 раз, соответственно), катепсин V (*CTSV*, увеличение экспрессии в 480 раз) и белок, экспрессирующийся в клетках производных сердца и нервного гребня (*HAND1*, увеличение экспрессии в 342 раза). Сниженная экспрессия была детектирована у генов, кодирующих белок, взаимодействующий с гентингином (*HIP1R*, снижение экспрессии в 52 раза), хромогранин А (*CHGA*, снижение экспрессии в 40,8 раза), регулятор сигналинга, опосредованного G-белками (*RGS11*, снижение экспрессии в 39,7 раза) и АТФ-связывающий кассетный транспортер (*ABCC8*, снижение экспрессии в 37,4 раза).

3) Для того, чтобы оценить эффект мутаций в регионе 3p26.3 на молекулярные процессы, происходящие в нейронах, была создана линия ИПСК с нокаутом гена *CNTN6* (генотип *CNTN6^{del/mut}*). В данной линии оба гомолога хромосомы 3 несут мутации, приводящие или к отсутствию кодирующей части гена, или к трансляции нефункционального белка. Было высказано предположение, что два нефункциональных аллеля *CNTN6* влияют на экспрессию генов в нейронах более существенно, чем наличие делеции только в одном гомологе хромосомы 3. Транскриптомный анализ показал, что число гипер- и гипохеэкспрессирующихся генов в группе сравнения «Нокаут *CNTN6^{del/mut}* – норма» составило 49 и 168 генов, соответственно. А общее число ДЭГ – 217 – являлось наименьшим среди всех групп сравнения. Таким образом, паттерн экспрессии генов в нейронах с функциональной нуллисомией по гену *CNTN6* был близок к паттерну клеток с нормальным кариотипом. Анализ обогащения, проведенный для 217 ДЭГ, не показал статистически

значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов и молекулярных функций, что могло явиться следствием небольшого числа анализируемых ДЭГ. Результаты анализа показали ($P_{FDR} > 0,05$), что продукты ДЭГ связаны с такими биологическими процессами, как биосинтез цГМФ, локализация белка на плазматической мембране, транспорт катионов, негативная регуляция межклеточной коммуникации, регуляция процессов модификации белка, нейрогенез и системные процессы. Статистически значимо обогащенными категориями для клеточных компартментов оказались: синапс ($P_{FDR} = 6,6 \times 10^{-3}$), нейрон ($P_{FDR} = 2,4 \times 10^{-3}$), компоненты клеточной мембраны ($P_{FDR} = 8,3 \times 10^{-3}$) и удлинения клетки, ограниченные плазматической мембраной, такие как реснички, ламеллоподии или аксоны ($P_{FDR} = 0,042$).

Наибольшее увеличение экспрессии с данной группе сравнения было показано для генов, кодирующих транскрипционный фактор, содержащий гомеодомен POU (*POU5F1*, увеличение экспрессии в 20,2 раза), металлотионеин (*MT1G*, увеличение экспрессии в 18,9 раза), фактор транскрипции *NEUROD1* (*NEUROD1*, увеличение экспрессии в 9,8 раза), актин (*ACTG2*, увеличение экспрессии в 9,6 раза) и белок, принадлежащий семейству молекул NLRP (*NLRP7*, увеличение экспрессии в 8,2 раза). Наиболее значительное снижение экспрессии было показано для генов, кодирующих транскрипционный фактор *PEG3* (*PEG3*, снижение экспрессии в 25,2 раза), фосфатазу двойной специфичности (*DUSP9*, снижение экспрессии в 15,1 раза), TSPY подобный белок (*TSPYL5*, снижение экспрессии в 11,2 раза) и медьсодержащую аминоксидазу (*AOC2*, снижение экспрессии в 11 раз).

4) Сравнение уровней экспрессии в нейронах с нокаутом и клетках с гетерозиготной микроделецией *CNTN6* выявило 383 ДЭГ (98 гипер- и 285 гипоэкспрессирующихся генов). В данном случае задачей было установить, к каким изменениям экспрессии генов в нейронах приводит дополнительная мутация на интактном гомологе хромосомы 3. Как и в предыдущей группе сравнения, анализ обогащения не выявил статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов и молекулярных функций ($P_{FDR} > 0,05$), вероятно, из-за небольшого объема выборки ДЭГ. Продукты ДЭГ из данной группы сравнения участвуют в процессах сигнальный путь ионотропного рецептора глутамата, ответе на действие цитокинов, регуляции активности сигнальных рецепторов, отрицательной регуляции транскрипции РНК-полимеразой II, организации синапсов, клеточной адгезии, миграции клеток, развитии ЦНС и мышечной ткани, дифференцировке эпителиальных клеток и иммунном ответе. Статистически значимо обогащенные категории генных онтологий для клеточных компартментов включали в себя межклеточные контакты ($P_{FDR} = 7,2 \times 10^{-5}$) и экзосомы ($P_{FDR} = 0,019$).

Наибольшее увеличение экспрессии в данной группе сравнения было показано для генов, кодирующих митохондриальный белок *CHCHD2* (*CHCHD2*, увеличение экспрессии в 10,3 раза) и богатый лейциновыми повторами белок *LRRC61* (*LRRC61*, увеличение экспрессии в 5,3 раза), а снижение – для генов, кодирующих фосфатазу двойной специфичности (*DUSP9*, снижение экспрессии в 9,7 раза) и УДФ-глюкуронилтрансферазу (*UGT2B15*, снижение экспрессии в 7,6 раза).

5) В группе сравнения «Гетерозиготная дупликация *CNTN6* (пробанд) – норма» выявлено 384 (11 %) гипер- и 3138 (89 %) гипоэкспрессирующихся генов. Общее число ДЭГ – 3522 – было максимальным среди всех групп сравнения. Статистически значимо обогащенные категории генных онтологий представлены на рисунке 40. Они включали в себя регуляцию катаболизма белка-предшественника амилоида, организацию везикул, сборку и локализацию белковых комплексов, организацию митохондрий, процессинг РНК, сборку и локализацию органелл, модификацию протеинов путем конъюгации или удаления малых белковых молекул, внутриклеточный транспорт, организацию хромосомы, клеточный цикл и ответ клетки на стресс.

Среди категорий генных онтологий для молекулярных процессов статистически значимо обогащенными ($PFDR < 0,05$) оказались такие категории, как: каталитическая активность, трансферазная активность, связанная с переносом ацильных групп, связывание РНК, гистондеацетилазы, фосфатидилинозитола, РНК, пуриновых нуклеотидов и молекул лекарственных средств. Список обогащенных категорий генных онтологий для клеточных компартментов включал в себя большое число разнообразных локализаций ($PFDR < 0,05$): цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл, цитоскелет клетки, эндоплазматическая сеть, митохондрии, аппарат Гольджи, нуклеоплазма, хромосомы, каталитические и рибонуклеопротеидные комплексы, клеточные контакты и проекции (продолжение клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной).

Наибольшее увеличение экспрессии с данной группе сравнения было показано для генов, кодирующих никотинамидрибозидкиназу 2 (*NMRK2*; увеличение экспрессии в 6,1 раза), мембранный транспортер *SLC15A3* (увеличение экспрессии в 4,2 раза) и содержащий агм-повторы белок *ARMCX4* (увеличение экспрессии в 4,2 раза). Экспрессия не кодирующих белок генов *LINC00443*, *LINC01114* и *LOC284454* была увеличена в 12,2, 7,2 и 6 раз, соответственно. Сниженная экспрессия была детектирована у генов, кодирующих транскрипционный фактор *PEG3* (снижение экспрессии в 20,1 раза), уротензин 2 (*UTS2B*, снижение экспрессии в 17,2 раза), нейропептид нейромедин U (*NMU*, снижение экспрессии в 16,6 раза), а также содержащий гомеодомен белок *SIX1* (снижение экспрессии в 14,8 раза).

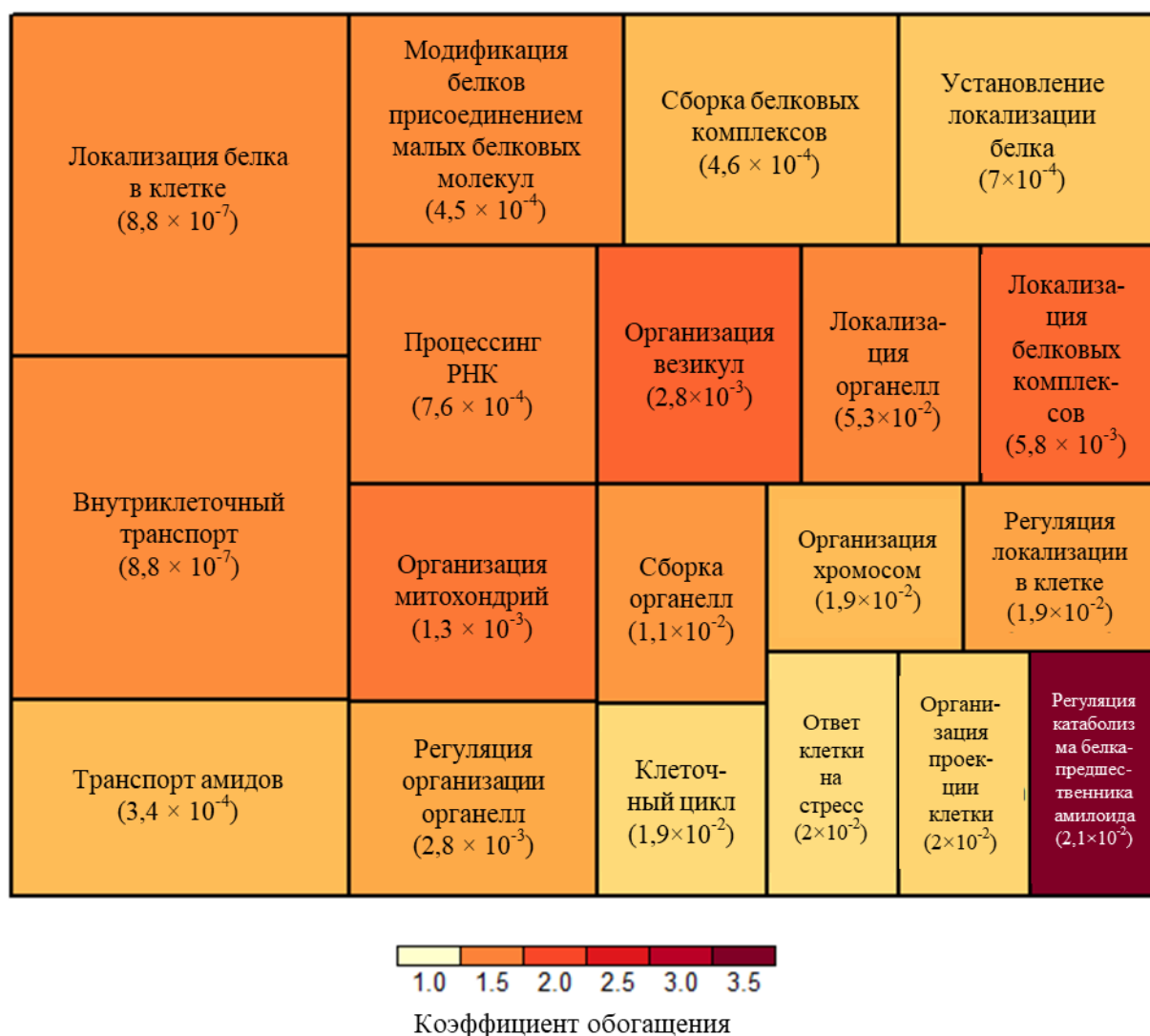


Рисунок 40 – Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микродупликацией *CNTN6*, полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями, относительно нейронов без хромосомной мутации

6) Шестая группа сравнения уровней экспрессии «Гетерозиготная дупликация *CNTN6* (родитель) – норма» также характеризовалась большим числом выявленных ДЭГ (1835 (57 %) гипер-, 1393 (43 %) гипоэкспрессирующихся гена; общее число ДЭГ равнялось 3228). Тем не менее, несмотря на достаточно большой объем выборки ДЭГ, использованный для анализа обогащения, статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов, за исключением клеточной миграции ($P_{FDR} = 0,027$), выявлено не было. Показано, что продукты ДЭГ вовлечены в процессы долгосрочной памяти, катаболизма пиримидиновых рибонуклеозидов, метаболизм ДНК, морфогенез клапанов сердца, развитие мезенхимы, развитие костной системы, регуляцию репликации вирусного генома, фосфорилирования белка, сигнального пути рецептора глутамата, ERK каскада и клеточного цикла, положительную регуляцию синаптической передачи и молекулярных

функций ($P_{FDR} > 0,05$). Обогащенными категориями генных онтологий для молекулярных функций были следующие категории: сульфотрансферазная активность ($P_{FDR} = 0,034$), связывание фосфолипидов ($P_{FDR} = 0,029$), пуриновых рибонуклеотидов ($P_{FDR} = 5 \times 10^{-5}$), молекул лекарственных средств ($P_{FDR} = 7 \times 10^{-4}$), а также специфическое связывание доменов белка ($P_{FDR} = 0,046$). Список статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для клеточных компартментов ($P_{FDR} < 0,05$) включал в себя такие категории, как: цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл, цитоскелет клетки, эндоплазматическая сеть, митохондрии, аппарат Гольджи, ядрышки и нуклеоплазма, хромосомы, каталитические и рибонуклеопротеидные комплексы, клеточные контакты и проекции клеток, синапсы, нейроны, рецепторные комплексы, внеклеточный матрикс, эндосомы, и экзосомы.

3.4.2 Транскриптомные эффекты моногенных реципрокных CNV с вовлечением гена *CNTN6* в нейрональных клетках

Одной из основных задач данного исследования являлось сравнение особенностей изменения экспрессии генов в нейронах, несущих реципрокные CNV в регионе 3p26.3, относительно клеток с нормальным кариотипом. Особый интерес в данном случае представляют гены, изменившие свою экспрессию как в клетках с микроделецией, так и микродупликацией *CNTN6*. В ходе анализа полученных списков ДЭГ, выделены гены, изменившие свою экспрессию в клетках с разным генотипом (Рисунок 41).

Так, для данных групп сравнения «общими» – т.е. изменившими свою экспрессию в клетках с обоими типами мутаций – оказались 485 ДЭГ, большая часть которых снижала свою экспрессию в клетках с реципрокными CNV. Помимо генов, изменивших свою экспрессию в клетках с различным числом копий гена *CNTN6*, были выявлены «уникальные» ДЭГ, изменение экспрессии которых было отмечено только для клеточных линий с определенным типом хромосомной мутации. При этом экспрессия в нейронах с другой хромосомной абберацией и в клетках контрольных линий не изменялась.

По характеру изменений экспрессии общих ДЭГ в клетках с гетерозиготной микроделецией и микродупликацией *CNTN6* относительно клеток с нормальным генотипом, мы идентифицировали 8 категорий транскриптомных эффектов реципрокных моногенных CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, соответствующих аддитивной, U-образной и доминантной моделям проявлений реципрокных CNV (Приложение Г, Таблица Г.3):

- 1) повышение экспрессии общих ДЭГ в нейронах с делецией и дупликацией 3p26.3 (25 ДЭГ) – U-образная модель;
- 2) снижение экспрессии общих ДЭГ в нейронах с делецией и дупликацией 3p26.3 (402 ДЭГ) – U-образная модель;



Рисунок 41 – Круговые диаграммы, отражающие ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК с микродупликацией (А) и микроделецией (Б) гена *CNTN6*, при сравнении с нейронами без хромосомной мутации

- 3) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией 3p26.3, и повышение экспрессии этих же генов в нейронах, полученных из ИПСК с делецией 3p26.3 (51 ДЭГ) – аддитивная модель;
- 4) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией 3p26.3, и снижение экспрессии этих же генов в нейронах, полученных из ИПСК с делецией 3p26.3 (7 ДЭГ) – аддитивная модель;
- 5) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией 3p26.3 и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК с делецией *CNTN6* (352 ДЭГ) – доминантная модель;
- 6) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией 3p26.3 и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК с делецией *CNTN6* (262 ДЭГ) – доминантная модель;
- 7) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с делецией 3p26.3 и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией *CNTN6* (2685 ДЭГ) – доминантная модель;
- 8) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с делецией 3p26.3 и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК с дупликацией *CNTN6* (394 ДЭГ) – доминантная модель.

Анализ обогащения генных онтологий для биологических процессов, проведенный для 485 общих ДЭГ, показал следующие результаты ($P_{FDR} < 0,05$): опосредованная интегрином регуляция клеточной адгезии, регуляция системных процессов, образования синапсов, транспорта веществ и мембранного потенциала, развитие клетки, локализация белковых комплексов, поведение и нейрогенез (Приложение Г, Таблица Г.4; Рисунок 42).



Рисунок 42 – Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих ДЭГ в нейронах с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*, полученных из ИПСК пациентов с интеллектуальными нарушениями, относительно нейронов без хромосомной мутации

Среди категорий генных онтологий для молекулярных функций обогащенными оказались следующие: активность трансмембранного переносчика неорганических катионов ($P_{FDR} = 0,018$) и связывание пуриновых нуклеотидов ($P_{FDR} = 0,018$). Обогащенными категориями для клеточных компартментов являлись: синапс, нейрон (сома, аксон и дендриты), цитоскелет, эндосомы, секреторные пузырьки, клеточные контакты, цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл. Наиболее обогащенной (коэффициент обогащения равен 3,8) оказалась категория «синапс» (64 гена из нашего набора ДЭГ

отнесены к данной категории). Подавляющее большинство генов, принадлежащих данной категории, характеризовалось сниженной относительно нормы экспрессией (64 из 65 генов).

Примечательно, что продукты ДЭГ в нейронах как с микроделецией, так и микродупликацией *CNTN6*, были вовлечены в следующие биологические процессы: клеточный сигналинг (синаптическая передача сигналов, позитивная регуляция синаптической передачи, модуляция химической синаптической передачи), регуляция образования синапсов, развитие клеток (развитие нейронов), нейрогенез (генерация, развитие и дифференцировка нейронов), регуляция транспорта веществ в клетке (регуляция цикла синаптических везикул), организация проекции клеток (организация проекции клеток, связанных с плазматической мембраной), локализация белковых комплексов (локализация рецепторов в синапсах) и везикулярный транспорт (экзоцитоз). Идентификация общих ДЭГ (преимущественно со сниженной регуляцией) и обогащенных категорий биологических процессов может указывать на общность затронутых перестройкой молекулярных путей, что в свою очередь, может объяснять схожесть фенотипических проявлений реципрокных CNV в регионе 3p26.3, в частности УО, РАС и др.

3.4.3 Особенности экспрессии генов в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных от условно здорового родителя и его ребенка с интеллектуальными нарушениями

В процессе работы нами были получены данные об изменении экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК условно здорового родителя и его сына с интеллектуальными нарушениями. Сравнение списков ДЭГ позволило выявить как общие, так и уникальные ДЭГ в клетках отца и сына. Общее количество ДЭГ в нейронах, полученных от пробанда и его отца, было примерно одинаковым (3522 против 3228) (Таблица 14). Как и в случае анализа нейронов, дифференцированных из ИПСК с реципрокными моногенными CNV, были идентифицированы 8 групп транскриптомных эффектов микродупликации 3p26.3 в нейронах, полученных из ИПСК бессимптомного носителя перестройки и его больного сына (Приложение Г, Таблицы Г.3, Г.5; Рисунок 43):

- 1) повышение экспрессии общих ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК отца и сына (47 ДЭГ) – U-образная модель;
- 2) снижение экспрессии общих ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК отца и сына (784 ДЭГ) – U-образная модель;
- 3) повышение экспрессии ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК сына и снижение экспрессии этих же ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК отца (14 ДЭГ) – аддитивная модель;

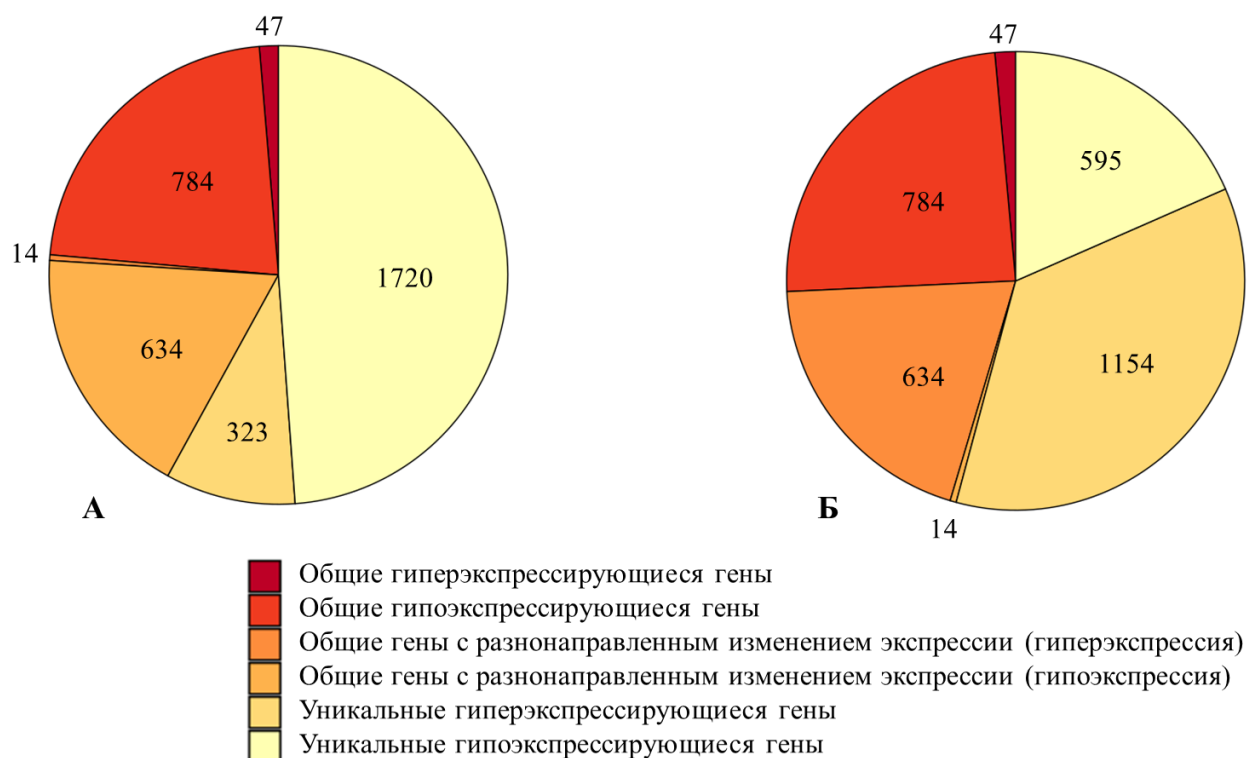


Рисунок 43 – Круговые диаграммы, отражающие общие и уникальные ДЭГ в нейронах с микроудупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда (А) и его условно здорового отца (Б), при сравнении с нейронами без хромосомной мутации

- 4) снижение экспрессии ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК сына и повышение экспрессии этих же ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК отца (634 ДЭГ) – аддитивная модель;
- 5) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК сына и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК отца (323 ДЭГ) – доминантная модель;
- 6) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК сына и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК отца (1720 ДЭГ) – доминантная модель;
- 7) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК отца и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК сына (1154 ДЭГ) – доминантная модель;
- 8) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК отца и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК сына (595 ДЭГ) – доминантная модель.

Анализ обогащения генных онтологий для биологических процессов выявил единственную статистически значимо обогащенную категорию – удлинения клетки, ограниченные плазматической мембраной ($P_{FDR} = 0,036$), к которой относятся процессы

сборки и диссоциации основных структурных элементов аксона. Продукты ДЭГ данной группы вовлечены в процессы связывания деацетилазы гистонов ($P_{FDR} = 0,01$), фосфатидилинозитола ($P_{FDR} = 0,007$), пуриновых рибонуклеотидов ($P_{FDR} = 0,001$), белков цитоскелета ($P_{FDR} = 0,006$) и специфических доменов белка ($P_{FDR} = 0,006$). Обогащенными категориями генных онтологий для клеточных компартментов ($P_{FDR} < 0,05$) являлись: синапс, нейрон (сома, аксон и дендриты), цитоскелет, аппарат Гольджи, митохондрии, эндосомы и экзосомы, секреторные пузырьки, клеточные контакты, цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл, а также хромосомы. Одной из наиболее обогащенных оказалась категория «синапс» (коэффициент обогащения равен 2, количество перекрывающихся генов – 104). Данные ДЭГ характеризовались сниженной экспрессией (103 из 104 генов снизили свою экспрессию в нейронах сына, 83 из 104 генов – в нейронах отца).

Среди описанных выше групп транскриптомных эффектов микродупликации 3p26.3 были отдельно проанализированы две группы с наибольшим числом общих ДЭГ (группа № 2 и № 3). Статистически значимо обогащенными категориями генных онтологий для биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$) являлись: образование синапсов, клеточный сигналинг, нейрогенез, везикулярный транспорт, сборка органелл, регуляция транспорта и развитие клетки (Приложение Г, Таблица Г.6; Рисунок 44).

ДЭГ, снижающие свою экспрессию в нейронах, дифференцированных из ИПСК сына, и повышающие свою экспрессию в клетках, полученных из ИПСК отца, участвуют в метаболизме ДНК, процессинге РНК и клеточной реакции на стресс (Приложение Г, Таблица Г.7). Стоит отметить, что соотношение общих и уникальных ДЭГ с повышенной и сниженной экспрессией различалось в нейронах, дифференцированных из ИПСК пробанда и его отца. Среди всех генов, изменивших свою экспрессию в нейронах пробанда, 89 % ДЭГ снижали свою экспрессию. В то время как процент гипо- и гиперэкспрессирующихся генов в клетках отца составил 43 % и 57 % от общего числа ДЭГ, соответственно (Рисунок 37). Нейроны пробанда характеризовались снижением экспрессии 96 % выявленных общих ДЭГ, в то время как аналогичный показатель для клеток условно здорового отца составил лишь 54 % ДЭГ (Рисунок 43 А, Б). Примечательно, что тенденция к снижению экспрессии в клетках пробанда прослеживается и среди его уникальных ДЭГ. Так, часть уникальных ДЭГ в клетках родителя характеризовалось повышенной и сниженной относительно нормы экспрессией (66 % и 34 % от общего числа уникальных ДЭГ, соответственно) (Рисунок 43 Б). Напротив, подавляющее число уникальных ДЭГ в нейронах мальчика снижало свою экспрессию (84 % от общего числа уникальных ДЭГ пробанда) (Рисунок 43 А).

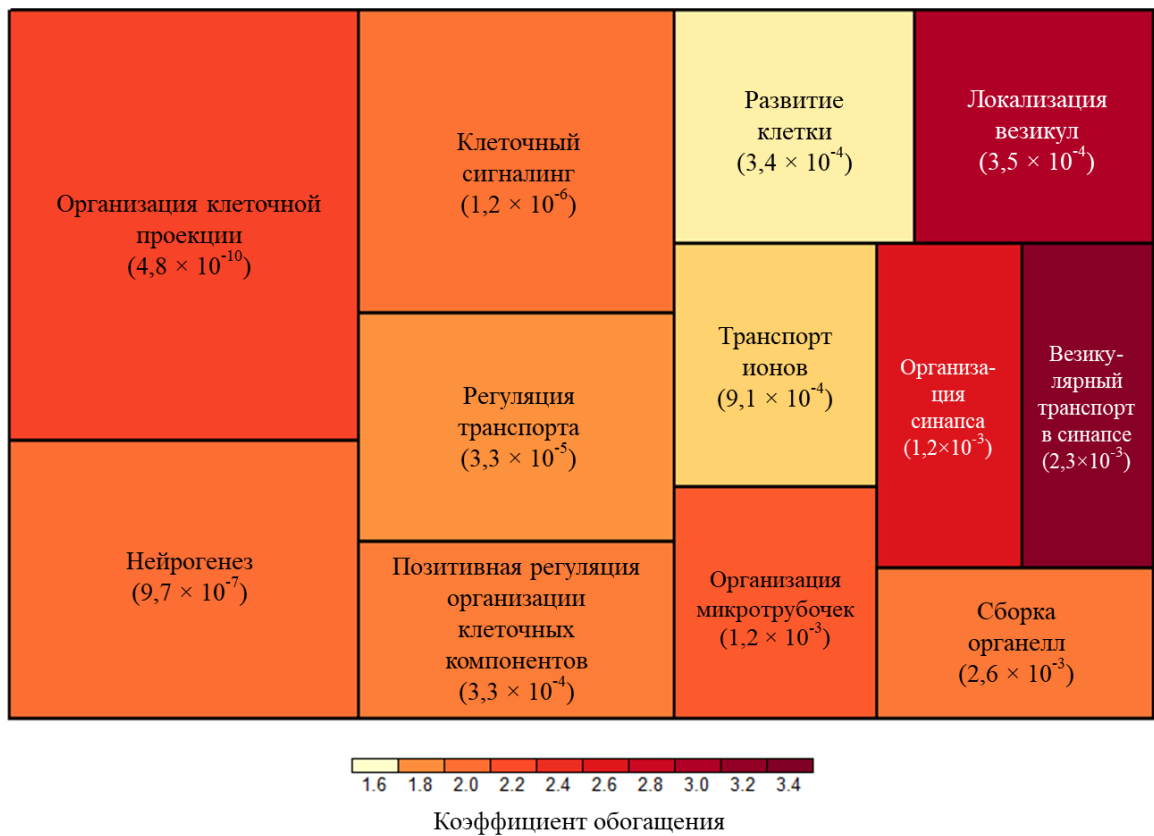
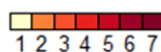


Рисунок 44 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих гипоекспрессирующихся ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда и его условно здорового отца, относительно нейронов без хромосомной мутации

Анализ обогащения категорий генных онтологий для биологических процессов, проведенный для уникальных ДЭГ в клетках сына с микродупликацией *CNTN6*, выявил ряд статистически значимо обогащенных категорий ($P_{FDR} < 0,05$), в частности, посттрансляционная модификация белков, внутриклеточный транспорт, локализация белка, процессинг РНК, регуляция катаболических процессов, клеточный ответ на повреждение ДНК, регуляция высвобождения вирусных частиц из клетки-хозяина, организация митохондрий, хромосом и везикул (Приложение Г, Таблица Г.8; Рисунок 45). Продукты ДЭГ локализованы в меланосомах, хромосомах, митохондриях, мембранах органелл, ядрышках, нуклеоплазме, экзосомах, эндоплазматическом ретикулуме и субкомпартаментах органелл.

Анализ обогащения категорий генных онтологий показал вовлеченность продуктов уникальных ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК условно здорового родителя, в процессы катаболизма цитидина, формирование анатомических структур и морфогенез органов, развитие кровеносной и скелетной систем, клеточную миграцию, регуляцию ERK и MAPK каскадов, а также пролиферацию эпителиальных клеток (Приложение Г, Таблица Г.8; Рисунок 46). Продукты ДЭГ экспрессируются на поверхности клетки, интегральном и

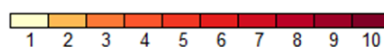
Транспорт амидов (1×10^{-3})	Локализация белков в клетке ($1,7 \times 10^{-3}$)	Установление локализации белка ($1,9 \times 10^{-3}$)	Организация митохондрий ($1,9 \times 10^{-3}$)	
Модификация белков присоединением малых белковых молекул (1×10^{-3})	Процессинг РНК ($3,1 \times 10^{-3}$)	Организация везикул ($2,5 \times 10^{-2}$)	Аутофагия ($2,8 \times 10^{-2}$)	Метаболизм некодирующих РНК ($3,3 \times 10^{-2}$)
Внутриклеточный транспорт (1×10^{-3})	Организация хромосом ($1,6 \times 10^{-2}$)	Катаболизм макромолекул ($3,4 \times 10^{-2}$)	Ответ клетки на повреждение ДНК ($3,8 \times 10^{-2}$)	
	Регуляция катаболических процессов ($1,9 \times 10^{-2}$)	Негативная регуляция выхода вируса из клетки-хозяина ($3,6 \times 10^{-2}$)	Модификация N-концевой аминокислоты ($4,3 \times 10^{-2}$)	



Коэффициент обогащения

Рисунок 45 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди уникальных ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда, относительно нейронов без хромосомной мутации

Катаболизм цитидина ($1,6 \times 10^{-2}$)	Формирование анатомической структуры, участвующей в морфогенезе ($1,7 \times 10^{-2}$)	Пролиферация эпителиальных клеток ($1,9 \times 10^{-2}$)	Позитивная регуляция клеточной миграции ($1,9 \times 10^{-2}$)
Превращение цитидина в уридин ($1,6 \times 10^{-2}$)	Морфогенез органов ($2,9 \times 10^{-2}$)	Развитие костно-мышечной системы ($2,9 \times 10^{-2}$)	Организация внеклеточных структур ($3,3 \times 10^{-2}$)
ERK1 и ERK2 каскад ($1,6 \times 10^{-2}$)	Развития сердечно-сосудистой системы ($2,9 \times 10^{-2}$)	Позитивная регуляция MAPK каскада ($3,8 \times 10^{-2}$)	Развитие мезенхимы ($4,2 \times 10^{-2}$)



Коэффициент обогащения

Рисунок 46 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди уникальных ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК здорового отца, относительно нейронов без хромосомной мутации

внутреннем компонентах плазматической мембраны, хромосомах, эндоплазматическом ретикулуме, мембранах и субкомпартаментах органелл, тримерах коллагена, I-полосе, рецепторных комплексах, внеклеточном матриксе, миофибриллах и ядрышках.

3.4.4 Сравнительный анализ изменения экспрессии генов в нейронах с микроделечией Зр26.3, дифференцированных из ИПСК сибсов с интеллектуальными нарушениями

В процессе работы было проведено сравнение ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК сибсов с нарушением нервно-психического развития, являющихся носителями микроделечии Зр26.3. Общее число выявленных ДЭГ в клетках брата и сестры составило 1141 и 3218, соответственно. Выявлены 8 категорий транскриптомных эффектов микроделечии Зр26.3, соответствующих U-образной, аддитивной и доминантной моделям (по Deshpande, Weiss, 2018) (Приложение Г, Таблица Г.3; Рисунок 47):



Рисунок 47 – Круговые диаграммы, отражающие общие и уникальные ДЭГ в нейронах с микроделечией Зр26.3, полученных из ИПСК пробанда (А) и его сестры (Б), при сравнении с нейронами без хромосомной мутации

- 1) повышение экспрессии общих ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК брата и сестры (248 ДЭГ) – U-образная модель;
- 2) снижение экспрессии общих ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК брата и сестры (404 ДЭГ) – U-образная модель;

- 3) повышение экспрессии ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК брата и снижение экспрессии этих же ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК сестры (8 ДЭГ) – аддитивная модель;
- 4) снижение экспрессии ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК брата и повышение экспрессии этих же ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК сестры (24 ДЭГ) – аддитивная модель;
- 5) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК брата и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК сестры (82 ДЭГ) – доминантная модель;
- 6) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК брата и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК сестры (375 ДЭГ) – доминантная модель;
- 7) повышение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК сестры и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК брата (1560 ДЭГ) – доминантная модель;
- 8) снижение экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК сестры и отсутствие изменения экспрессии в нейронах, полученных из ИПСК брата (974 ДЭГ) – доминантная модель.

Выявлено 684 ДЭГ, изменивших свою экспрессию как в нейронах, полученных из ИПСК как брата, так и сестры, при этом большая часть данных генов снижала свою экспрессию (404 ДЭГ, 59 % от числа общих ДЭГ). Анализ обогащения категорий генных онтологий для биологических процессов показал вовлеченность продуктов общих ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК сибсов, в негативную регуляцию пролиферации стволовых клеток, ответ на действие интерферона-альфа, негативную регуляцию репликации вирусного генома, сборку компонентов постсинаптической мембраны, регуляцию системных процессов, мембранного потенциала, транспорта, а также межклеточную передачу сигналов ($P_{FDR} < 0,05$) (Рисунок 48).

Продукты общих для нейронов брата и сестры ДЭГ локализованы в синапсах, различных участках нейрона и цитоплазматической мембраны, клеточных контактах, вакуолях, перинуклеарном пространстве, аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, входят в состав внеклеточного матрикса и цитоскелета клетки ($P_{FDR} < 0,05$). Сравнение списков ДЭГ показало, что большая часть общих генов в нейронах брата и сестры снижала свою экспрессию (Рисунок 49). Продукты данных генов участвуют в процессах деполяризации мембраны, организации синапсов и синаптической передаче сигнала,



Рисунок 48 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих ДЭГ в нейронах с микроделецией 3p26.3, полученных из ИПСК, полученных из ИПСК пробанда и его сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации

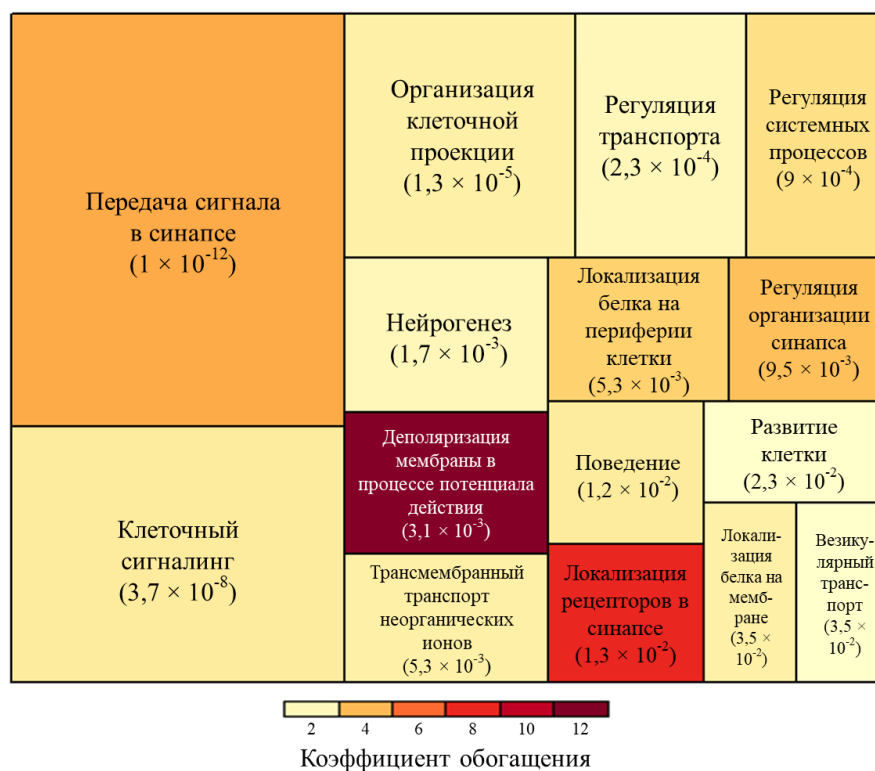


Рисунок 49 – Древоидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих гипоэкспрессирующихся ДЭГ в нейронах с микроделецией 3p26.3, полученных из ИПСК, полученных из ИПСК пробанда и его сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации

локализации белка на периферии клеток, регуляции системных процессов, поведении, ионном и везикулярном транспорте, развитии клеток и нейрогенезе. Таким образом, несмотря на преобладание гиперэкспрессирующихся генов среди общего числа ДЭГ в нейронах сестры с микроделецией 3p26.3, также выявлены гены со сниженной экспрессией, продукты которых участвуют в синаптической передаче сигнала и нейрогенезе (аналогично гипоекспрессирующимся генам в нейронах, дифференцированных из ИПСК брата с аналогичной хромосомной мутацией).

Среди уникальных ДЭГ брата также преобладали гены со сниженной относительно нормы экспрессией (375 ДЭГ, 82 % от числа уникальных ДЭГ). Анализ обогащения не показал статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов и молекулярных функций. Большая часть уникальных ДЭГ, выявленных в нейронах, дифференцированных из ИПСК сестры с микроделецией 3p26.3, повышала свою экспрессию (1560 ДЭГ, 62 %). Продукты уникальных ДЭГ участвуют в морфогенезе закладки эндокарда, дифференцировке мезенхимальных клеток, фазовом переходе клеточного цикла и метаболизме ДНК ($P_{FDR} < 0,05$). Данные белки входят в состав ретромерного комплекса, хромосом, ядрышек, внеклеточного матрикса и цитоскелета клетки, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, цитоплазматической мембраны и мембраны органелл ($P_{FDR} < 0,05$) и участвуют в процессах связывания в адениловым нуклеотидов и молекул лекарственных средств.

3.4.5 Анализ экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6* с помощью ОТ-ПЦР

Валидация результатов микрочипового анализа заключалась в подтверждении изменения экспрессии 6 генов: *CNTN6*, *CBLN2*, *OXR1*, *PEG3*, *CHL1* и *NOTCH1*. В качестве эндогенного контроля был выбран ген рецептора трансферрина (*TFRC*, OMIM 190010). Величины относительного изменения экспрессии, полученные при применении $\Delta\Delta C_t$ метода, представлены в таблице 15.

По данным микрочипового анализа, не было детектировано статистически значимых изменений экспрессии гена *CNTN6*, однако он также был выбран для проведения ОТ-ПЦР. Экспрессия *CNTN6* была снижена во всех анализируемых образцах РНК, полученных из нейронов с различным генотипом (Рисунок 50 А). Наиболее сильное снижение экспрессии показано для клеток пациентки с микроделецией гена *CNTN6*. Для пациента с микродупликацией 3p26.3 было показано незначительное снижение экспрессии *CNTN6*, в то

Таблица 15 – Валидация результатов экспрессионного анализа на микрочипах с помощью ПЦР с обратной транскрипцией

№	Ген	Делеция <i>CNTN6</i> (брат)		Делеция <i>CNTN6</i> (сестра)		Нокаут <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i> (сын)		Дупликация <i>CNTN6</i> (отец)	
		Чипы, log2FC	ОТ-ПЦР, log2FC	Чипы, log2FC	ОТ-ПЦР, log2FC	Чипы, log2FC	ОТ-ПЦР, log2FC	Чипы, log2FC	ОТ-ПЦР, log2FC	Чипы, log2FC	ОТ-ПЦР, log2FC
1	<i>CNTN6</i>	0	-1,86	0	-4,94	0	-1,76	0	-0,17	0	-2,24
2	<i>CBLN2</i>	-3,45	-4,60	-3,30	-8,17	-2,63	-3,72	-3,69	-6,18	-3,30	-9,14
3	<i>PEG3</i>	-3,70	-8,71	-4,01	-15,32	-4,65	-11,31	-4,33	-10,48	-4,01	-13,95
4	<i>OXR1</i>	1,36	0,66	2,81	-1,07	0,00	-0,26	-1,93	-3,49	2,81	-1,22
5	<i>NOTCH1</i>	1,55	3,29	3,37	3,36	–	NA	–	NA	–	NA
6	<i>CHL1</i>	–	NA	–	NA	–	NA	-2,87	-4,91	-2,65	-11,14

Примечание: «–» - изменения экспрессии гена по результатам микрочипового анализа не выявлено; «NA» - образцы не были проанализированы

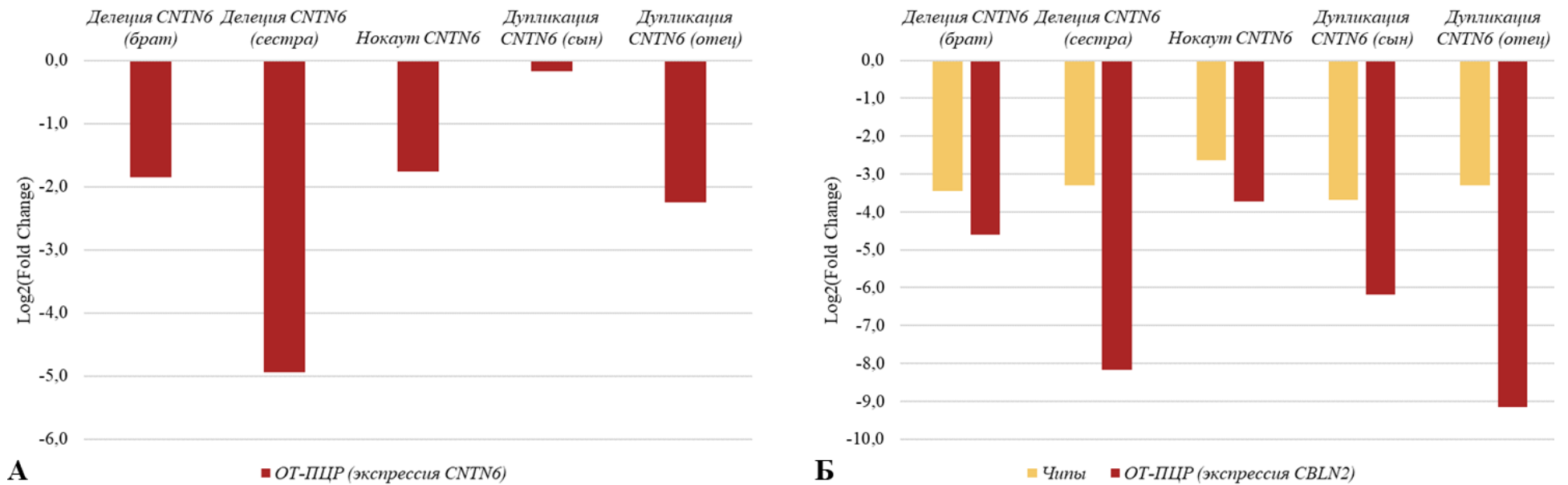


Рисунок 50. Гистограммы, отражающие изменение экспрессии генов *CNTN6* (А) и *CBLN2* (Б) в нейронах с различным числом копий гена *CNTN6* в сравнении с уровнем экспрессии в контрольных образцах

время как экспрессия данного гена в клетках бессимптомного носителя аналогичной перестройки оказалась снижена в 4 раза в сравнении с уровнем экспрессии в нейронах, дифференцированных из ИПСК индивидов без хромосомной мутации.

Для всех анализируемых образцов при проведении транскриптомного анализа на микрочипах было показано снижение экспрессии гена *CBLN2*. По данным литературы, церебеллин-2 (*CBLN2*, OMIM 600433) вовлечен в процессы сборки и поддержания структуры синапса, а также спонтанной синаптической передачи. Данные молекулы экспрессируются преимущественно в головном мозге. Церебеллины одновременно связываются с пресинаптическими нейрексинами и постсинаптическими молекулами глутаматдегидрогеназы 1 и 2, образуя трансинаптические комплексы адгезии. Церебеллины, нейрексыны и глутаматдегидрогеназы могут быть вовлечены в патогенез таких состояний, как синдром Туретта, СДВГ и ОКР, что может быть связано с дисфункцией серотонинергической передачи сигналов при данных нервно-психических расстройствах [Seigneur et al., 2021]. Результаты ОТ-ПЦР также указывают на снижение экспрессии данного гена во всех анализируемых образцах (Таблица 15, Рисунок 50 Б).

Наиболее значительные изменения экспрессии во всех исследуемых образцах (микроделеция, микродупликация, нокаут гена *CNTN6*) были показаны для импринтированного гена *PEG3* (OMIM 601483), экспрессирующегося с отцовского гомолога хромосомы 19 в стволовых / прогениторных клетках головного мозга и эндокринных тканях. Наиболее активно данный ген экспрессируется в период эмбрионального развития. *PEG3* кодирует онкосупрессорный белок, участвующий в процессах пролиферации и р53-опосредованном апоптозе. Эксперименты на модельных животных, несущих точковую мутацию в отцовском аллеле гена *PEG3*, указывают на ключевую роль продукта данного гена в определении полового диморфизма в метаболизме и поведении: мыши с мутациями демонстрировали зависящий от пола глобальный сдвиг метаболизма в сторону ускоренного ожирения, диабетоподобной резистентности к инсулину и жировой дистрофии печени, а также снижение социального доминирования и конкурентоспособности, сопровождающееся изменениями в вазопрессинергической архитектуре головного мозга [Tanaka et al., 2022]. В настоящий момент не выявлено ассоциаций мутаций, затрагивающий ген *PEG3*, или изменения его экспрессии с нарушением нервно-психического развития у человека. Как и в случае микрочипового анализа, результаты ОТ-ПЦР указывают на значительное снижение экспрессии данного гена (превышение порога флуоресценции происходило на последних циклах ПЦР, что может быть объяснено крайне низкой экспрессией данного гена в анализируемых клетках) (Рисунок 51 А).

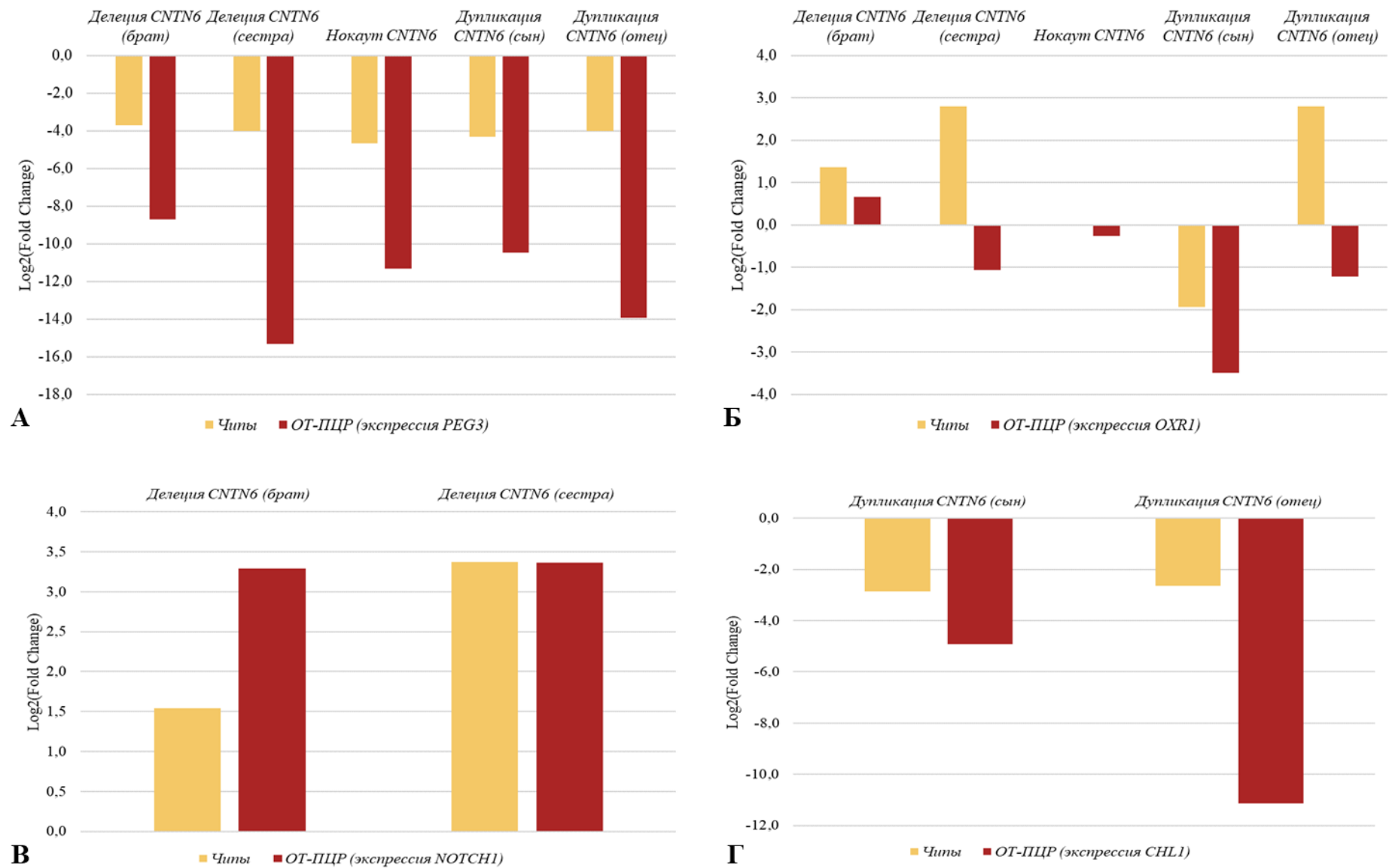


Рисунок 51. Гистограммы, отражающие изменение экспрессии генов *PEG3* (А), *OXR1* (Б), *NOTCH1* (В) и *CHL1* (Г) в нейронах с различным числом копий гена *CNTN6* в сравнении с уровнем экспрессии в контрольных образцах

Ген *OXR1* (OMIM 605609) кодирует участвующий в процессах окислительного стресса белок и экспрессируется во многих тканях, в том числе и головном мозге. По данным литературы, гомозиготные и компаундные гетерозиготные точковые мутации в гене *OXR1* ассоциированы с гипоплазией или атрофией мозжечка, эпилепсией и общей задержкой развития (OMIM 213000). Согласно данным транскриптомного анализа на микрочипах, экспрессия гена *OXR1* была повышена в нейронах, полученных из ИПСК сиблингов с микроделецией 3p26.3 и здорового носителя микродупликации 3p26.3, и снижена в клетках пробанда с микродупликацией *CNTN6* (Таблица 15).

Экспрессия *OXR1* в нейронах с нокаутом гена *CNTN6* статистически значимо не изменялась. При проведении ОТ-ПЦР экспрессия *OXR1* оказалась повышенной в клетках, полученных от пациентов-мальчиков с микроделецией и микродупликацией 3p26.3, однако для девочки с микроделецией и здорового носителя микродупликации 3p26 было показано снижение экспрессии *OXR1*. Незначительное снижение экспрессии данного гена было также детектировано в нейронах с нокаутом гена *CNTN6* (Рисунок 51 Б).

Транскриптомный анализ позволил нам выявить гены (*NOTCH1*, *CHL1*), изменившие свою экспрессию в сравнении с контролем только в линиях с определенным кариотипом. Повышение экспрессии *NOTCH1* (OMIM 190198), кодирующего NOTCH1 рецептор, было подтверждено для нейронов, дифференцированных из ИПСК сиблингов с микроделецией *CNTN6* (Рисунок 51 В). Для нейронов, дифференцированных из ИПСК носителей микродупликации 3p26.3 (отец и сын), было подтверждено снижение экспрессии гена *CHL1*, кодирующего L1-подобную молекулу межклеточной адгезии (OMIM 607416). ОТ-ПЦР не была проведена для образцов, не продемонстрировавших статистически значимых изменений уровня экспрессии по результатам микрочипового анализа (Таблица 15).

Таким образом, с помощью ОТ-ПЦР были валидированы результаты проведенного нами транскриптомного анализа на микрочипах. Для большинства генов удалось подтвердить направление изменения экспрессии (снижение или повышение по сравнению с клетками без хромосомной патологии). Изменение экспрессии было показано для ряда генов, связанных с развитием структур ЦНС и генов, мутации в которых могут быть ассоциированы с нарушением нервно-психического развития. Наличие генов, снижающих свою экспрессию как в клетках с микроделецией, так и клетках с микродупликацией 3p26.3 (*CNTN6*, *PEG3*, *CBLN2*), а также генов, изменяющих экспрессию только в нейронах с определенным числом копий гена *CNTN6* (*NOTCH1*, *CHL1*), говорит в пользу U-образной и доминантной моделей фенотипических проявлений моногенных реципрокных CNV, соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вариации числа копий участков ДНК (CNV) относятся к структурным вариациям генома. Протяженность CNV, распространенность варианта в популяции, пенетрантность и экспрессивность могут варьировать в широких пределах [Oliva-Teles et al., 2020]. Этот тип структурной изменчивости генома играет важную роль в эволюции и способствует разнообразию популяций [Pös et al., 2021]. Некоторые CNV могут являться как доброкачественными (полиморфные варианты), так и патогенными и потенциально патогенными. Показано, что CNV могут лежать в основе патогенеза различных состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития: РАС [Vicari et al., 2019], СДВГ [Harich et al., 2020], шизофрении [Reddaway et al., 2018], БАР [Werling, 2019], судорог [Corròla et al., 2019] и ряда других. В большинстве случаев данные заболевания не рассматриваются в качестве независимых нозологий: дисфункция в одной области развития (познание, общение, двигательные навыки и / или поведение) часто сопровождается изменениями в других. Эти данные говорят в пользу пересечения затронутых CNV молекулярных путей и общности патогенеза состояний, характеризующихся нарушением нервно-психического развития.

Полученные в диссертационном исследовании данные основаны на результатах транскриптомного анализа, проведенного на материале нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с задержкой интеллектуального развития и реципрокными хромосомными мутациями в регионе 3p26.3. В данном исследовании впервые с помощью технологий репрограммирования были получены нейроны, несущие реципрокные моногенные CNV, затрагивающие единственный ген *CNTN6*, мутации в котором имеют непосредственное влияние на процессы развития и функционирования ЦНС. Для изучения молекулярных эффектов хромосомных aberrаций в регионе 3p26.3 были получены линии ИПСК с варьирующим числом копий гена *CNTN6* и соответствующего хромосомного региона в ряду от нуллисомии (нокаута гена) к моносомии, дисомии (норма) и трисомии.

Результаты исследования свидетельствуют о глобальном характере нарушений транскрипционных процессов в клетках с хромосомной мутацией. Для значительного числа генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с дупликацией *CNTN6* (3522 ДЭГ) и гетерозиготной делецией (1141 ДЭГ), а также клеток с генотипом *CNTN6*^{del/mut} (217 ДЭГ), было показано изменение уровня их экспрессии относительно клеток без хромосомного дисбаланса. Стоит отметить, что нарушение экспрессии было продемонстрировано в ряде работ по изучению патогенеза хромосомных болезней – изменения в экспрессионных профилях ИПСК и нейронов касались не только генов из

области перестройки, но также и генов, локализованных в других областях генома [Kaur et al., 2014; Khattak et al., 2015].

В настоящем исследовании были продемонстрированы изменения экспрессии генов, не принимающих непосредственного участия в функционировании ЦНС. Продукты данных генов вовлечены в такие биологические процессы, как формирование и развитие компонентов пищеварительной, сердечно-сосудистой, костно-мышечной, мочевыделительной систем и др. Примечательно, что у носителей хромосомных мутаций, затрагивающих ген *CNTN6*, помимо интеллектуальных нарушений и неврологической симптоматики, нередко отмечают задержку физического развития, аномалии формы черепа, лицевые дисморфизмы, пороки развития конечностей и аномалии внутренних органов, что тяжело поддается объяснению нарушением дозы единственного гена, экспрессирующегося в нервной системе [Kashevarova et al., 2014, Hu et al., 2015]. Вместе с тем, в 2016 году в литературе стали появляться сообщения о новых и неожиданных функциях и ассоциациях гена *CNTN6* с различными заболеваниями и признаками у человека, например, с метаболизмом липидов низкой плотности [Turpin et al., 2016], носительством определенной микрофлоры в кишечнике [Wakil et al., 2016], брахицефалической формой черепа у кошек персидской породы [Bertolini et al., 2016]. Выявление изменений экспрессии генов, не связанной с работой компонентов ЦНС, может послужить подтверждением плеiotропного эффекта микроделеций и микродупликаций гена *CNTN6* и объяснить наличие у пациентов аномалий в других органах и системах. Существует вероятность влияния микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3 на запуск всей программы онтогенеза на ранних стадиях эмбрионального развития, что, в конечном итоге, приводит к формированию комплексных сложных фенотипов, характерных для многих хромосомных болезней.

Результаты проведенного нами исследования указывают на глобальную дисрегуляцию экспрессии генов в нейронах с гетерозиготной микроделецией, микродупликацией, а также нокаутом гена *CNTN6*. С одной стороны, это может являться результатом влияния реципрокных хромосомных мутаций на транскриптом клетки через ряд известных (*CHL1* [Ye et al., 2007], *NOTCH1* [Cui et al., 2004], *PTPRG*, *PTPRZ* [Bouyain, Watkins, 2010], *PTPRA* [Ye et al., 2011], *LPHN1* [Zuko et al., 2016]) или еще неизвестных молекулярных партнеров *CNTN6*. С другой стороны, изменения транскриптома могут быть следствием возможного нарушения клеточных контактов между нейронами, что, в свою очередь, может приводить к нарушению протекающих в них в норме молекулярных процессов, что будет выражаться в изменении экспрессии генов на уровне целого нейрона. Стоит отметить, что оба варианта (снижение экспрессии *CNTN6* → глобальная дисрегуляция экспрессии; нарушение клеточных контактов → глобальная дисрегуляция экспрессии) не

противоречат друг другу и могут вносить свой вклад в изменения транскриптома клетки с реципрокными моногенными CNV. Транскриптомный анализ показал изменение экспрессии ряда генов, кодирующих молекулярных партнеров *CNTN6*. Так, экспрессия гена *CNHL1* была снижена в 7,3 раза в нейронах пробанда с микродупликацией *CNTN6*, а экспрессия *NOTCH1* была повышена в 2,9 раза в нейронах с микроделецией *CNTN6*. Микрочиповый анализ не выявил статистически значимых изменений уровней экспрессии генов *PTPRG*, *PTPRZ*, *PTPRA*, *LPHN1* или *CNTN6* относительно нейронов без хромосомных мутаций. Однако результаты проведенной ОТ-ПЦР показали снижение экспрессии *CNTN6* во всех анализируемых линиях в сравнении с уровнем экспрессии в контроле. Проведенные нами ранее исследования, направленные на оценку экспрессии гена *CNTN6* в ИПСК и нейронах, полученных от носителей микродупликации 3p26.3 (больной мальчик и его условно здоровый родитель), показали интересные результаты. Несмотря на тот факт, что микродупликация 3p26.3 не нарушает последовательности гена (он полностью дублирован), в клетках обнаружено значительное снижение экспрессии *CNTN6* по сравнению с клетками дикого типа [Gridina et al., 2018; Gridina et al., 2019]. Таким образом, мы предполагаем, что глобальные изменения экспрессии генов на уровне целой клетки и, как следствие, фенотипические проявления CNV (в частности, интеллектуальные и психические расстройства) могут быть следствием первоначального снижения экспрессии гена *CNTN6* как в нейронах с микроделецией, так и в нейронах с микродупликацией 3p26.3.

Также можно предположить, что столь широкие проявления дисрегуляции экспрессии могут являться результатом нарушения топографии хромосомных территорий в пространстве клеточного ядра, внутри- и межхромосомных взаимодействий, вызванных избытком или недостатком генетического материала. Изменения пространственной организации хроматина могут стать причиной нарушения разнообразных клеточных процессов: пролиферации, миграции, специфической рецепции и синтеза компонентов межклеточного матрикса, что, в конечном итоге, может привести к замедлению созревания клеточных и тканевых структур, сходно проявляющемуся у носителей разного типа перестроек недоразвитием, или «запаздыванием формообразования» органа. Выявленный в данном исследовании факт транскрипционных нарушений в разных областях генома свидетельствует в пользу гипотезы от общности патогенеза хромосомных болезней и их фенотипических проявлений, обусловленных как числовыми, так и микроструктурными аномалиями хромосом [Гринберг, Кухаренко, 2013].

Наличие общих клинических признаков у пациентов с микроделецией и микродупликацией, затрагивающих ген *CNTN6* (нарушение нервно-психического развития, РАС, эпилепсия, аномалии формы головы, лицевые дисморфизмы, аномалии зубов и десен,

кардиологические нарушения, аномалии костно-мышечной системы и др.) может говорить в пользу обозначенной Deshpande и Weiss U-образной модели фенотипических проявлений реципрокных CNV. Так, в случае данной теоретической модели, возможно выявление группы общих генов, одинаково изменяющих свою экспрессию вне зависимости от типа хромосомной мутации. Основываясь на ранее полученных результатах, подтверждающих снижение экспрессии *CNTN6* как в нейронах с микроделецией, так и микродупликацией региона 3p26.3, в начале нашего исследования мы ожидали, что основным типом детектированных нами транскрипционных изменений в клетках будет однонаправленное снижение / повышение экспрессии одних и тех же генов вне зависимости от типа хромосомной мутации.

В процессе проведения исследования нам удалось получить подтверждение выдвинутой гипотезы. Так, при сравнении дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с реципрокными микроделециями и микродупликациями *CNTN6*, нами были выделены выделить 8 категорий транскриптомных эффектов хромосомных перестроек, соответствующих U-образной, аддитивной и доминантным моделям фенотипических проявлений реципрокных CNV, из которых одной из наиболее представленных оказалась группа, включающая 402 ДЭГ (83 % от числа общих ДЭГ), характеризующихся снижением экспрессии как в клетках с микроделецией, так и микродупликацией *CNTN6*. Стоит отметить, что в данную группу генов со сниженной относительно нормы экспрессией вошли гены, продукты которых принимают участие в процессах, связанных с развитием ЦНС, в частности, росте и развитии нейронов, нейрогенезе, клеточном сигналинге и регуляции синаптической передачи. Продукты данных ДЭГ относятся к таким клеточным компонентам, как цитоплазматические везикулы, синапсы, сома, аксоны и дендриты, пре- и постсинаптические мембраны. Таким образом, наличие 402 ДЭГ со сниженной относительно нормы экспрессией при делеции и при дупликации 3p26.3 можно рассматривать как следствие одинакового характера изменения экспрессии гена *CNTN6* в нейронах с полярными изменениями его копийности. Факт снижения экспрессии гена *CNTN6* вне зависимости от типа хромосомной перестройки, и выявление группы генов, одинаково изменяющих свою экспрессию в нейронах с делецией и дупликацией *CNTN6*, могут объяснить наличие общих клинических черт у пациентов с реципрокными перестройками в регионе 3p26.3, в частности, интеллектуальных нарушений и неврологической симптоматики.

Согласно полученным результатам, три гена со сниженной экспрессией – *NLGN3*, *PRKCZ* и *CHRNA7* – относились к нескольким статистически значимо обогащенным категориям биологических процессов, выявленных для 402 общих ДЭГ в нейронах с

микроделецией и микродупликацией *CNTN6*. Ген *NLGN3* (нейролигин 3; OMIM 300336), кодирующий молекулу постсинаптической клеточной адгезии, участвует в формировании и ремоделировании синапсов ЦНС и опосредует межклеточные взаимодействия между нейронами. *NLGN3* рассматривается в качестве кандидатного гена развития нарушений нервно-психического развития (РАС, когнитивные нарушения и шизофрения) [Chen et al., 2021; Lai et al., 2021]. *PRKCZ* (протеинкиназа С дзета; OMIM 176982) является атипичным членом семейства серин-треониновых протеинкиназ, участвующих в пролиферации, дифференцировке, миграции, установлении полярности и захвате глюкозы клеткой. В ЦНС *PRKCZ* может участвовать в синаптической и перекрестной маркировке, дифференцировке аксонов и дендритов, миграции и созревании предшественников нейронов, регенерации, процессах поддержания нейропатической боли и долговременной памяти [Sajikumar et al., 2005; Shema et al., 2011; Zhang et al., 2007]. По данным литературы, *PRKCZ* может быть вовлечен в патогенез БАП [Kandaswamy et al., 2012]. Ген *CHRNA7* (OMIM 118511) кодирует $\alpha 7$ -субъединицу никотинового ацетилхолинового рецептора, на высоком уровне экспрессирующегося в ЦНС и опосредующего быструю передачу сигнала в синапсах. *CHRNA7* рассматривается в качестве кандидатного гена развития эпилепсии, шизофрении, большого депрессивного расстройства, тревожного расстройства и БАП [Gillentine et al., 2017; Rees et al., 2020]. *CHRNA7*, наряду с *OTUD7A* (OMIM 612024), локализован в критической области синдрома микроделеции 15q13.3 (OMIM 612001), пациенты с которым характеризуются легкой и умеренной степенью УО, трудностями в обучении, эпилепсией и различными дисморфичными чертами.

Согласно информации, представленной в базе данных STRING [<https://string-db.org/>], прямые белок-белковые взаимодействия между молекулами *CNTN6*, *NLGN3*, *PRKCZ* и *CHRNA7* отсутствуют (Рисунок 52). Тем не менее, для ряда молекул (*NRXN1*, *NOTCH1*, *CDC42*, *SQSTM1*, *PARD6A*, *PARD6B*, *PARD6G*) показана связь с интересующими нас генами. Ген *NRXN1*, кодирующий молекулу нейрексина 1, локализованного на пресинаптической мембране и являющегося лигандом *NLGN3*, часто упоминается вместе с *CNTN6* в контексте синаптических молекул межклеточной адгезии и кандидатных генов нарушений нервно-психического развития [Huang et al., 2017]. *NOTCH1* является одним из известных молекулярных партнеров *CNTN6*. Notch1 – важный рецептор сигнальной трансдукции, регулирующий выбор путей дифференцировки различных клеток в развитии многоклеточных организмов. Показано, что активация Notch-сигнального пути молекулами NB-3 (*CNTN6*) приводит к освобождению внутриклеточного домена (NICD) с помощью регулируемого внутримембранного протеолиза γ -секретазным комплексом и запускает

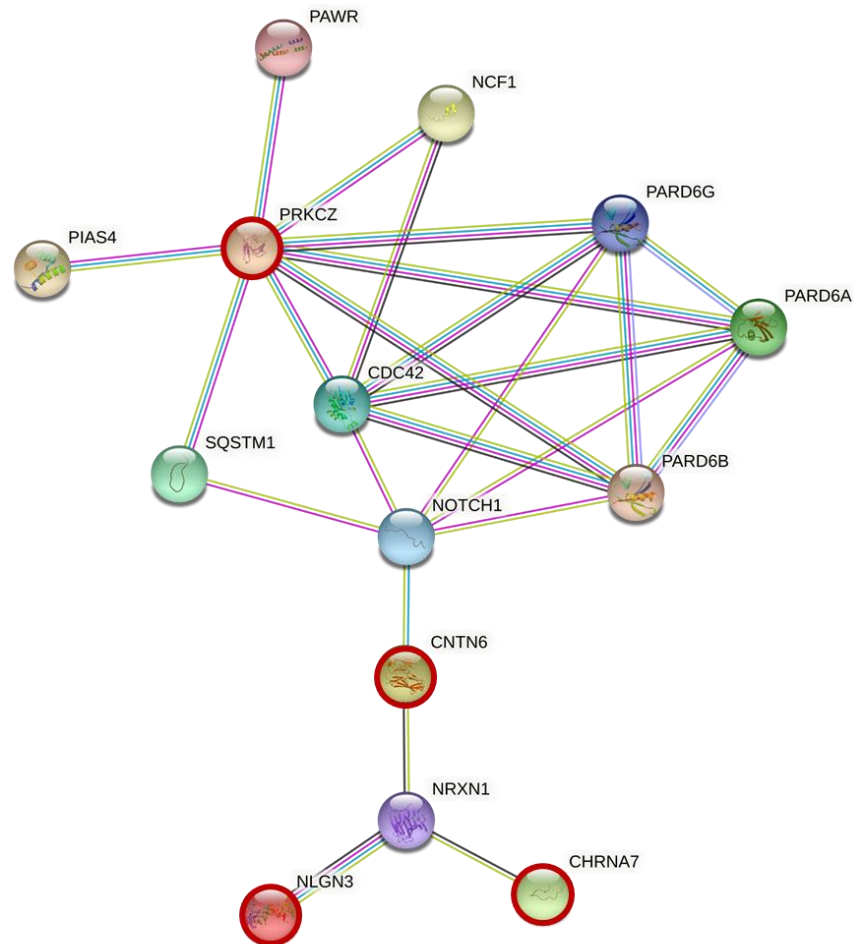


Рисунок 52 – Схема белок-белковых взаимодействий, построенная на основании базы данных STRING

Notch/DLX1 сигнальный путь, способствуя олигодендроглиогенезу нейрональных клеток-предшественниц и созреванию олигодендроцитов [Cui et al., 2004]. *SQSTM1* кодирует многофункциональный белок, связывающий убиквитин и регулирующий активацию сигнального пути NF-κB. *SQSTM1* рассматривается в качестве кандидата гена развития нейродегенеративных нарушений [Ma et al., 2019]. По данным литературы, показана связь между аутофагией (*SQSTM1* – один из хорошо известных субстратов при аутофагии), индуцированной окислительным стрессом, и нарушением синаптической функции в клеточной модели нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с синдромом Кулена-де Ври [Linda et al., 2021]. Ген *CDC42* кодирует молекулу ГТФ-азы, участвующей в регуляции сигнальных путей, вовлеченных в процессы морфологии клеток, миграции, эндоцитоза и клеточного цикла. *Cdc42* является важным регулятором морфологии нейронов [Chen et al., 2012]. Стоит отметить, что по результатам транскриптомного анализа вышеперечисленные гены, за исключением *NRXN1* в клетках с микродупликацией, не изменили свою экспрессию в сравнении с контрольной группой нейронов.

Гены, продукты которых необходимы для развития и функционирования ЦНС (*PEG3*, *CBLN2*, *CHCHD2*, *KCNT1*, *SEMA5A*, *FGF7*, *LGI1*, *SYN3*, *LOC100506472*, *ABCC8* и др.), не были представлены во многих статистически значимо обогащенных биологических путях, однако продемонстрировали наиболее значительное изменение экспрессии в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделецией и микродупликацией 3p26.3, в сравнении с клетками без хромосомных aberrаций. Список генов, характер изменения экспрессии в нейронах с хромосомной мутацией и краткое описание гено-фенотипических корреляций представлены в Приложении Г (Таблица Г.9).

Мутации в генах, кодирующих синаптические белки (например, кадгерины, IgCAMs, NRXNs, NLGNs и SynCAMs), могут приводить к синаптопатиям, нередко проявляющимся нарушениями нервно-психического развития и нейродегенеративными расстройствами (болезнь Альцгеймера и Паркинсона) [Lepeta et al., 2016; Sala, Verpelli, 2016]. Изменения протеома синапсов могут приводить к нарушению синаптической функции и изменению архитектуры синапсов (разнообразия и локализации синапсов в ЦНС), проявляясь поведенческими фенотипами (характерными особенностями поведения, личности, когнитивного и коммуникативного развития, которые ассоциированы со специфическим биологическим нарушением) [Grant, 2019]. Синаптическая дисфункция, проявляющаяся нарушением синаптогенеза, синаптической передачи и пластичности, а также баланса между процессами возбуждения и торможения, зачастую наблюдаются у пациентов с РАС [Guang et al., 2018], шизофренией [Nagahama et al., 2020], УО и судорогами [Shimell et al., 2019]. Результаты анализа обогащения категорий генных онтологий для клеточных компартментов, проведенного для общих ДЭГ в нейронах с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*, показали, что одной из наиболее статистически значимо обогащенных оказалась категория «синапс» (коэффициент обогащения составлял 3,8; подавляющее большинство генов данной категории характеризовались сниженной относительно нормы экспрессией). Стоит отметить, что продукты ДЭГ с наиболее значительными изменениями экспрессии (Приложение Г, Таблица Г.9) локализуются на пре- и постсинаптических мембранах и участвуют в синаптогенезе и синаптической передаче сигнала между клетками. Мы предполагаем, что нарушение экспрессии *CNTN6* может влиять на формирование синаптических контактов и приводить к дисфункции синапсов. Этот вариант синаптопатии, в свою очередь, может проявляться нарушением развития нейронов и приводить к развитию интеллектуальных и психических расстройств у пациентов, являющихся носителями как микроделетий, так и микродупликаций гена *CNTN6*.

Неполная пенетрантность хромосомных мутаций усложняет клиническую интерпретацию выявляемых CNV. Феномен «неполной пенетрантности» показан для

большого числа микроструктурных aberrаций и может объяснять передачу хромосомной патологии ребенку от здорового родителя без фенотипических проявлений мутации. Случаи микроструктурных перестроек, затрагивающих ген *CNTN6*, также характеризуются неполной пенетрантностью. Для 100 описанных в литературе случаев микроделаций и микродупликаций гена *CNTN6* данные о наследовании хромосомной перестройки были получены в 46 случаях (25 мутаций материнского, 18 – отцовского происхождения, 1 *de novo* мутация) [Лопаткина и др., 2021]. Для данных пациентов показано, что хромосомные мутации в регионе 3p26.3 могли быть унаследованы как от условно здоровых родственников, так и от родителей с различными нервно-психическими нарушениями (биполярным расстройством, синдромом дефицита внимания и гиперактивности, расстройством аутистического спектра, трудностями в обучении, депрессивным расстройством, врожденным нарушением слуха, дислексией, судорогами). В 12 случаях в семьях с известным семейным анамнезом отмечено наследование хромосомной мутации от условно здоровых родителей и ее фенотипическое проявление у детей [Kashevarova et al., 2014; Mercati et al., 2017; Hu et al., 2015; Repnikova et al., 2019]. Примечательно, что у четырех пациентов семейный анамнез по линии бессимптомного носителя перестройки был отягощен случаями нервно-психических нарушений. Мы можем предположить, что данные патологические состояния являются следствием унаследованной микроструктурной перестройки у родственников пробанда по материнской или по отцовской линии (в подавляющем большинстве случаев молекулярно-цитогенетическое обследование родственников не проводилось) [Mercati et al., 2017; Repnikova et al., 2019].

Анализ данных литературы показал, что хромосомные мутации, затрагивающие ген *CNTN6*, также встречаются у здоровых людей. Было установлено, что в группе здоровых индивидов в сравнении с группой пациентов с нарушением нервно-психического развития наблюдается статистически значимое преобладание микродупликаций гена *CNTN6* [Лопаткина и др., 2021]. Следовательно, отсутствие фенотипических проявлений перестройки у индивида более вероятно в случае наличия у него микродупликации *CNTN6*. Открытым в данном анализе остался вопрос о возможном влиянии родительского происхождения мутации на фенотип пробандов (наличие нервно-психических заболеваний или их отсутствие), вследствие отсутствия данных о происхождении *de novo* или наследовании aberrаций у большинства здоровых индивидов. Мы считаем, что применение клеточных технологий для изучения конкретных семейных случаев микроструктурных aberrаций, затрагивающих ген *CNTN6*, может быть полезно для получения новой информации о возможном влиянии родительского происхождения на клиническое проявление хромосомной мутации в том случае, когда статистическая обработка данных

невозможна вследствие недостаточных объемов выборок и отсутствия информации о семейном анамнезе.

Чтобы сравнить особенности экспрессии генов в клетках бессимптомных и пораженных носителей хромосомных мутаций, мы использовали нейроны, полученные из ИПСК пробанда с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя, которые оба являются носителями CNV в регионе 3p26.3, затрагивающей ген *CNTN6*. Транскриптомный анализ позволил идентифицировать как общие, так и уникальные для нейронов отца и сына ДЭГ и определить характер изменения экспрессии общих ДЭГ. Примечательно, что общее число ДЭГ в клетках отца и сына было примерно одинаковым (3228 против 3522). Однако большая часть ДЭГ в нейронах сына демонстрировала тенденцию к снижению экспрессии (гипоэкспрессирующиеся гены составляли 89 % от общего числа ДЭГ), в то время как процентное соотношение генов с повышенной и сниженной экспрессией в нейронах отца составило 57 % и 43 %, соответственно. Среди общих ДЭГ для нейронов, полученных из ИПСК пробанда и его условно здорового отца, 96 % и 4 % генов в нейронах пробанда снижали и повышали свою экспрессию относительно нормы; в нейронах отца – 54 % и 46 % генов. Соотношение гипо-и гиперэкспрессирующихся уникальных ДЭГ в нейронах пробанда составило 84 % и 16 % от общего числа уникальных ДЭГ; в нейронах отца – 34 % и 66 %, соответственно.

Среди выявленных 8 категорий транскриптомных эффектов микродупликации, затрагивающей ген *CNTN6* была выявлена группа общих ДЭГ (784 гена, 53 % от числа общих дифференциально экспрессирующихся генов), снижающих свою экспрессию как в клетках, полученных из ИПСК отца, так и ИПСК сына (U-образная модель фенотипических проявлений CNV). Продукты данных ДЭГ вовлечены в везикулярный транспорт в синапсе, формирование микротрубочек, клеточный сигналинг, развитие и функционирование нервных клеток, в частности, процесс синаптической передачи, нейрогенез, транспорт ионов, сборку органелл, положительную регуляцию организации клеточных компонентов и транспорта в клетке. Примечательно, что группа гипоэкспрессирующихся генов в нейронах, полученных из ИПСК условно здорового отца пробанда, была значимо обогащена генами, ассоциированными с развитием эпилептической энцефалопатии (13 генов) и судорог (81 ген) (PFDR < 0,05). Анализ обогащения генов со сниженной экспрессией в нейронах, полученных из ИПСК сына, показал представленность таких категорий, как «аномалии развития нервной системы» (320 генов), «аномалии размера черепа» (167 генов), «аномалии физиологии мышц» (267 генов), «аномалии морфологии мозга» (265 генов), а также «нарушение движения» (235 генов) (PFDR < 0,05).

Факт наличия в клетках, полученных из ИПСК отца и сына, большого числа общих гипоекспрессирующихся генов, связанных с развитием головного мозга и патологией развития нервной системы, наряду с отсутствием фенотипических проявлений у отца пробанда, создает определенные трудности в интерпретации полученных результатов. Отсутствие клинических признаков у отца-носителя CNV может быть связано как с его возрастом (некоторые фенотипические признаки могут быть детектированы только в детстве) или неполным обследованием условно здорового носителя микродупликации *CNTN6*. Мы предполагаем, что материнское происхождение мутации может также способствовать отсутствию клинических проявлений синдрома микродупликации *CNTN6* у отца. Проведенный анализ родительского происхождения CNV у нашего пациента с микродупликацией гена *CNTN6* показал, что хромосомная aberrация была унаследована от условно здорового отца, который, в свою очередь, унаследовал ее от своей условно здоровой матери, что может указывать на моноаллельный характер экспрессии вероятно импринтированного гена *CNTN6* [Kashevarova et al., 2014]. В наших предыдущих исследованиях был выявлен феномен неравной аллельной экспрессии *CNTN6* в нейронах, дифференцированных из ИПСК индивидов с нормальным числом копий гена *CNTN6* и его дупликацией [Gridina et al., 2018]. Результаты анализа экспрессии *CNTN6* в нейронах, полученных из ИПСК здоровых доноров, указали на преобладание экспрессии материнского аллеля относительно отцовского. В нейронах с микродупликацией *CNTN6* наблюдалась преимущественная экспрессия гена с материнского гомолога – уровень экспрессии дуплицированного аллеля, унаследованного от отца, составил только 5-10 % относительно активности аллеля дикого типа, наследованного от матери [Gridina et al., 2018]. Более того, в клетках, полученных от здорового носителя CNV, уровень экспрессии дуплицированного (материнского) аллеля *CNTN6* был значительно выше, чем интактного отцовского аллеля, а общий уровень экспрессии *CNTN6* был соизмерим со средним уровнем в клетках без хромосомной мутации [Gridina et al., 2019]. Таким образом, даже несмотря на то, что здоровый отец в данном исследовании является носителем аналогичной структурной перестройки, уровень экспрессии *CNTN6* в его клетках сопоставим с уровнем экспрессии в клетках без структурных перестроек. Можно предположить, что нормализация экспрессии *CNTN6* в клетках отца (вследствие материнского наследования дублированного аллеля *CNTN6*) могла стать причиной отсутствия клинических проявлений микродупликации 3p26.3.

Различные транскриптомные эффекты микроделеции 3p26.3 в нейронах, дифференцированных из ИПСК сибсов с интеллектуальными нарушениями также были структурированы в соответствии с обозначенными теоретическими моделями

фенотипических проявлений CNV: среди 8 описанных групп эффектов преобладали гены, снизившие свою экспрессию как в клетках, полученных из ИПСК брата с делецией *CNTN6*, так и его сестры, являющейся носителем аналогичной хромосомной перестройки (404 ДЭГ (59 % от числа общих ДЭГ), U-образная модель). Продукты генов со сниженной экспрессией участвуют в синаптической передаче сигнала и нейрогенезе.

В заключение необходимо отметить, что использованный в настоящем исследовании подход, основанный на получении персонифицированных ИПСК, направленной дифференцировке в нейроны и проведении анализа генной экспрессии, зарекомендовал себя в качестве полезного инструмента изучения молекулярных основ патогенеза хромосомных болезней. Оценка особенностей экспрессионных профилей нейронов, полученных из ИПСК пациентов с реципрокными микроделециями и микродупликациями гена *CNTN6*, позволила получить новые уникальные данные о молекулярных механизмах реализации патологического эффекта реципрокных хромосомных aberrаций.

ВЫВОДЫ

1. В группе пациентов с нарушением нервно-психического развития частота хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, составляет 1 : 711.
2. Среди клинически здоровых носителей вариаций в числе копий гена *CNTN6*, по сравнению с пациентами с нарушениями нервно-психического развития, отмечается статистически значимое преобладание хромосомных микродупликаций 3p26.3.
3. Созданы клеточные модели заболеваний, сопровождающихся нарушениями нервно-психического развития, на основе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с различным числом копий гена *CNTN6*.
4. В модельной системе нейронов, дифференцированных из ИПСК с различным числом копий *CNTN6*, для клеток с дупликацией показано изменение экспрессии 3522 генов (384 гипер- и 3138 гипоэкспрессирующихся генов), для клеток с делецией –1141 гена (338 гипер- и 803 гипоэкспрессирующихся гена), для клеток с нокаутом гена *CNTN6* – 217 генов (49 гипер- и 168 гипоэкспрессирующихся генов), по сравнению с клетками без хромосомной мутации.
5. В нейронах, дифференцированных из ИПСК, в зависимости от числа копий *CNTN6* выявлено 8 категорий транскриптомных эффектов, соответствующих U-образной, аддитивной и доминантной теоретическим моделям фенотипических проявлений реципрокных моногенных CNV. Показано, что среди общих дифференциально экспрессирующихся генов, выявленных в нейронах с микроделением и микродупликацией *CNTN6*, 83 % генов снижают свою экспрессию.
6. Гены со сниженной относительно нормы экспрессией в нейронах, дифференцированных из ИПСК с микроделением, микродупликацией и нокаутом гена *CNTN6*, кодируют продукты, вовлеченные в нейрогенез и синаптическую передачу ($P_{FDR} < 0,05$).
7. В нейронах, полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями и микродупликацией *CNTN6*, выявлено снижение транскрипции подавляющего числа дифференциально экспрессирующихся генов (89 %), по сравнению с клетками без хромосомной мутации, тогда как в нейронах, полученных из ИПСК его отца – носителя микродупликации без фенотипических проявлений, снижение экспрессии затронуло 43 % генов ($p < 0,001$).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- aCGH – (от англ. Array Comparative Genomic Hybridization) – сравнительная геномная гибридизация на микрочипах
- CAMs – (от англ. Cell Adhesion Molecules) – молекулы клеточной адгезии
- CNV – (от англ. Copy Number Variations) – вариации числа копий участков ДНК
- FDR – (от англ. False Discovery Rate) – вероятность ложноположительного результата
- FoSTeS – (от англ. Fork Stalling and Template Switching) – остановка вилки репликации и переключение матрицы
- GEDDs – (от англ. Gene Expression Dysregulation Domains) – домены дисрегуляции генной экспрессии
- IgSF – (от англ. Immunoglobulin Super Family) – суперсемейство иммуноглобулинов
- LADs – (от англ. Lamina-Associated Domains) – домены, ассоциированные с ядерной мембраной
- MMBIR – (от Microhomology Mediated Break-Induced Replication) – опосредованная микрогомологией и индуцированная разрывами репликация
- MOI – (от англ. Multiplicity Of Infection) – множественность заражения
- NAHR – (от англ. NonAllelic Homologous Recombination) – неаллельная гомологичная рекомбинация
- NHEJ – (от англ. NonHomologous End Joining) – негомологичное соединение концов
- PBS – (от англ. Phosphate-Buffered Saline) – натрий-фосфатный буфер
- PCA – (от англ. Principal Component Analysis) – анализ главных компонент
- qPCR – (от англ. quantitative Polymerase Chain Reaction) – количественная полимеразная цепная реакция
- SDS – (от англ. Sodium Dodecyl Sulfate) – раствор додецилсульфата натрия
- SNP – (от англ. Single Nucleotide Polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм
- SRS – (от англ. Serial Replication Slippage) – проскальзывание вилок репликации
- SSC – (от англ. Saline Sodium Citrate) – раствор цитрата и хлорида натрия
- TAE – (от англ. Tris-Acetate and EDTA) – трис-ацетатный буфер
- WES – (от англ. Whole Exome Sequencing) – полноэкзомное секвенирование
- WGS – (от англ. Whole Genome Sequencing) – полногеномное секвенирование
- БАР – биполярное аффективное расстройство
- ВПР – врожденные пороки развития
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ДЦП – детский церебральный паралич
- ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ДЭПК - диэтилпирокарбонат

е.а. – единица активности

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов

НКП – нейрональные клетки-предшественницы

ОКР – обсессивно-компульсивное расстройство

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РАС – расстройства аутистического спектра

СДВГ – синдром дефицита внимания и гиперактивности

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

УО – умственная отсталость

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ардаширова Н. С., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С. Н. МикроРНК в патогенезе и диагностике болезни Паркинсона // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37. – № 2. – С. 99–105.
2. Баранов В. С., Кузнецова Т. В. Цитогенетика эмбрионального развития человека // Н-Л. – 2006. – 654 с.
3. Бочков Н. П., Пузырев В. П., Смирнихина С. А. Клиническая генетика. Альфа-книга. – 2013. – 592 с.
4. Ворсанова С. Г., Юров И. Ю., Куринная О. С., Воинова В. Ю., Юров Ю. Б. Геномные аномалии у детей с умственной отсталостью и аутизмом: использование технологии сравнительной геномной гибридизации на хромосомах *in situ* (HRCGH) и молекулярного кариотипирования на ДНК-микроматрицах (array CGH) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2013. – Т. 113. – № 8. – С. 46–49.
5. Григорьева Е. В., Валетдинова К. Р., Устьянцева Е. И., Шевченко А. И., Медведев С. П., Мазурок Н. А., Маретина М. А., Куранова М. Л., Киселев А. В., Баранов В. С., Закиян С. М. Дифференцировка в нейральном направлении пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от больных с наследственной формой спинальной мышечной атрофии // Гены клетки. – 2016. – Т. XI. – № 2. – С. 70–79.
6. Гринберг К. Н., Кухаренко В. И. Реализация фенотипического эффекта хромосомных аномалий у человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 1. – С. 32–39.
7. Кашеварова А. А., Лебедев И. Н. Геномная архитектура хромосомных болезней человека // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 5. – С. 511–528.
8. Кашеварова А. А., Лебедев И. Н., Назаренко Л. П. Архитектура генома и хромосомные болезни. Синдромы реципрокных микроделений и микродупликаций: атлас / под ред. В.П. Пузырёва // Томск: «Печатная мануфактура». – 2014. – 56 с.
9. Коваленко В. Р., Хабарова Е. А., Рзаев Д. А., Медведев С. П. Клеточные модели, геномные технологии и клиническая практика: синтез знаний для исследования механизмов, диагностики и терапии болезни Паркинсона // Гены клетки. – 2017. – Т. XII. – № 2. – С. 11–28.
10. Лавров А. В., Банников А. В., Чаушева А. И., Дадали Е. Л. Генетика умственной отсталости // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т. 61. – № 6. – С. 13–20.

11. Лебедев И. Н. Хромосомные болезни / Наследственные болезни. Национальное руководство / под ред. Е.К. Гинтера, В.П. Пузырёва // ГЭОТАР-Медиа. – 2017. – С. 555–609.
12. Лебедин М. Ю., Майорова К. С., Максимов В. В., Богомазова А. Н., Лагарькова М. А., Киселев С. Л. Использование технологий репрограммирования соматических клеток и редактирования генома для создания модельной системы болезни Штаргардта с целью ее изучения и терапии // Гены клетки. – 2017. – Т. XII. – № 2. – С. 62–70.
13. Лопаткина М. Е., Иванова С. А., Лебедев И. Н. Оценка распространенности и родительского происхождения хромосомных микроделеций и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов // Генетика. – 2021. – Т. 57. – № 8. – С. 964–969.
14. Назаренко Л. П., Назаренко М. С., Салюкова О. А., Лебедев И. Н. Генетические аспекты интеллектуальных нарушений // Томск: Литературное бюро. – 2017. – 68 с.
15. Некрасов Е. Д., Лебедева О. С., Честков И. В., Сюсина М. А., Федотова Е. Ю., Лагарькова М. А., Киселев С. Л., Гривенников И. А., Иллариошкин С. Н. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI. – № 4. – С. 82–88.
16. Новосадова Е. В., Арсеньева Е. Л., Антонов С. А., Ванюшина Ю. Н., Малова Т. В., Комиссаров А. А., Иллариошкин С. Н., Хаспекоев Л. Г., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Тарантул В. З., Гривенников И. А. Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека для оценки нейропротекторной активности фармакологических соединений // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 11. – С. 1610–1621.
17. Скрыбин Н. А., Васильев С. А., Толмачева Е. Н., Шорина А. Р., Савченко Р. Р., Кашеварова А. А., Лебедев И. Н. Паттерн метилирования ДНК в участках генома с наследуемыми CNV // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16. – № 12. – С. 27–30.
18. Честков Е. В., Васильева Е. А., Иллариошкин С. Н., Лагарькова М. А., Киселев С. Л. Создание модели бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII. – № 3. – С. 58–59.
19. Честков И. В., Васильева Е. А., Иллариошкин С. Н., Лагарькова М. А., Киселев С. Л. Система для изучения бокового амиотрофического склероза на основе пациент-специфических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток // Acta Naturae. – 2014. – Т. 6. – № 1. – С. 58–65.

20. Шилова Н. В., Миньженкова М. Е. Интерпретация клинически значимых вариаций числа копий ДНК // Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17. – № 10. – С. 15–19.
21. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Куринная О. С., Зеленова М. А., Васин К. С., Юров Ю. Б. Причины и последствия геномной нестабильности при психических и нейродегенеративных заболеваниях // Молекулярная биология. – 2021. – Т. 55. – № 1. – С. 42–53.
22. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Куринная О. С., Сильванович А. П., Юров Ю. Б. Генетические аспекты психологических и поведенческих нарушений у детей с аутистическими расстройствами и трудностями в обучении: диагностика геномных и хромосомных нарушений с использованием ДНК-микрочипов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – С. 383–390.
23. Adamo A., Atashpaz S., Germain P.-L. L., Zanella M., D'Agostino G., Albertin V., Chenoweth J., Micale L., Fusco C., Unger C., Augello B., Palumbo O., Hamilton B., Carella M., Donti E., Pruneri G., Selicorni A., Biamino E., Prontera P., McKay R., Merla G., Testa G. 7q11.23 dosage-dependent dysregulation in human pluripotent stem cells affects transcriptional programs in disease-relevant lineages // Nat. Genet. – 2015. – V. 47. – № 2. – P. 132–141.
24. Adams J. W., Cugola F. R., Muotri A. R. Brain organoids as tools for modeling human neurodevelopmental disorders // Physiology. – 2019. – V. 34. – № 5. – P. 365–375.
25. Adhya D., Swarup V., Nagy R., Dutan L., Shum C., Valencia-Alarcón E. P., Jozwik K. M., Mendez M. A., Horder J., Loth E., Nowosiad P., Lee I., Skuse D., Flinter F. A., Murphy D., McAlonan G., Geschwind D. H., Price J., Carroll J., Srivastava D. P., Baron-Cohen S. Atypical Neurogenesis in Induced Pluripotent Stem Cells from Autistic Individuals // Biol. Psychiatry. – 2021. – V. 89. – № 5. – P. 486–496.
26. de Agustín-Durán D., Mateos-White I., Fabra-Beser J., Gil-Sanz C. Stick around: Cell-Cell Adhesion Molecules during Neocortical Development // Cells. – 2021. – V. 10. – № 118. – P. 1–24.
27. Al-Dewik N., Alsharshani M. New Horizons for Molecular Genetics Diagnostic and Research in Autism Spectrum Disorder // Advances in Neurobiology. Springer. – 2020. – V. 24. – P. 43–81.
28. Almind G. J., Grønskov K., Milea D., Larsen M., Brøndum-Nielsen K., Ek J. Genomic deletions in *OPA1* in Danish patients with autosomal dominant optic atrophy // BMC Med. Genet. – 2011. – V. 12. – P. 1–5.
29. Armstrong D. L., Zidovetzki R., Alarcón-riquelme M. E., Tsao B. P., Criswell L. A., Kimberly R. P., Harley J. B., Sivils K. L., Timothy J. GWAS identifies novel SLE

- susceptibility genes and explains the association of the HLA region // *Genes Immun.* – 2015. – V. 15. – № 6. – P. 347–354.
30. Austin-Tse C. A., Mandelker D. L., Oza A. M., Mason-Suares H., Rehm H. L., Amr S. S. Analysis of intragenic *USH2A* copy number variation unveils broad spectrum of unique and recurrent variants // *Eur. J. Med. Genet.* – 2018. – V. 61. – № 10. – P. 621–626.
 31. Avni E., Ben-Itzhak E., Zachor D. A. The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors // *Front. Psychiatry.* – 2018. – V. 9. – № 717. – P. 1–12.
 32. Ayhan F., Konopka G. Regulatory genes and pathways disrupted in autism spectrum disorders // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2019. – V. 89. – P. 57–64.
 33. Azuma Y., Töpf A., Evangelista T., Lorenzoni P. J., Roos A., Viana P., Inagaki H., Kurahashi H., Lochmüller H. Intragenic *DOK7* deletion detected by whole-genome sequencing in congenital myasthenic syndromes // *Neurol. Genet.* – 2017. – V. 3. – № 3. – P. 1–7.
 34. Baets J., Deconinck T., Smets K., Goossens D., van den Bergh P., Dahan K., Schmedding E., Santens P., Rasic V. M., van Damme P., Robberecht W., de Meirleir L., Michielsens B., Del-Favero J., Jordanova A., de Jonghe P. Mutations in *SACS* cause atypical and late-onset forms of ARSACS // *Neurology.* – 2010. – V. 75. – № 13. – P. 1181–1188.
 35. Bateman M. S., Collinson M. N., Bunyan D. J., Collins A. L., Duncan P., Firth R., Harrison V., Homfray T., Huang S., Kirk B., Lachlan K. L., Maloney V. K., Barber J. C. K. Incomplete penetrance, variable expressivity, or dosage insensitivity in four families with directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2018. – V. 176. – № 2. – P. 319–329.
 36. de Baumont A., Maschietto M., Lima L., Carraro D. M., Olivieri E. H., Fiorini A., Barreta L. A. N., Palha J. A., Belmonte-de-Abreu P., Moreira Filho C. A., Brentani H. Innate immune response is differentially dysregulated between bipolar disease and schizophrenia // *Schizophr. Res.* – 2015. – V. 161. – № 2–3. – P. 215–221.
 37. Baye's A., Grant S. G. N. Synapse Proteomes and Disease: The MASC Paradigm / Neuronal and synaptic dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability // Elsevier. – 2016. – P. 85–99.
 38. Bene J., Hadzsiev K., Komlósi K., Kövesdi E., Mátyás P., Meleg B. *De novo SCN1A* gene deletion in therapy-resistant Dravet syndrome // *Orv. Hetil.* – 2015. – V. 156. – № 49. – P. 2009–2012.
 39. Berberich A. J., Huot C., Cao H., McIntyre A. D., Robinson J. F., Wang J., Hegele R. A. Copy Number Variation in *GCK* in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2019. – V. 104. – № 8. – P. 3428–3436.

40. Berk M., Post R., Ratheesh A., Gliddon E., Singh A., Vieta E., Carvalho A. F., Ashton M. M., Berk L., Cotton S. M., McGorry P. D., Fernandes B. S., Yatham L. N., Dodd S. Staging in bipolar disorder: from theoretical framework to clinical utility // *World Psychiatry*. – 2017. – V. 16. – № 3. – P. 236–244.
41. Bertelsen B., Melchior L., Jensen L. R., Groth C., Glenthøj B., Rizzo R., Debes N. M., Skov L., Brøndum-Nielsen K., Paschou P., Silahatoglu A., Tümer Z. Intragenic deletions affecting two alternative transcripts of the *IMMP2L* gene in patients with Tourette syndrome // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2014. – V. 22. – № 11. – P. 1283–1289.
42. Bertolini F., Gandolfi B., Kim E. S., Haase B., Lyons L. A., Rothschild M. F. Evidence of selection signatures that shape the Persian cat breed // *Mamm. Genome*. – 2016. – V. 27. – № 3–4. – P. 144–155.
43. Beyazyüz M., Küfeciler T., Bulut L., Ünsal C., Albayrak Y., Akyol E. S., Baykal S., Kuloglu M., Hashimoto K. Increased serum levels of apoptosis in deficit syndrome schizophrenia patients: a preliminary study. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* – 2016. – V. 12. – P. 1261–1268.
44. Blackburn A., Almeida M., Dean A., Curran J. E., Johnson M. P., Moses E. K., Abraham L. J., Carless M. A., Dyer T. D., Kumar S., Almasy L., Mahaney M. C., Comuzzie A., Williams-Blangero S., Blangero J., Lehman D. M., Göring H. H. Effects of copy number variable regions on local gene expression in white blood cells of Mexican Americans // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2015. – V. 23. – № 9. – P. 1229–1235.
45. Blomqvist M., Smeland M. F., Lindgren J., Sikora P., Stensland H. M. F. R., Asin-Cayuela J. β -Mannosidosis caused by a novel homozygous intragenic inverted duplication in *MANBA* // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* – 2019. – V. 5. – № 3. – P. 1–13.
46. Bohnen M., Ma L., Zhu N., Qi H., McClenaghan C., Gonzaga-Jauregui C., Dewey F., Overton J., Reid J., Shuldiner A., Baras A., Sampson K., Bleda M., Hadinnapola C., Haimel M., Bogaard H., Church C., Coghlan G., Corris P., Eyries M., Gibbs J. S. R., Girerd B., Houweling A. C., Humbert M., Guignabert C., Kiely D. G., Lawrie A., MacKenzie Ross R. V., Martin J. M., Montani D., Peacock A. J., Pepke-Zaba J., Soubrier F., Suntharalingam J., Toshner M., Treacy C. M., Trembath R. C., Noordegraaf A. V., Wharton J., Wilkins M. R., Wort S. J., Yates K., Gräf S., Morrell N. W., Krishnan U., Rosenzweig E. B., Shen Y., Nichols C. G., Kass R. S., Chung W. K. Loss-of-Function *ABCC8* Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension // *Circ. Genomic Precis. Med.* – 2018. – V. 11. – № 10:e002087. – P. 1–18.
47. van Bokhoven H. Genetic and Epigenetic Networks in Intellectual Disabilities // *Annu. Rev. Genet.* – 2011. – V. 45. – № 1. – P. 81–104.

48. Borlot F., Regan B. M., Bassett A. S., Stavropoulos D. J., Andrade D. M. Prevalence of pathogenic copy number variation in adults with pediatric-onset epilepsy and intellectual disability // *JAMA Neurol.* – 2017. – V. 74. – № 11. – P. 1301–1311.
49. Bosire C., Vidal A., Smith J., Jima D., Huang Z., Skaar D., Valea F., Bentley R., Gradison M., Yarnall K., Ford A., Overcash F., Murphy S., Hoyo C. Association between *PEG3* DNA methylation and high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *Infect. Agent. Cancer.* – 2021. – V. 16. – № 1:42. – P. 1–8.
50. Bouyain S., Watkins D. J. Identification of tyrosine phosphatase ligands for contactin cell adhesion molecules // *Commun. Integr. Biol.* – 2010. – V. 3. – № 3. – P. 284–286.
51. Bouyain S., Watkins D. J. The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 6. – P. 2443–2448.
52. Brandt T., Sack L. M., Arjona D., Tan D., Mei H., Cui H., Gao H., Bean L. J. H., Ankala A., del Gaudio D., Knight Johnson A., Vincent L. M., Reavey C., Lai A., Richard G., Meck J. M. Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants // *Genet. Med.* – 2020. – V. 22. – № 2. – P. 336–344.
53. Brison N., Storms J., Villela D., Claeys K. G., Dehaspe L., de Ravel T., de Waele L., Goemans N., Legius E., Peeters H., van Esch H., Race V., Robert Vermeesch J., Devriendt K., van den Bogaert K. Maternal copy-number variations in the *DMD* gene as secondary findings in noninvasive prenatal screening // *Genet. Med.* – 2019. – V. 21. – № 12. – P. 2774–2780.
54. Cardoso A. R., Lopes-Marques M., Silva R. M., Serrano C., Amorim A., Prata M. J., Azevedo L. Essential genetic findings in neurodevelopmental disorders // *Hum. Genomics.* – 2019. – V. 13. – № 1:31. – P. 1–7.
55. Carvalho C. M. B., Lupski J. R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders // *Nat. Rev. Genet.* – 2016. – V. 17. – № 4. – P. 224–238.
56. Casiraghi A., Longhena F., Straniero V., Faustini G., Newman A., Bellucci A., Valoti E. Design and Synthesis of Fluorescent Methylphenidate Analogues for a FRET-Based Assay of Synapsin III Binding // *ChemMedChem.* – 2020. – V. 15. – № 14. – P. 1330–1337.
57. Catts V. S., Catts S. V., McGrath J. J., Féron F., McLean D., Coulson E. J., Lutze-Mann L. H. Apoptosis and schizophrenia: A pilot study based on dermal fibroblast cell lines // *Schizophr. Res.* – 2006. – V. 84. – № 1. – P. 20–28.
58. Cesta C. E., Månsson M., Palm C., Lichtenstein P., Iliadou A. N., Landén M. Polycystic ovary syndrome and psychiatric disorders: Co-morbidity and heritability in a nationwide Swedish cohort // *Psychoneuroendocrinology.* – 2016. – V. 73. – P. 196–203.

59. Chatterjee M., Schild D., Teunissen C. Contactins in the central nervous system: Role in health and disease // *Neural Regen. Res.* – 2019. – V. 14. – № 2. – P. 206–216.
60. Chechetkina S. A., Khabarova A. A., Chvileva A. S., Kurchenko O. M., Smirnov A. V., Yunusova A. M., Kotov I. N., Musatova E. V., Pomerantseva E. A., Volovikov E. A., Lagarkova M. A., Shnaider T. A., Pristiyazhnyuk I. E. Generation of two iPSC lines from healthy donor with a heterozygous mutation in the *VPS13B* gene // *Stem Cell Res.* – 2022. – V. 59. – № 1:102648. – P. 1–4.
61. Chelly J., Khelfaoui M., Francis F., Chérif B., Bienvenu T. Genetics and pathophysiology of mental retardation // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – V. 14. – № 6. – P. 701–713.
62. Chen C., Wirth A., Ponimaskin E. Cdc42: an important regulator of neuronal morphology // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2012. – V. 44. – № 3. – P. 447–451.
63. Chen M., Wang W., Song W., Qian W., Lin G. Integrative Analysis Identified Key Schizophrenia Risk Factors from an Abnormal Behavior Mouse Gene Set // *Life (Basel, Switzerland)*. – 2021. – V. 11. – № 2. – P. 1–15.
64. Chen X., Schulz-Trieglaff O., Shaw R., Barnes B., Schlesinger F., Källberg M., Cox A. J., Kruglyak S., Saunders C. T. Manta: rapid detection of structural variants and indels for germline and cancer sequencing applications // *Bioinformatics*. – 2016. – V. 32. – № 8. – P. 1220–1222.
65. Cheng M. C., Chien W. H., Huang Y. S., Fang T. H., Chen C. H. Translational Study of Copy Number Variations in Schizophrenia // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 23. – № 1:457. – P. 1–12.
66. Chiurazzi P., Pirozzi F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability // *F1000Research*. – 2016. – V. 5. – P. 1–16.
67. Chuang H. C., Huang T. N., Hsueh Y. P. T-Brain-1 - A Potential Master Regulator in Autism Spectrum Disorders // *Autism Res.* – 2015. – V. 8. – № 4. – P. 412–426.
68. Clarke R., Lee S., Eapen V. Pathogenetic model for Tourette syndrome delineates overlap with related neurodevelopmental disorders including Autism // *Transl. Psychiatry*. – 2012. – V. 2. – № 9:e158. – P. 1–13.
69. Clissold R. L., Ashfield B., Burrage J., Hannon E., Bingham C., Mill J., Hattersley A., Dempster E. L. Genome-wide methylomic analysis in individuals with *HNF1B* intragenic mutation and 17q12 microdeletion // *Clin. Epigenetics*. – 2018. – V. 10. – № 1:97. – P. 1–11.
70. Coe B. P., Stessman H. A. F., Sulovari A., Geisheker M. R., Bakken T. E., Lake A. M., Dougherty J. D., Lein E. S., Hormozdiari F., Bernier R. A., Eichler E. E. Neurodevelopmental disease genes implicated by *de novo* mutation and copy number variation morbidity // *Nat. Genet.* – 2019. – V. 51. – № 1. – P. 106–116.

71. Cooper D. N., Krawczak M., Polychronakos C., Tyler-Smith C., Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: Towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease // *Hum. Genet.* – 2013. – V. 132. – № 10. – P. 1077–1130.
72. Coppola A., Cellini E., Stamberger H., Saarentaus E., Cetica V., Lal D., Djémié T., Bartnik-Glaska M., Ceulemans B., Helen Cross J., Deconinck T., de Masi S., Dorn T., Guerrini R., Hoffman-Zacharska D., Kooy F., Lagae L., Lench N., Lemke J. R., Lucenteforte E., Madia F., Mefford H. C., Morrogh D., Nuernberg P., Palotie A., Schoonjans A.-S., Striano P., Szczepanik E., Tostevin A., Vermeesch J. R., van Esch H., Paesschen W. V., Waters J. J., Weckhuysen S., Zara F., de Jonghe P., Sisodiya S. M., Marini C., EuroEPINOMICS-RES Consortium, EpiCNV Consortium. Diagnostic implications of genetic copy number variation in epilepsy plus // *Epilepsia.* – 2019. – V. 60. – № 4. – P. 689–706.
73. Costantini A., Skarp S., Kämpe A., Mäkitie R. E., Pettersson M., Jiao H., Männikkö M., Taylan F., Lindstrand A., Mäkitie O. Rare copy number variants in array-based comparative genomic hybridization in early-onset skeletal fragility // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2018. – V. 9. – № 380. – P. 1–10.
74. Creeth H., John R. The placental programming hypothesis: Placental endocrine insufficiency and the co-occurrence of low birth weight and maternal mood disorders // *Placenta.* – 2020. – V. 98. – P. 52–59.
75. Cui X.-Y. Y., Hu Q.-D. D., Tekaya M., Shimoda Y., Ang B.-T. T., Nie D.-Y. Y., Sun L., Hu W.-P. P., Karsak M., Duka T., Takeda Y., Ou L.-Y. Y., Dawe G. S., Yu F.-G. G., Ahmed S., Jin L.-H. H., Schachner M., Watanabe K., Arsenijevic Y., Xiao Z.-C. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 24. – P. 25858–25865.
76. D'Aguanno S., Valentini E., Tupone M., Desideri M., Martile M. Di, Spagnuolo M., Buglioni S., Ercolani C., Falcone I., de Dominici M., Milella M., Rizzo M., Calabretta B., Cota C., Anichini A., Trisciuglio D., del Bufalo D. Semaphorin 5A drives melanoma progression: role of Bcl-2, miR-204 and c-Myb // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2018. – V. 37. – № 1:278. – P. 1–14.
77. van Daalen E., Kemner C., Verbeek N. E., van der Zwaag B., Dijkhuizen T., Rump P., Houben R., van Slot R., de Jonge M. V., Staal W. G., Beemer F. A., Vorstman J. A. S., Burbach J. P. H., van Amstel H. K. P., Hochstenbach R., Brilstra E. H., Poot M. Social responsiveness scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism // *Neurogenetics.* – 2011. – V. 12. – № 4. – P. 315–323.

78. Demirkol S., Gomceli I., Isbilen M., Dayanc B., Tez M., Bostanci E., Turhan N., Akoglu M., Ozyerli E., Durdu S., Konu O., Nissan A., Gonen M., Gure A. A Combined ULBP2 and SEMA5A Expression Signature as a Prognostic and Predictive Biomarker for Colon Cancer // *J. Cancer*. – 2017. – V. 8. – № 7. – P. 1113–1122.
79. Dennert N., Engels H., Cremer K., Becker J., Wohlleber E., Albrecht B., Ehret J. K., Lüdecke H. J., Suri M., Carignani G., Renieri A., Kukuk G. M., Wieland T., Andrieux J., Strom T. M., Wieczorek D., Dieux-Coëslier A., Zink A. M. *De novo* microdeletions and point mutations affecting SOX2 in three individuals with intellectual disability but without major eye malformations // *Am. J. Med. Genet. Part A*. – 2017. – V. 173. – № 2. – P. 435–443.
80. Deshpande A., Weiss L. A. Recurrent reciprocal copy number variants: Roles and rules in neurodevelopmental disorders // *Dev. Neurobiol.* – 2018. – V. 78. – № 5. – P. 519–530.
81. Dierssen M. Top ten discoveries of the year: Neurodevelopmental disorders // *Free Neuropathol.* – 2020. – V. 1. – № 13. – P. 1–16.
82. Drakulic D., Djurovic S., Syed Y. A., Trattaro S., Caporale N., Falk A., Ofir R., Heine V. M., Chawner S. J. R. A., Rodriguez-Moreno A., van den Bree M. B. M., Testa G., Petrakis S., Harwood A. J. Copy number variants (CNVs): a powerful tool for iPSC-based modelling of ASD // *Mol. Autism*. – 2020. – V. 11. – № 1:42. – P. 1–18.
83. Egloff M., Nguyen L. S., Siquier-Pernet K., Cormier-Daire V., Baujat G., Attié-Bitach T., Bole-Feysot C., Nitschke P., Vekemans M., Colleaux L., Malan V. Whole-exome sequence analysis highlights the role of unmasked recessive mutations in copy number variants with incomplete penetrance // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2018. – V. 26. – № 6. – P. 912–918.
84. Elia J., Gai X., Xie H. M., Perin L. C., Geiger E., Glessner J. T., D'arcy M., de Berardinis R., Frackelton E., Kim C., Lantieri F., Muganga B. M., Wang L., Takeda T., Rappaport E. F., Grant S. F. A., Berrettini W., Devoto M., Shaikh T. H., Hakonarson H., White P. S. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes // *Mol. Psychiatry*. – 2010. – V. 15. – № 6. – P. 637–646.
85. Feddersen S., Overgaard M., Nybo M. Duplication of exon 7-12 in the low-density lipoprotein receptor gene in three Danish patients with familial hypercholesterolemia // *J. Clin. Lipidol.* – 2013. – V. 7. – № 2. – P. 174–177.
86. Ferlini A., Bovolenta M., Neri M., Gualandi F., Balboni A., Yuryev A., Salvi F., Gemmati D., Liboni A., Zamboni P. Custom CGH array profiling of copy number variations (CNVs) on chromosome 6p21.32 (HLA locus) in patients with venous malformations associated with multiple sclerosis // *BMC Med. Genet.* – 2010. – V. 11. – № 64. – P. 1–10.

87. Fernandez K., Asad S., Taylan F., Wahlgren C. F., Bilcha K. D., Nordenskjöld M., Winge M. C. G., Bradley M. Intragenic Copy Number Variation in the Filaggrin Gene in Ethiopian Patients with Atopic Dermatitis // *Pediatr. Dermatol.* – 2017. – V. 34. – № 3. – P. e140–e141.
88. Fernández-Castillo N., Gan G., van Donkelaar M. M. J., Vaht M., Weber H., Retz W., Meyer-Lindenberg A., Franke B., Harro J., Reif A., Faraone S. V., Cormand B. *RBFOX1*, encoding a splicing regulator, is a candidate gene for aggressive behavior // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2020. – V. 30. – P. 44–55.
89. Fishman V., Shnayder T., Orishchenko K., Bader M., Alenina N., Serov O. Cell divisions are not essential for the direct conversion of fibroblasts into neuronal cells // *Cell Cycle.* – 2015. – V. 14. – № 8. – P. 1188–1196.
90. Flore G., Cioffi S., Bilio M., Illingworth E. Cortical Development Requires Mesodermal Expression of *Tbx1*, a Gene Haploinsufficient in 22q11.2 Deletion Syndrome // *Cereb. Cortex.* – 2017. – V. 27. – № 3. – P. 2210–2225.
91. Frega M., Linda K., Keller J. M., Gümüş-Akay G., Mossink B., van Rhijn J. R., Negwer M., Klein Gunnewiek T., Foreman K., Kompier N., Schoenmaker C., van den Akker W., van der Werf I., Oudakker A., Zhou H., Kleefstra T., Schubert D., van Bokhoven H., Nadif Kasri N. Neuronal network dysfunction in a model for Kleefstra syndrome mediated by enhanced NMDAR signaling // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – № 1:4928. – P. 1–15.
92. Fry A. E., Rees E., Thompson R., Mantripragada K., Blake P., Jones G., Morgan S., Jose S., Mugalaasi H., Archer H., McCann E., Clarke A., Taylor C., Davies S., Gibbon F., Te Water Naude J., Hartley L., Thomas G., White C., Natarajan J., Thomas R. H., Drew C., Chung S.-K., Rees M. I., Holmans P., Owen M. J., Kirov G., Pilz D. T., Kerr M. P. Pathogenic copy number variants and *SCN1A* mutations in patients with intellectual disability and childhood-onset epilepsy // *BMC Med. Genet.* – 2016. – V. 17. – № 1:34. – P. 1–9.
93. Gambin T., Yuan B., Bi W., Liu P., Rosenfeld J. A., Coban-Akdemir Z., Pursley A. N., Nagamani S. C. S., Marom R., Golla S., Dengle L., Petrie H. G., Matalon R., Emrick L., Proud M. B., Treadwell-Deering D., Chao H. T., Koillinen H., Brown C., Urraca N., Mostafavi R., Bernes S., Roeder E. R., Nugent K. M., Bader P. I., Bellus G., Cummings M., Northrup H., Ashfaq M., Westman R., Wildin R., Beck A. E., Immken L., Elton L., Varghese S., Buchanan E., Faivre L., Lefebvre M., Schaaf C. P., Walkiewicz M., Yang Y., Kang S.-H. L., Lalani S. R., Bacino C. A., Beaudet A. L., Breman A. M., Smith J. L., Cheung S. W., Lupski J. R., Patel A., Shaw C. A., Stankiewicz P. Identification of novel candidate disease genes from *de novo* exonic copy number variants // *Genome Med.* – 2017. – V. 9. – № 1:83. – P. 1–15.

94. Gandawijaya J., Bamford R. A., Burbach J. P. H., Oguro-Ando A. Cell Adhesion Molecules Involved in Neurodevelopmental Pathways Implicated in 3p-Deletion Syndrome and Autism Spectrum Disorder // *Front. Cell. Neurosci.* – 2021. – V. 14. – № 611379. – P. 1–20.
95. Gao K., Zhang Y. Y., Zhang L., Kong W., Xie H., Wang J., Wu Y., Wu X., Liu X., Zhang Y. Y., Zhang F., Yu A. C. H., Jiang Y. Large *de novo* microdeletion in epilepsy with intellectual and developmental disabilities, with a systems biology analysis // *Adv. Neurobiol.* – 2018. – V. 21. – P. 247–266.
96. García-Ortiz J. E., Zarazúa-Niño A. I., Hernández-Orozco A. A., Reyes-Oliva E. A., Pérez-Ávila C. E., Becerra-Solano L. E., Galán-Huerta K. A., Rivas-Estilla A. M., Córdova-Fletes C. Case Report: Whole Exome Sequencing Unveils an Inherited Truncating Variant in *CNTN6* (p.Ser189Ter) in a Mexican Child with Autism Spectrum Disorder // *J. Autism Dev. Disord.* – 2019. – V. 50. – № 6. – P. 2247–2251.
97. Gardner R. J. M., Amor D. J. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling // New York: Oxford University Press. – 2018. 5 Ed. – 1268 p.
98. Ge L., Liu A., Gao K., Du R., Ding J., Mao B., Hua Y., Zhang X., Tan D., Yang H., Fu X., Fan Y., Zhang L., Song S., Wu J., Zhang F., Jiang Y., Wu X., Xiong H. Deletion of exon 4 in *LAMA2* is the most frequent mutation in Chinese patients with laminin $\alpha 2$ -related muscular dystrophy // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1:14989. – P. 1–10.
99. Gennarini G., Bizzoca A., Picocchi S., Puzzo D., Corsi P., Furley A. J. W. The role of Gpi-anchored axonal glycoproteins in neural development and neurological disorders // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2017. – V. 81. – P. 49–63.
100. Germain N. D., Chen P.-F., Plocik A. M., Glatt-Deeley H., Brown J., Fink J. J., Bolduc K. A., Robinson T. M., Levine E. S., Reiter L. T., Graveley B. R., Lalande M., Chamberlain S. J. Gene expression analysis of human induced pluripotent stem cell-derived neurons carrying copy number variants of chromosome 15q11-q13.1 // *Mol. Autism.* – 2014. – V. 5. – № 44. – P. 1–19.
101. Gibon J., Unsain N., Gamache K., Thomas R. A., de Leon A., Johnstone A., Nader K., Séguéla P., Barker P. A. The X-linked inhibitor of apoptosis regulates long-term depression and learning rate // *FASEB J.* – 2016. – V. 30. – № 9. – P. 3083–3090.
102. Gillentine M. A., Wang T., Hoekzema K., Rosenfeld J., Liu P., Guo H., Kim C. N., de Vries B. B. A., Vissers L. E. L. M., Nordenskjold M., Kvarnung M., Lindstrand A., Nordgren A., Gecz J., Iascone M., Cereda A., Scatigno A., Maitz S., Zanni G., Bertini E., Zweier C., Schuhmann S., Wiesener A., Pepper M., Panjwani H., Torti E., Abid F., Anselm I., Srivastava S., Atwal P., Bacino C. A., Bhat G., Cobian K., Bird L. M., Friedman J., Wright M. S., Callewert B., Petit F., Mathieu S., Afenjar A., Christensen S. K., White K. M., Elpeleg O.,

- Berger I., Espineli E. J., Fagerberg C., Brasch-Andersen C., Hansen L. K., Feyma T., Hughes S., Thiffault I., Sullivan B., Yan S., Keller K., Keren B., Mignot C., Kooy F., Meuwissen M., Basinger A., Kukulich M., Philips M., Ortega L., Drummond-Borg M., Lauridsen M., Sorensen K., Lehman A., CAUSES Study, Lopez-Rangel E., Levy P., Lessel D., Lotze T., Madan-Khetarpal S., Sebastian J., Vento J., Vats D., Benman L. M., Mckee S., Mirzaa G. M., Muss C., Pappas J., Peeters H., Romano C., Elia M., Galesi O., Simon M. E. H., van Gassen K. L. I., Simpson K., Stratton R., Syed S., Thevenon J., Palafoll I. V., Vitobello A., Bournez M., Faivre L., Xia K., SPARK Consortium, Earl R. K., Nowakowski T., Bernier R. A., Eichler E.E. Rare deleterious mutations of *HNRNP* genes result in shared neurodevelopmental disorders // *Genome Med.* – 2021. – V. 13. – № 1:63. – P. 1–26.
103. Gillentine M. A., Yin J., Bajic A., Zhang P., Cummock S., Kim J. J., Schaaf C. P. Functional Consequences of *CHRNA7* Copy-Number Alterations in Induced Pluripotent Stem Cells and Neural Progenitor Cells. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2017. – V. 101. – № 6. – P. 874–887.
 104. Girirajan S., Pizzo L., Moeschler J., Rosenfeld J. 16p12.2 Recurrent Deletion // *GeneReviews.* – 2021.
 105. Glantz L. A., Gilmore J. H., Lieberman J. A., Jarskog L. F. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia // *Schizophr. Res.* – 2006. – V. 81. – № 1. – P. 47–63.
 106. Göblös A., Danis J., Vas K., Bata-Csörgo Z., Kemény L., Széll M. Keratinocytes express functional CARD18, a negative regulator of inflammasome activation, and its altered expression in psoriasis may contribute to disease pathogenesis // *Mol. Immunol.* – 2016. – V. 73. – P. 10–18.
 107. Goldenberg P. An update on common chromosome microdeletion and microduplication syndromes // *Pediatr. Ann.* – 2018. – V. 47. – № 5. – P. 198–203.
 108. Gonzales P. K., Roberts C. M., Fonte V., Jacobsen C., Stein G. H., Link C. D. Transcriptome analysis of genetically matched human induced pluripotent stem cells disomic or trisomic for chromosome 21 // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – № 3:e0194581. – P. 1–22.
 109. Gonzalez C., Armijo E., Bravo-Alegria J., Becerra-Calixto A., Mays C. E., Soto C. Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids // *Mol. Psychiatry.* – 2018. – V. 23. – № 12. – P. 2363–2374.
 110. Grant S. Synapse diversity and synaptome architecture in human genetic disorders // *Hum. Mol. Genet.* – 2019. – V. 28. – № R2. – P. 219–225.
 111. Gras C., Eiz-Vesper B., Jaimes Y., Immenschuh S., Jacobs R., Witte T., Blasczyk R., Figueiredo C. Secreted semaphorin 5A activates immune effector cells and is a biomarker for rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.).* – 2014. – V. 66. – № 6. – P. 1461–1471.

112. Greenberg D. M., Warrier V., Allison C., Baron-Cohen S. Testing the empathizing–systemizing theory of sex differences and the extreme male brain theory of autism in half a million people // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2018. – V. 115. – № 48. – P. 12152–12157.
113. Gridina M. M., Matveeva N. M., Fishman V. S., Menzorov A. G., Kizilova H. A., Beregovoy N. A., Kovrigin I. I., Pristyazhnyuk I. E., Oscorbin I. P., Filipenko M. L., Kashevarova A. A., Skryabin N. A., Nikitina T. V., Sazhenova E. A., Nazarenko L. P., Lebedev I. N., Serov O. L. Allele-Specific Biased Expression of the *CNTN6* Gene in iPS Cell-Derived Neurons from a Patient with Intellectual Disability and 3p26.3 Microduplication Involving the *CNTN6* Gene // *Mol. Neurobiol.* – 2018. – V. 55. – № 8. – P. 6533–6546.
114. Gridina M. M., Nikitina T. V., Pristyazhnyuk I. E., Kashevarova A. A., Lopatkina M. E., Vasilyev S. A., Nazarenko L. P., Lebedev I. N., Serov O. L. Generation of the induced pluripotent stem cell line, ICAGi002-A, from unaffected carrier megabase scaled duplication involving the *CNTN6* gene // *Stem Cell Res.* – 2019. – V. 40. – № 101556. – P. 1–4.
115. Grigor'eva E., Malankhanova T., Surumbayeva A., Pavlova S., Minina J., Kizilova E., Sul'dina L., Morozova K., Kiseleva E., Sorokoumov E., Lebedev I., Malakhova A., Zakian S. Cytotechnology Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology.* – 2020. – V. 7. – № 5. – P. 649–663.
116. Grimm O., Kittel-Schneider S., Reif A. Recent developments in the genetics of attention-deficit hyperactivity disorder // *Psychiatry Clin. Neurosci.* – 2018. – V. 72. – № 9. – P. 654–672.
117. Griswold A. J., Ma D., Cukier H. N., Nations L. D., Schmidt M. A., Chung R. H., Jaworski J. M., Salyakina D., Konidari I., Whitehead P. L., Wright H. H., Abramson R. K., Williams S. M., Menon R., Martin E. R., Haines J. L., Gilbert J. R., Cuccaro M. L., Pericak-Vance M. A. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways // *Hum. Mol. Genet.* – 2012. – V. 21. – № 15. – P. 3513–3523.
118. Guang S., Pang N., Deng X., Yang L., He F., Wu L., Chen C., Yin F., Peng J. Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 12. – № 470. – P. 1–16.
119. Guo H., Xun G., Peng Y., Xiang X., Xiong Z., Zhang L., He Y., Xu X., Liu Y., Lu L., Long Z., Pan Q., Hu Z., Zhao J., Xia K. Disruption of Contactin 4 in two subjects with autism in Chinese population // *Gene.* – 2012. – V. 505. – № 2. – P. 201–205.
120. Gupta A. R., Westphal A., Yang D. Y. J., Sullivan C. A. W., Eilbott J., Zaidi S., Voos A., Wyk B. C. Vander, Ventola P., Waqar Z., Fernandez T. V., Ercan-Sencicek A. G., Walker M. F., Choi M., Schneider A., Hedderly T., Baird G., Friedman H., Cordeaux C., Ristow A., Shic

- F., Volkmar F. R., Pelphrey K. A. Neurogenetic analysis of childhood disintegrative disorder // *Mol. Autism*. – 2017. – V. 8. – № 19. – P. 1–17.
121. Han F., Racacho L., Yang H., Read T., Suchowersky O., Lang A. E., Grimes D. A., Bulman D. E. Large deletions account for an increasing number of mutations in *SGCE* // *Mov. Disord.* – 2008. – V. 23. – № 3. – P. 456–460.
 122. Harich B., van der Voet M., Klein M., Čížek P., Fenckova M., Schenck A., Franke B. From Rare Copy Number Variants to Biological Processes in ADHD // *Am. J. Psychiatry*. – 2020. – V. 177. – № 9. – P. 855–866.
 123. Hattori A., Fukami M. Established and Novel Mechanisms Leading to *de novo* Genomic Rearrangements in the Human Germline // *Cytogenet. Genome Res.* – 2020. – V. 160. – № 4. – P. 167–176.
 124. Helgeson M., Keller-Ramey J., Knight Johnson A., Lee J. A., Magner D. B., Deml B., Deml J., Hu Y. Y., Li Z., Donato K., Das S., Laframboise R., Tremblay S., Krantz I., Noon S., Hoganson G., Burton J., Schaaf C. P., del Gaudio D. Molecular characterization of *HDAC8* deletions in individuals with atypical Cornelia de Lange syndrome // *J. Hum. Genet.* – 2018. – V. 63. – № 3. – P. 349–356.
 125. Hentze H., Soong P., Wang S., Phillips B., Putti T., Dunn N. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies // *Stem Cell Res.* – 2009. – V. 2. – № 3. – P. 198–210.
 126. Hibaoui Y., Grad I., Letourneau A., Sailani M. R., Dahoun S., Santoni F. A., Gimelli S., Guipponi M., Pelte M. F. F., Béna F., Antonarakis S. E., Feki A. Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21 // *EMBO Mol. Med.* – 2014. – V. 6. – № 2. – P. 259–277.
 127. Higginbotham E. Characterizing Genomic Duplication in Autism Spectrum Disorder // University of Toronto. – 2020.
 128. Horpaopan S., Spier I., Zink A. M., Altmüller J., Holzapfel S., Laner A., Vogt S., Uhlhaas S., Heilmann S., Stienen D., Pasternack S. M., Keppler K., Adam R., Kayser K., Moebus S., Draaken M., Degenhardt F., Engels H., Hofmann A., Nöthen M. M., Steinke V., Perez-Bouza A., Herms S., Holinski-Feder E., Fröhlich H., Thiele H., Hoffmann P., Aretz S. Genome-wide CNV analysis in 221 unrelated patients and targeted high-throughput sequencing reveal novel causative candidate genes for colorectal adenomatous polyposis // *Int. J. Cancer*. – 2015. – V. 136. – № 6. – P. 578–589.
 129. Hovhannisyan G., Harutyunyan T., Aroutiounian R., Liehr T. DNA copy number variations as markers of mutagenic impact // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – № 19:4723. – P. 1–19.

130. Hsiao M. C., Piotrowski A., Callens T., Fu C., Wimmer K., Claes K. B. M., Messiaen L. Decoding *NF1* Intragenic Copy-Number Variations // *Am. J. Hum. Genet.* – 2015. – V. 97. – № 2. – P. 238–249.
131. Hu J., Liao J., Sathanoori M., Kochmar S., Sebastian J., Yatsenko S. A., Surti U. *CNTN6* copy number variations in 14 patients: A possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // *J. Neurodev. Disord.* – 2015. – V. 7. – № 1:26. – P. 1–9.
132. Hu Q. D., Ma Q. H., Gennarini G., Xiao Z. C. Cross-talk between F3/contactin and notch at axoglial interface: A role in oligodendrocyte development // *Dev. Neurosci.* – 2006. – V. 28. – № 1-2. – P. 25–33.
133. Huang A. Y., Yu D., Davis L. K., Sul J. H., Tsetsos F., Ramensky V., Zelaya I., Ramos E. M., Osiecki L., Chen J. A., McGrath L. M., Illmann C., Sandor P., Barr C. L., Grados M., Singer H. S., Nöthen M. M., Hebebrand J., King R. A., Dion Y., Rouleau G., Budman C. L., Depienne C., Worbe Y., Hartmann A., Müller-Vahl K. R., Stuhmann M., Aschauer H., Stamenkovic M., Schloegelhofer M., Konstantinidis A., Lyon G. J., McMahon W. M., Barta C., Tarnok Z., Nagy P., Batterson J. R., Rizzo R., Cath D. C., Wolanczyk T., Berlin C., Malaty I. A., Okun M. S., Woods D. W., Rees E., Pato C. N., Pato M. T., Knowles J. A., Posthuma D., Pauls D. L., Cox N. J., Neale B. M., Freimer N. B., Paschou P., Mathews C. A., Scharf J. M., Coppola J., Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics (TSAICG), Gilles de la Tourette Syndrome GWAS Replication Initiative (GGRI). Rare Copy Number Variants in *NRXN1* and *CNTN6* Increase Risk for Tourette Syndrome // *Neuron.* – 2017. – V. 94. – № 6. – P. 1101–1111.
134. Huang Z., Yu Y., Shimoda Y., Watanabe K., Liu Y. Loss of neural recognition molecule NB-3 delays the normal projection and terminal branching of developing corticospinal tract axons in the mouse. // *J. Comp. Neurol.* – 2012. – V. 520. – № 6. – P. 1227–1245.
135. Huguet G., Schramm C., Douard E., Jiang L., Labbe A., Tihy F., Mathonnet G., Nizard S., Lemyre E., Mathieu A., Poline J. B., Loth E., Toro R., Schumann G., Conrod P., Pausova Z., Greenwood C., Paus T., Bourgeron T., Jacquemont S., IMAGEN Consortium. Measuring and estimating the effect sizes of copy number variants on general intelligence in community-based samples // *JAMA Psychiatry.* – 2018. – V. 75. – № 5. – P. 447–457.
136. Ilchibaeva T. V., Tsybko A. S., Kozhemyakina R. V., Naumenko V. S. Expression of apoptosis genes in the brain of rats with genetically defined fear-induced aggression // *Mol. Biol. (Mosk).* – V. 50. – № 5. – P. 814–820.
137. Ismail F. Y., Shapiro B. K. What are neurodevelopmental disorders? // *Curr. Opin. Neurol.* – 2019. – V. 32. – № 4. – P. 611–616.

138. Jamsheer A., Sowińska A., Trzeciak T., Jamsheer-Bratkowska M., Geppert A., Latos-Bieleńska A. Expanded mutational spectrum of the *GLI3* gene substantiates genotype-phenotype correlations // *J. Appl. Genet.* – 2012. – V. 53. – № 4. – P. 415–422.
139. Jarskog L. F., Glantz L. A., Gilmore J. H., Lieberman J. A. Apoptotic mechanisms in the pathophysiology of schizophrenia. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* – 2005. – V. 29. – № 5. – P. 846–858.
140. Johnstone M., Vasistha N. A., Barbu M. C., Dando O., Burr K., Christopher E., Glen S., Robert C., Fetit R., Macleod K. G., Livesey M. R., Clair D. S., Blackwood D. H. R., Millar K., Carragher N. O., Hardingham G. E., Wyllie D. J. A., Johnstone E. C., Whalley H. C., McIntosh A. M., Lawrie S. M., Chandran S. Reversal of proliferation deficits caused by chromosome 16p13.11 microduplication through targeting NFκB signaling: an integrated study of patient-derived neuronal precursor cells, cerebral organoids and *in vivo* brain imaging // *Mol. Psychiatry.* – 2019. – V. 24. – № 2. – P. 294–311.
141. Juan-Perez C., Farrand S., Velakoulis D. Schizophrenia and epilepsy as a result of maternally inherited *CNTN6* copy number variant // *Schizophr. Res.* – 2018. – V. 202. – P. 111–112.
142. Kalnak N., Stamouli S., Peyrard-Janvid M., Rabkina I., Becker M., Klingberg T., Kere J., Forssberg H., Tammimies K. Enrichment of rare copy number variation in children with developmental language disorder // *Clin. Genet.* – 2018. – V. 94. – № 3–4. – P. 313–320.
143. Kaminsky E. B., Kaul V., Paschall J., Church D. M., Bunke B., Kunig D., Moreno-De-Luca D., Moreno-De-Luca A., Mulle J. G., Warren S. T., Richard G., Compton J. G., Fuller A. E., Gliem T. J., Huang S., Collinson M. N., Beal S. J., Ackley T., Pickering D. L., Golden D. M., Aston E., Whitby H., Shetty S., Rossi M. R., Rudd M. K., South S. T., Brothman A. R., Sanger W. G., Iyer R. K., Crolla J. A., Thorland E. C., Aradhya S., Ledbetter D. H., Martin C. L. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities // *Genet. Med.* – 2011. – V. 13. – № 9. – P. 777–784.
144. Kandaswamy R., McQuillin A., Curtis D., Gurling H. Tests of linkage and allelic association between markers in the 1p36 *PRKCZ* (protein kinase C zeta) gene region and bipolar affective disorder // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* – 2012. – V. 159B. – № 2. – P. 201–209.
145. Karagiannis P., Takahashi K., Saito M., Yoshida Y., Okita K., Watanabe A., Inoue H., Yamashita J. K., Todani M., Nakagawa M., Osawa M., Yashiro Y., Yamanaka S., Osafune K. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development // *Physiol. Rev.* – 2019. – V. 99. – № 1. – P. 79–114.

146. Kashevarova A. A., Nazarenko L. P., Schultz-Pedersen S., Skryabin N. A., Salyukova O. A., Chechetkina N. N., Tolmacheva E. N., Rudko A. A., Magini P., Graziano C., Romeo G., Joss S., Tümer Z., Lebedev I. N. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol. Cytogenet.* – 2014. – V. 7. – № 1:97. – P. 1–10.
147. Kaur M., Izumi K., Wilkens A. B., Chatfield K. C., Spinner N. B., Conlin L. K., Zhang Z., Krantz I. D. Genome-wide expression analysis in fibroblast cell lines from probands with Pallister Killian syndrome // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 10:e108853. – P. 1–12.
148. Kee T., Espinoza Gonzalez P., Wehinger J., Bukhari M., Ermekbaeva A., Sista A., Kotsiviras P., Liu T., Kang D., Woo J. Mitochondrial *CHCHD2*: Disease-Associated Mutations, Physiological Functions, and Current Animal Models // *Front. Aging Neurosci.* – 2021. – V. 13. – № 660843. – P. 1–15.
149. Kelsen J. R., Dawany N., Martinez A., Grochowski C. M., Maurer K., Rappaport E., Piccoli D. A., Baldassano R. N., Mamula P., Sullivan K. E., Devoto M. A *de novo* whole gene deletion of *XIAP* detected by exome sequencing analysis in very early onset inflammatory bowel disease: A case report // *BMC Gastroenterol.* – 2015. – V. 15. – № 160. – P. 1–5.
150. Kerner B., Lambert C. G., Muthén B. O. Genome-wide association study in bipolar patients stratified by co-morbidity // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 12. – P. 1–10.
151. Khalifa M., Stein J., Grau L., Nelson V., Meck J., Aradhya S., Duby J. Partial deletion of *ANKRD11* results in the KBG phenotype distinct from the 16q24.3 microdeletion syndrome // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2013. – V. 161. – № 4. – P. 835–840.
152. Khattak S., Brimble E., Zhang W., Zaslavsky K., Strong E., Ross P. J., Hendry J., Mital S., Salter M. W., Osborne L. R., Ellis J. Human induced pluripotent stem cell derived neurons as a model for Williams-Beuren syndrome // *Mol. Brain.* – 2015. – V. 8. – № 1:77. – P. 1–11.
153. Kloosterman W. P., Hochstenbach R. Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease // *Mol. Cytogenet.* – 2014. – V. 7. – № 1:100. – P. 1–12.
154. Kon M., Suzuki E., Dung V. C., Hasegawa Y., Mitsui T., Muroya K., Ueoka K., Igarashi N., Nagasaki K., Oto Y., Hamajima T., Yoshino K., Igarashi M., Kato-Fukui Y., Nakabayashi K., Hayashi K., Hata K., Matsubara Y., Moriya K., Ogata T., Nonomura K., Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients // *Hum. Reprod.* – 2015. – V. 30. – № 3. – P. 499–506.

155. Kucukkilic E., Brookes K., Barber I., Guetta-Baranes T., Morgan K., Hollox E. J. Complement receptor 1 gene (*CR1*) intragenic duplication and risk of Alzheimer's disease // *Hum. Genet.* – 2018. – V. 137. – № 4. – P. 305–314.
156. Kvarnung M., Nordgren A. Intellectual disability & rare disorders: A diagnostic challenge // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2017. – V. 1031. – P. 39–54.
157. Lai E., Nakayama H., Miyazaki T., Nakazawa T., Tabuchi K., Hashimoto K., Watanabe M., Kano M. An Autism-Associated Neuroligin-3 Mutation Affects Developmental Synapse Elimination in the Cerebellum // *Front. Neural Circuits.* – 2021. – V. 15. – № 676891. – P. 1–17.
158. Lam M., Moslem M., Bryois J., Pronk R. J., Uhlin E., Ellström I. D., Laan L., Olive J., Morse R., Rönnholm H., Louhivuori L., Korol S. V., Dahl N., Uhlén P., Anderlid B. M., Kele M., Sullivan P. F., Falk A. Single cell analysis of autism patient with bi-allelic *NRXN1-alpha* deletion reveals skewed fate choice in neural progenitors and impaired neuronal functionality // *Exp. Cell Res.* – 2019. – V. 383. – № 1:111469. – P. 1–10.
159. Lannoy N., Bandelier C., Grisart B., Reginster M., Ronge-Collard E., Vikkula M., Hermans C. Tandem inversion duplication within *F8* Intron 1 associated with mild haemophilia A // *Haemophilia.* – 2015. – V. 21. – № 4. – P. 516–522.
160. Lee S., Takeda Y., Kawano H., Hosoya H., Nomoto M., Fujimoto D., Takahashi N., Watanabe K. Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain // *Gene.* – 2000. – V. 245. – № 2. – P. 253–266.
161. Lehner M., Wisłowska-Stanek A., Skórzewska A., Płaźnik A. Chronic restraint increases apoptosis in the hippocampus of rats with high responsiveness to fear stimuli // *Neurosci. Lett.* – 2015. – V. 586. – P. 55–59.
162. Lepeta K., Lourenco M. V., Schweitzer B. C., Adami P. V. M., Banerjee P., Catuara-Solarz S., de Revenga M. L. F., Guillem A. M., Haidar M., Ijomone O. M., Nadorp B., Qi L., Perera N. D., Refsgaard L. K., Reid K. M., Sabbar M., Sahoo A., Schaefer N., Sheean R. K., Suska A., Verma R., Vicidomini C., Wright D., Zhang X.-D., Seidenbecher C. Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students // *J. Neurochem.* – 2016. – V. 138. – № 6. – P. 785–805.
163. Leshchyn's'ka I., Sytnyk V. Reciprocal interactions between cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily and the cytoskeleton in neurons // *Front Cell Dev Biol.* – 2016. – V. 4. – № 9. – P. 1–10.
164. Letourneau A., Santoni F. A., Bonilla X., Sailani M. R., Gonzalez D., Kind J., Chevalier C., Thurman R., Sandstrom R. S., Hibaoui Y., Garieri M., Popadin K., Falconnet E., Gagnebin M., Gehrig C., Vannier A., Guipponi M., Farinelli L., Robyr D., Migliavacca E., Borel C.,

- Deutsch S., Feki A., Stamatoyannopoulos J. A., Herault Y., van Steensel B., Guigo R., Antonarakis S. E. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome // *Nature*. – 2014. – V. 508. – № 7496. – P. 345–350.
165. Li D., Liu C., Huang Z., Li H., Xu Q., Zhou B., Hu C., Zhang Y., Wang Y., Nie J., Qiao Z., Yin D., Xu X. Common and Distinct Disruptions of Cortical Surface Morphology Between Autism Spectrum Disorder Children With and Without *SHANK3* Deficiency // *Front. Neurosci.* – 2021. – V. 15. – № 751364. – P. 1–12.
166. Li T., Zhang Y., Wang Q., Shao X., Lyu D., Lv R., Tao-Ran L., Yu-Di Z., Qun W., Xiao-Qiu S., Di-Yang L., Rui-Juan L. Clinical Characteristics and Long-Term Prognosis of Anti-LG11 Encephalitis: A Single-Center Cohort Study in Beijing, China // *Front Neurol.* – 2021. – V. 12. – № 674368. – P. 1–10.
167. Li Y., Yang N. Microarray expression profile analysis of long non-coding RNAs in thoracic aortic aneurysm // *Kaohsiung J. Med. Sci.* – 2018. – V. 34. – № 1. – P. 34–42.
168. Linda K., Lewerissa E., Verboven A., Gabriele M., Frega M., Klein Gunnewiek T., Devilee L., Ulferts E., Hommersom M., Oudakker A., Schoenmaker C., van Bokhoven H., Schubert D., Testa G., Koolen D., de Vries B., Nadif Kasri N. Imbalanced autophagy causes synaptic deficits in a human model for neurodevelopmental disorders // *Autophagy*. – 2021. – V. 18. – № 2. – P. 423–442.
169. Liu Y., Li Y., March M. E., Nguyen K., Xu K., Wang F., Guo Y., Keating B., Glessner J., Li J., Ganley T. J., Zhang J., Deardorff M. A., Xu X., Hakonarson H. Copy number variation in *CEP57L1* predisposes to congenital absence of bilateral ACL and PCL ligaments // *Hum. Genomics*. – 2015. – V. 9. – № 31. – P. 1–9.
170. Longhena F., Faustini G., Varanita T., Zaltieri M., Porrini V., Tessari I., Poliani P., Missale C., Borroni B., Padovani A., Bubacco L., Pizzi M., Spano P., Bellucci A. Synapsin III is a key component of α -synuclein fibrils in Lewy bodies of PD brains // *Brain Pathol.* – 2018. – V. 28. – № 6. – P. 875–888.
171. Longoni M., Russell M. K., High F. A., Darvishi K., Maalouf F. I., Kashani A., Tracy A. A., Coletti C. M., Loscertales M., Lage K., Ackerman K. G., Woods S. A., Ward-Melver C., Andrews D., Lee C., Pober B. R., Donahoe P. K. Prevalence and penetrance of *ZFPM2* mutations and deletions causing congenital diaphragmatic hernia // *Clin. Genet.* – 2015. – V. 87. – № 4. – P. 362–367.
172. Lorgen-Ritchie M., Murray A., Staff R., Ferguson-Smith A., Richards M., Horgan G., Phillips L., Hoad G., McNeil C., Ribeiro A., Haggarty P. Imprinting methylation predicts hippocampal volumes and hyperintensities and the change with age in later life // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – № 1:943. – P. 1–12.

173. Lu T., Tsai M., Lee J., Hsu C., Chen P., Lin C., Shih J., Yang P., Hsiao C., Lai L., Chuang E. Identification of a novel biomarker, SEMA5A, for non-small cell lung carcinoma in nonsmoking women // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2010. – V. 19. – № 10. – P. 2590–2597.
174. Lupski J. R., Liu P., Stankiewicz P., Carvalho C. M. B., Posey J. E. Clinical genomics and contextualizing genome variation in the diagnostic laboratory // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2020. – V. 20. – № 10. – P. 995–1002.
175. Ma S., Attarwala I., Xie X. SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease // *ACS Chem. Neurosci.* – 2019. – V. 10. – № 5. – P. 2094–2114.
176. Manderson E. N., Birch A. H., Shen Z., Mes-Masson A.-M., Provencher D., Tonin P. N. Molecular genetic analysis of a cell adhesion molecule with homology to L1CAM, contactin 6, and contactin 4 candidate chromosome 3p26pter tumor suppressor genes in ovarian cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 513–525.
177. Maretina M. A., Valetdinova K. R., Tsyganova N. A., Egorova A. A., Ovechkina V. S., Schiöth H. B., Zakian S. M., Baranov V. S., Kiselev A. V. Identification of specific gene methylation patterns during motor neuron differentiation from spinal muscular atrophy patient-derived iPSC // *Gene.* – 2022. – V. 811. – № 146109.
178. Martin J., Cooper M., Hamshire M. L., Pocklington A., Scherer S. W., Kent L., Gill M., Owen M. J., Williams N., O'Donovan M. C., Thapar A., Holmans P. Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: Evidence from copy number variants // *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* – 2014. – V. 53. – № 7. – P. 761–770.
179. Marui T., Funatogawa I., Koishi S., Yamamoto K., Matsumoto H., Hashimoto O., Nanba E., Nishida H., Sugiyama T., Kasai K., Watanabe K., Kano Y., Kato N. Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* – 2009. – V. 12. – № 1. – P. 1–10.
180. Masson J., Rossi M., Labalme A., Till M., Trost D., Morin I., Schluth-Bolard C., Sanlaville D. Molecular Characterization of a Familial 13.6-Mb 20p11.1p12.1 Duplication without Clinical Consequence // *Cytogenet. Genome Res.* – 2019. – V. 157. – № 3. – P. 141–147.
181. Mastrototaro G., Zaghi M., Sessa A. Epigenetic Mistakes in Neurodevelopmental Disorders // *J. Mol. Neurosci.* – 2017. – V. 61. – № 4. – P. 590–602.
182. May T., Adesina I., McGillivray J., Rinehart N. J. Sex differences in neurodevelopmental disorders // *Curr. Opin. Neurol.* – 2019. – V. 32. – № 4. – P. 622–626.
183. Maya I., Sukenik-Halevy R., Basel-Salmon L., Sagi-Dain L. Ten points to consider when providing genetic counseling for variants of incomplete penetrance and variable expressivity

- detected in a prenatal setting // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2020. – V. 99. – № 11. – P. 1427–1429.
184. McDowell M. Specific learning disability // *J. Paediatr. Child Health.* – 2018. – V. 54. – № 10. – P. 1077–1083.
 185. McKinney C. Using induced pluripotent stem cells derived neurons to model brain diseases // *Neural Regen. Res.* – 2017. – V. 12. – № 7. – P. 1062–1067.
 186. Mendelsohn B. A., Pronold M., Long R., Smaoui N., Slavotinek A. M. Advanced bone age in a girl with Wiedemann-Steiner syndrome and an exonic deletion in *KMT2A (MLL)* // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2014. – V. 164. – № 8. – P. 2079–2083.
 187. Mercati O., Danckaert A., Andre-Leroux G., Bellinzoni M., Gouder L., Watanabe K., Shimoda Y., Grailhe R., de Chaumont F., Bourgeron T., Cloez-Tayarani I. Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites // *Biol. Open.* – 2013. – V. 2. – № 3. – P. 324–334.
 188. Mercati O., Huguet G., Danckaert A., André-Leroux G., Maruani A., Bellinzoni M., Rolland T., Gouder L., Mathieu A., Buratti J., Amsellem F., Benabou M., Van-Gils J., Beggiato A., Konyukh M., Bourgeois J. P., Gazzellone M. J., Yuen R. K. C., Walker S., Delépine M., Boland A., Régnault B., Francois M., van den Abbeele T., Mosca-Boidron A. L., Faivre L., Shimoda Y., Watanabe K., Bonneau D., Rastam M., Leboyer M., Scherer S. W., Gillberg C., Delorme R., Cloëz-Tayarani I., Bourgeron T. *CNTN6* mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders // *Mol. Psychiatry.* – 2017. – V. 22. – № 4. – P. 625–633.
 189. Morris-Rosendahl D. J., Crocq M. A. Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept // *Dialogues Clin. Neurosci.* – 2020. – V. 22. – № 1. – P. 65–72.
 190. Morrow E. M., Yoo S. Y., Flavell S. W., Kim T. K., Lin Y., Hill R. S., Mukaddes N. M., Balkhy S., Gascon G., Hashmi A., Al-Saad S., Ware J., Joseph R. M., Greenblatt R., Gleason D., Ertelt J. A., Apse K. A., Bodell A., Partlow J. N., Barry B., Yao H., Markianos K., Ferland R. J., Greenberg M. E., Walsh C. A. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry // *Science.* – 2008. – V. 321. – № 5886. – P. 218–223.
 191. Mortreux J., Busa T., Germain D. P., Nadeau G., Puechberty J., Coubes C., Gatinois V., Cacciagli P., Duffourd Y., Pinard J. M., Tevissen H., Villard L., Sanlaville D., Philip N., Missirian C. The role of CNVs in the etiology of rare autosomal recessive disorders: The example of *TRAPPC9*-associated intellectual disability // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2018. – V. 26. – № 1. – P. 143–148.
 192. Mosca-Boidron A., Gueneau L., Huguet G., Goldenberg A., Henry C., Gigot N., Pallesi-Pocachard E., Falace A., Duplomb L., Thevenon J., Duffourd Y., St-Onge J., Chambon P.,

- Rivière J., Thauvin-Robinet C., Callier P., Marle N., Payet M., Ragon C., Botros H. G., Buratti J., Calderari S., Dumas G., Delorme R., Lagarde N., Pinoit J.-M., Rosier A., Masurel-Paulet A., Cardoso C., Mugneret F., Saugier-veber P., Campion D., Faivre L., Bourgeron T. A *de novo* microdeletion of *SEMA5A* in a boy with autism spectrum disorder and intellectual disability // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2016. – V. 24. – № 6. – P. 838–843.
193. Mu D., Xu Y., Zhao T., Watanabe K., Xiao Z.-C. C., Ye H. *Cntn6* deficiency impairs allocentric navigation in mice // *Brain Behav.* – 2018. – V. 8. – № 6. – P. 1–10.
 194. Nagahama K., Sakoori K., Watanabe T., Kishi Y., Kawaji K., Koebis M., Nakao K., Gotoh Y., Aiba A., Uesaka N., Kano M. *Setd1a* Insufficiency in Mice Attenuates Excitatory Synaptic Function and Recapitulates Schizophrenia-Related Behavioral Abnormalities // *Cell Rep.* – 2020. – V. 32. – № 11: 108126. – P. 1–27.
 195. Nagamani S. C. S., Erez A., Ben-Zeev B., Frydman M., Winter S., Zeller R., El-Khechen D., Escobar L., Stankiewicz P., Patel A., Cheung S. W. Detection of copy-number variation in *AUTS2* gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2013. – V. 21. – № 3. – P. 343–346.
 196. Nakabayashi K., Komaki G., Tajima A., Ando T., Ishikawa M., Nomoto J., Hata K., Oka A., Inoko H., Sasazuki T., Shirasawa S. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers // *J. Hum. Genet.* – 2009. – V. 54. – № 9. – P. 531–537.
 197. Ni C., Jiang W., Wang Z. Z., Wang Z. Z., Zhang J., Zheng X., Liu Z., Ou H., Jiang T., Liang W., Wu F., Li Q., Hou Y., Yang Q., Guo B., Liu S., Li S. S., Li S. S., Yang E., Zhu X.-H., Huang X., Wen Z., Zhao C. lncRNA-AC006129.1 reactivates a SOCS3-mediated anti-inflammatory response through DNA methylation-mediated CIC downregulation in schizophrenia // *Mol. Psychiatry.* – 2020. – V. 26. – № 8. – P. 4511–4528.
 198. Nicchia E., Greco C., de Rocco D., Pecile V., D'eustacchio A., Cappelli E., Corti P., Marra N., Ramenghi U., Pillon M., Farruggia P., Dufour C., Pallavicini A., Torelli L., Savoia A. Identification of point mutations and large intragenic deletions in Fanconi anemia using next-generation sequencing technology // *Mol. Genet. Genomic Med.* – 2015. – V. 3. – № 6. – P. 500–512.
 199. Nicolas G., Rovelet-Lecrux A., Pottier C., Martinaud O., Wallon D., Vernier L., Landemore G., Chapon F., Prieto-Morin C., Tournier-Lasserre E., Frébourg T., Campion D., Hannequin D. *PDGFB* partial deletion: A new, rare mechanism causing brain calcification with leukoencephalopathy // *J. Mol. Neurosci.* – 2014. – V. 53. – № 2. – P. 171–175.
 200. Novosadova E. V., Nekrasov E. D., Chestkov I. V., Surdina A. V., Vasina E. M., Bogomazova A. N., Manuilova E. S., Arsenyeva E. L., Simonova V. V., Konovalova E. V.,

- Fedotova E. Y., Abramychева N. Y., Khaspekoy L. G., Grivennikov I. A., Tarantul V. Z., Kiselev S. L., Illarioshkin S. N. A Platform for Studying Molecular and Cellular Mechanisms of Parkinson's Disease Based on Human Induced Pluripotent Stem Cells // *Neurosci. Res.* – 2019. – V. 8. – № 4. – P. 157–166.
201. Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome // *J. Appl. Genet.* – 2017. – V. 58. – № 4. – P. 449–457.
 202. Nugent B. M., O'Donnell C. M., Epperson C. N., Bale T. L. Placental H3K27me3 establishes female resilience to prenatal insults // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – № 1:2555. – P. 1–10.
 203. Ogawa J., Kaneko H., Masuda T., Nagata S., Hosoya H., Watanabe K. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: Isolation and characterization of cDNAs from rat brain // *Neurosci. Lett.* – 1996. – V. 218. – № 3. – P. 173–176.
 204. Oguro-Ando A., Zuko A., Kleijer K. T. E., Burbach J. P. H. A current view on contactin-4, -5, and -6: Implications in neurodevelopmental disorders // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2017. – V. 81. – P. 72–83.
 205. Okamoto Y., Goksungur M. T., Pehlivan D., Beck C. R., Gonzaga-Jauregui C., Muzny D. M., Atik M. M., Carvalho C. M. B., Matur Z., Bayraktar S., Boone P. M., Akyuz K., Gibbs R. A., Battaloglu E., Parman Y., Lupski J. R. Exonic duplication CNV of *NDRG1* associated with autosomal-recessive HMSN-Lom/CMT4D // *Genet. Med.* – 2014. – V. 16. – № 5. – P. 386–394.
 206. Oliva-Teles N., de Stefano M., Gallagher L., Rakic S., Jorge P., Cuturilo G., Markovska-Simoska S., Borg I., Wolstencroft J., Tümer Z., Harwood A., Kodra Y., Skuse D. Rare Pathogenic Copy Number Variation in the 16p11.2 (BP4-BP5) Region Associated with Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders: A Review of the Literature // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2020. – V. 17. – № 24:9253. – P. 1–16.
 207. Parenti I., Rabaneda L. G., Schoen H., Novarino G. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways // *Trends Neurosci.* – 2020. – V. 43. – № 8. – P. 608–621.
 208. Parri V., Katzaki E., Uliana V., Scionti F., Tita R., Artuso R., Longo I., Boschloo R., Vijzelaar R., Selicorni A., Brancati F., Dallapiccola B., Zelante L., Hamel C. P., Sarda P., Lalani S. R., Grasso R., Buoni S., Hayek J., Servais L., de Vries B. B. A., Georgoudi N., Nakou S., Petersen M. B., Mari F., Renieri A., Ariani F. High frequency of *COH1* intragenic deletions and duplications detected by MLPA in patients with Cohen syndrome // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2010. – V. 18. – № 10. – P. 1133–1140.

209. Patel C., Silcock L., McMullan D., Brueton L., Cox H. *TBX5* intragenic duplication: A family with an atypical Holt-Oram syndrome phenotype // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – V. 20. – № 8. – P. 863–869.
210. Pereira E., Marion R. Contiguous Gene Syndromes // *Pediatr. Rev.* – 2018. – V. 39. – № 46. – P. 46–49.
211. Pérez-Palma E., Helbig I., Klein K. M., Anttila V., Horn H., Reinthaler E. M., Gormley P., Ganna A., Byrnes A., Pernhorst K., Toliat M. R., Saarentaus E., Howrigan D. P., Hoffman P., Miquel J. F., de Ferrari G. V., Nürnberg P., Lerche H., Zimprich F., B. A., Becker A. J., Rosenow F., Perucca E., Zara F., Weber Y. G., Lal D. Heterogeneous contribution of microdeletions in the development of common generalised and focal epilepsies // *J. Med. Genet.* – 2017. – V. 54. – № 9. – P. 598–606.
212. Pettersson M., Vaz R., Hammarsjö A., Eisfeldt J., Carvalho C. M. B., Hofmeister W., Tham E., Horemuzova E., Voss U., Nishimura G., Klintberg B., Nordgren A., Nilsson D., Grigelioniene G., Lindstrand A. Alu-Alu mediated intragenic duplications in *IFT81* and *MATN3* are associated with skeletal dysplasias // *Hum. Mutat.* – 2018. – V. 39. – № 10. – P. 1456–1467.
213. Pezzolo A., Sementa A. R., Lerone M., Morini M., Ognibene M., Defferrari R., Mazzocco K., Conte M., Gigliotti A. R., Garaventa A., Pistoia V., Varesio L. Constitutional 3p26.3 terminal microdeletion in an adolescent with neuroblastoma // *Cancer Biol. Ther.* – 2017. – V. 18. – № 5. – P. 285–289.
214. Phipson B., Lee S., Majewski I. J., Alexander W. S., Smyth G. K. Robust hyperparameter estimation protects against hypervariable genes and improves power to detect differential expression // *Ann. Appl. Stat.* – 2016. – V. 10. – № 2. – P. 946–963.
215. Pinto D., Delaby E., Merico D., Barbosa M., Merikangas A., Klei L., Thiruvahindrapuram B., Xu X., Ziman R., Wang Z., Vorstman J. A. S., Thompson A., Regan R., Pilorge M., Pellecchia G., Pagnamenta A. T., Oliveira B., Marshall C. R., Magalhaes T. R., Lowe J. K., Howe J. L., Griswold A. J., Gilbert J., Duketis E., Dombroski B. A., de Jonge M. V., Cuccaro M., Crawford E. L., Correia C. T., Conroy J., Conceição I. C., Chiocchetti A. G., Casey J. P., Cai G., Cabrol C., Bolshakova N., Bacchelli E., Anney R., Gallinger S., Cotterchio M., Casey G., Zwaigenbaum L., Wittemeyer K., Wing K., Wallace S., van Engeland H., Tryfon A., Thomson S., Soorya L., Rogé B., Roberts W., Poustka F., Mougá S., Minshew N., McInnes L. A., McGrew S. G., Lord C., Leboyer M., Le Couteur A. S., Klevzon A., Jiménez González P., Jacob S., Holt R., Guter S., Green J., Green A., Gillberg C., Fernandez B. A., Duque F., Delorme R., Dawson G., Chaste P., Café C., Brennan S., Bourgeron T., Bolton P. F., Bölte S., Bernier R., Baird G., Bailey A. J., Anagnostou E., Almeida J., Wijsman E. M., Vieland V. J.,

- Vicente A. M., Schellenberg G. D., Pericak-Vance M., Paterson A. D., Parr J. R., Oliveira G., Nurnberger J. I., Monaco A. P., Maestrini E., Klauck S. M., Hakonarson H., Haines J. L., Geschwind D. H., Freitag C. M., Folstein S. E., Ennis S., Coon H., Battaglia A., Szatmari P., Sutcliffe J. S., Hallmayer J., Gill M., Cook E. H., Buxbaum J. D., Devlin B., Gallagher L., Betancur C., Scherer S. W. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders // *Am. J. Hum. Genet.* – 2014. – V. 94. – № 5. – P. 677–694.
216. Pinto D., Marshall C., Feuk L., Scherer S. W. Copy-number variation in control population cohorts // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – V. 16. – № R2. – P. 168–173.
217. Plaisancié J., Collet C., Pelletier V., Perdomo Y., Studer F., Fradin M., Schaefer E., Speeg-Schatz C., Bloch-Zupan A., Flori E., Dollfus H. *MSX2* Gene Duplication in a Patient with Eye Development Defects // *Ophthalmic Genet.* – 2015. – V. 36. – № 4. – P. 353–358.
218. Poisson A., Chatron N., Labalme A., Fournier P., Ville D., Mathieu M. L., Sanlaville D., Demily C., Lesca G. Chromatin remodeling dysfunction extends the etiological spectrum of schizophrenia: A case report // *BMC Med. Genet.* – 2020. – V. 21. – № 1:10. – P. 1–6.
219. Pös O., Radvanszky J., LastNameLastNameBuglyó G., Pös Z., Rusnakova D., Nagy B., Szemes T., Buglyó G., Pös Z., Rusnakova D., Nagy B., Szemes T. Copy number variation: Characteristics, evolutionary and pathological aspects // *Biomed. J.* – 2021. – V. 44. – № 5. – P. 548–559.
220. Qi Y., Zheng Y., Li Z., Liu Z., Xiong L. Genetic Studies of Tic Disorders and Tourette Syndrome // *Methods in Molecular Biology.* – 2019. – V. 2011. – P. 547–571.
221. Quraishi I., Stern S., Mangan K., Zhang Y., Ali S., Mercier M., Marchetto M., McLachlan M., Jones E., Gage F., Kaczmarek L. An Epilepsy-Associated *KCNT1* Mutation Enhances Excitability of Human iPSC-Derived Neurons by Increasing Slack K Na Currents // *J. Neurosci.* – 2019. – V. 39. – № 37. – P. 7438–7449.
222. Rahimi-Balaei M., Bergen H., Kong J., Marzban H. Neuronal Migration During Development of the Cerebellum // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – V. 12. – № 484. – P. 1–16.
223. Reddaway J. T., Doherty J. L., Lancaster T., Linden D., Walters J. T., Hall J. Genomic and imaging biomarkers in schizophrenia // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* – 2018. – V. 40. – P. 325–352.
224. Rees K., Halawa A., Consuegra-Garcia D., Golub V., Clossen B., Tan A., Montgomery K., Samba Reddy D., Griffith W., Winzer-Serhan U. Molecular, physiological and behavioral characterization of the heterozygous *Df[h15q13]/+* mouse model associated with the human 15q13.3 microdeletion syndrome // *Brain Res.* – 2020. – V. 1746. – № 147024. – P. 1–47.

225. Reid S. M., Meehan E. M., Reddihough D. S., Harvey A. R. Dyskinetic vs Spastic Cerebral Palsy: A Cross-sectional Study Comparing Functional Profiles, Comorbidities, and Brain Imaging Patterns // *J. Child Neurol.* – 2018. – V. 33. – № 9. – P. 593–600.
226. Rein B., Yan Z. 16p11.2 Copy Number Variations and Neurodevelopmental Disorders // *Trends Neurosci.* – 2020. – V. 43. – № 11. – P. 886–901.
227. Repnikova E. A., Lyalin D. A., McDonald K., Astbury C., Hansen-Kiss E., Cooley L. D., Pfau R., Herman G. E., Pyatt R. E., Hickey S. E. *CNTN6* copy number variations: Uncertain clinical significance in individuals with neurodevelopmental disorders // *Eur. J. Med. Genet.* – 2020. – V. 63. – № 1:103636. – P. 1–27.
228. Rigby M. J., Gomez T. M., Puglielli L. Glial Cell-Axonal Growth Cone Interactions in Neurodevelopment and Regeneration // *Front. Neurosci.* – 2020. – V. 14. – № 203. – P. 1–19.
229. Ritchie M., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C., Shi W., Smyth G. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 7:e47. – P. 1–13.
230. Rökman A., Baffoe-Bonnie A. B., Gillanders E., Fredriksson H., Autio V., Ikonen T., Gibbs K. D., Jones M. P., Gildea D., Freas-Lutz D., Markey C., Matikainen M. P., Koivisto P. A., Tammela T. L. J., Kallioniemi O. P., Trent J., Bailey-Wilson J. E., Schleutker J. Hereditary prostate cancer in Finland: Fine-mapping validates 3p26 as a major predisposition locus // *Hum. Genet.* 2005. – V. 116. – № 1–2. – P. 43–50.
231. Roller E., Ivakhno S., Lee S., Royce T., Tanner S. Canvas: versatile and scalable detection of copy number variants // *Bioinformatics.* – 2016. – V. 32. – № 15. – P. 2375–2377.
232. Royer-Bertrand B., Cisarova K., Superti-Furga A., Niel-Butschi F., Mittaz-Crettol L., Fodstad H. CNV Detection from Exome Sequencing Data in Routine Diagnostics of Rare Genetic Disorders: Opportunities and Limitations // *Genes (Basel).* – 2021. – V. 12. – № 9: 1427. – P. 1–14.
233. Sajan S. A., Jhangiani S. N., Muzny D. M., Gibbs R. A., Lupski J. R., Glaze D. G., Kaufmann W. E., Skinner S. A., Annese F., Friez M. J., Lane J., Percy A. K., Neul J. L. Enrichment of mutations in chromatin regulators in people with Rett syndrome lacking mutations in *MECP2* // *Genet. Med.* – 2017. – V. 19. – № 1. – P. 13–19.
234. Sajikumar S., Navakkode S., Sacktor T., Frey J. Synaptic tagging and cross-tagging: the role of protein kinase Mzeta in maintaining long-term potentiation but not long-term depression // *J. Neurosci.* – 2005. – V. 25. – № 24. – P. 5750–5756.
235. Sakurai K., Toyoshima M., Takeda Y., Shimoda Y., Watanabe K. Synaptic formation in subsets of glutamatergic terminals in the mouse hippocampal formation is affected by a

- deficiency in the neural cell recognition molecule NB-3. // *Neurosci. Lett.* – 2010. – V. 473. – № 2. – P. 102–106.
236. Sakurai K., Toyoshima M., Ueda H., Matsubara K., Takeda Y., Karagogeos D., Shimoda Y., Watanabe K. Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse // *Dev. Neurobiol.* – 2009. – V. 69. – № 12. – P. 811–824.
 237. Sala C., Verpelli C. Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability // Elsevier. – 2016. – P. 1–379.
 238. Salehi Karlslätt K., Pettersson M., Jäntti N., Szafranski P., Wester T., Husberg B., Ullberg U., Stankiewicz P., Nordgren A., Lundin J., Lindstrand A., Nordenskjöld A. Rare copy number variants contribute pathogenic alleles in patients with intestinal malrotation // *Mol. Genet. Genomic Med.* – 2019. – V. 7. – № 3:e549. – P. 1–9.
 239. Sanchez-Jimeno C., Blanco-Kelly F., López-Grondona F., Losada-Del Pozo R., Moreno B., Rodrigo-Moreno M., Martinez-Cayuelas E., Riveiro-Alvarez R., Fenollar-Cortés M., Ayuso C., de Alba M. R., Lorda-Sanchez I., Almoguera B. Attention Deficit Hyperactivity and Autism Spectrum Disorders as the Core Symptoms of AUTS2 Syndrome: Description of Five New Patients and Update of the Frequency of Manifestations and Genotype-Phenotype Correlation // *Genes (Basel)*. – 2021. – V. 12. – № 9:1360. – P. 1–10.
 240. Sanghvi H., Singh R., Morrin H., Rajkumar A. P. Systematic review of genetic association studies in people with Lewy body dementia // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* – 2020. – V. 35. – № 5. – P. 436–448.
 241. Santrač A., Batinić B., Stamenić T. T., Arandelović J., Sharmin D., Knutson D. E., Cook J. M., Savić M. M. Positive modulation of $\alpha 5$ GABAA receptors leads to dichotomous effects in rats on memory pattern and GABRA5 expression in prefrontal cortex and hippocampus // *Behav. Brain Res.* – 2022. – V. 416:113578. – P. 1–9.
 242. Saus E., Brunet A., Armengol L., Alonso P., Crespo J. M., Fernández-Aranda F., Guitart M., Martín-Santos R., Menchón J. M., Navinés R., Soria V., Torrens M., Urretavizcaya M., Vallès V., Gratacòs M., Estivill X. Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients // *J. Psychiatr. Res.* – 2010. – V. 44. – № 14. – P. 971–978.
 243. Schore A. N. All our sons: the developmental neurobiology and neuroendocrinology of boys at risk // *Infant Ment. Health J.* – 2017. – V. 38. – № 1. – P. 15–52.
 244. Schulte U., Thumfart J., Klöcker N., Sailer C., Bildl W., Biniossek M., Dehn D., Deller T., Eble S., Abbass K., Wangler T., Knaus H., Fakler B. The epilepsy-linked Lgi1 protein

- assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1 // *Neuron*. – 2006. – V. 49. – № 5. – P. 697–706.
245. Schwaibold E. M. C., Smogavec M., Hobbiebrunken E., Winter L., Zoll B., Burfeind P., Brockmann K., Pauli S. Intragenic duplication of *EHMT1* gene results in Kleefstra syndrome // *Mol. Cytogenet.* – 2014. – V. 7. – № 1:74. – P. 1–5.
 246. Scott D. A., Hernandez-Garcia A., Azamian M. S., Jordan V. K., Kim B. J., Starkovich M., Zhang J., Wong L. J., Darilek S. A., Breman A. M., Yang Y., Lupski J. R., Jiwani A. K., Das B., Lalani S. R., Iglesias A. D., Rosenfeld J. A., Xia F. Congenital heart defects and left ventricular non-compaction in males with loss-of-function variants in *NONO* // *J. Med. Genet.* – 2017. – V. 54. – № 1. – P. 47–53.
 247. Seigneur E., Wang J., Dai J., Polepalli J., Südhof T. C. T. Cerebellin-2 regulates a serotonergic dorsal raphe circuit that controls compulsive behaviors // *Mol. Psychiatry*. – 2021. – V. 26. – № 12. – P. 7509–7521.
 248. Shehhi M. Al, Forman E. B., Fitzgerald J. E., McInerney V., Krawczyk J., Shen S., Betts D. R., Ardle L. M., Gorman K. M., King M. D., Green A., Gallagher L., Lynch S. A. *NRXN1* deletion syndrome; phenotypic and penetrance data from 34 families // *Eur. J. Med. Genet.* – 2019. – V. 62. – № 3. – P. 204–209.
 249. Sheikh A. M., Li X., Wen G., Tauqeer Z., Brown W. T., Malik M. Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects. // *Neuroscience*. – 2010. – V. 165. – № 2. – P. 363–70.
 250. Shema R., Haramati S., Ron S., Hazvi S., Chen A., Sacktor T., Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex // *Science*. – 2011. – V. 331. – № 6021. – P. 1207–1210.
 251. Shimell J., Shah B., Cain S., Thouta S., Kuhlmann N., Tatarnikov I., Jovellar D., Brigidi G., Kass J., Milnerwood A., Snutch T., Bamji S. The X-Linked Intellectual Disability Gene *Zdhhc9* Is Essential for Dendrite Outgrowth and Inhibitory Synapse Formation // *Cell Rep.* – 2019. – V. 29. – № 8. – P. 2422–2437.
 252. Shimoda Y., Watanabe K. Contactins: Emerging key roles in the development and function of the nervous system // *Cell Adhes. Migr.* – 2009. – V. 3. – № 1. – P. 64–70.
 253. Shimojima K., Okumura A., Hayashi M., Kondo T., Inoue H., Yamamoto T. *CHCHD2* is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly // *Genomics*. – 2015. – V. 106. – № 4. – P. 196–203.
 254. Shnaider T. A., Pristiyazhnyuk I. E., Menzorov A. G., Matveeva N. M., Nikitina T. V., Khabarova A. A., Skryabin N. A., Kashevarova A. A., Lopatkina M. E., Nazarenko L. P., Lebedev I. N., Serov O.L. Generation of four iPSC lines from two siblings with a

- microdeletion at the *CNTN6* gene and intellectual disability // *Stem Cell Res.* – 2019. – V. 41. – № 101591. – P. 1–5.
255. Shoukier M., Klein N., Auber B., Wickert J., Schröder J., Zoll B., Burfeind P., Bartels I., Alsat E., Lingen M., Grzmil P., Schulze S., Keyser J., Weise D., Borchers M., Hobbiebrunken E., Röbl M., Gärtner J., Brockmann K., Zirn B. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: Are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? // *Clin. Genet.* – 2013. – V. 83. – № 1. – P. 53–65.
 256. Shuvalova L. D., Davidenko A. V., Ereemeev A. V., Khomyakova E. A., Zerkalenkova E. A., Lebedeva O. S., Bogomazova A. N., Klyushnikov S. A., Illarioshkin S. N., Lagarkova M. A. Generation of induced pluripotent stem cell line RCPCMi008-A derived from patient with spinocerebellar ataxia 17 // *Stem Cell Res.* – 2021. – V. 54. – № 102431. – P. 1–4.
 257. Singh V., van Pelt E. D., Stoop M. P., Stingl C., Ketelslegers I. A., Neuteboom R. F., Berrevoets C. E. C., Luiders T. M., Hintzen R. Q. Gray matter-related proteins are associated with childhood-onset multiple sclerosis // *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation.* – 2015. – V. 2. – № 5:e155. – P. 1–10.
 258. Stankiewicz P., Lupski J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. // *Trends Genet.* – 2002. – V. 18. – № 2. – P. 74–82.
 259. Stogmann E., Reinthaler E., Eltawil S., el Etribi M. A., Hemeda M., el Nahhas N., Gaber A. M., Fouad A., Edris S., Benet-Pages A., Eck S. H., Pataria E., Mei D., Brice A., Lesage S., Guerrini R., Zimprich F., Strom T. M., Zimprich A. Autosomal Recessive Cortical Myoclonic Tremor and Epilepsy: Association with a Mutation in the Potassium Channel Associated Gene *CNTN2* // *Brain.* – 2013. – V. 136 (Pt 4). – P. 1155–1160.
 260. Südhof T. C. Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits // *Cell.* – 2017. – V. 171. – № 4. – P. 745–769.
 261. Südhof T. C. The cell biology of synapse formation // *J. Cell Biol.* – 2021. – V. 220. – № 7:e202103052. – P. 1–18.
 262. Sun A. X., Yuan Q., Fukuda M., Yu W., Yan H., Lim G. G. Y., Nai M. H., D'Agostino G. A., Tran H. D., Itahana Y., Wang D., Lokman H., Itahana K., Lim S. W. L., Tang J., Chang Y. Y., Zhang M., Cook S. A., Rackham O. J. L., Lim C. T., Tan E. K., Ng H. H., Lim K. L., Jiang Y.-H., Je H. S. Potassium channel dysfunction in human neuronal models of Angelman syndrome // *Science.* – 2019. – V. 366. – № 6472. – P. 1486–1492.
 263. Sytnyk V., Leshchyns'ka I., Schachner M. Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function // *Trends Neurosci.* – 2017. – V. 40. – № 5. – P. 295–308.

264. Szatmari P., Paterson A. D., Zwaigenbaum L., Autism Genome Project Consortium, Szatmari P., Paterson A. D., Zwaigenbaum L., Roberts W., Brian J., Liu X.-Q., Vincent J. B., Skaug J. L., Thompson A. P., Senman L., Feuk L., Qian C., Bryson S. E., Jones M. B., Marshall C. R., Scherer S. W., Vieland V. J., Bartlett C., Mangin L. V., Goedken R., Segre A., Pericak-Vance M. A., Cuccaro M. L., Gilbert J. R., Wright H. H., Abramson R. K., Betancur C., Bourgeron T., Gillberg C., Leboyer M., Buxbaum J., Davis K. L., Hollander E., Silverman J. M., Hallmayer J., Lotspeich L., Sutcliffe J. S., Haines J. L., Folstein S. E., Piven J., Wassink T. H., Sheffield V., Geschwind D. H., Bucan M., Brown W. T., Cantor R. M., Constantino J. N., Gilliam T. C., Herbert M., Lajonchere C., Ledbetter D. H., Lese-Martin C., Miller J., Nelson S., Samango-Sprouse C. A., Spence S., State M., Tanzi R. E., Coon H., Dawson G., Devlin B., Estes A., Flodman P., Klei L., McMahon W. M., Minshew N., Munson J., Korvatska E., Rodier P. M., Schellenberg G. D., Smith M., Spence M. A., Stodgell C., Tepper P. G., Wijsman E. M., Yu C.-E., Rogé B., Mantoulou C., Wittmeyer K., Poustka A., Felder B., Klauck S. M., Schuster C., Poustka F., Bölte S., Feineis-Matthews S., Herbrecht E., Schmötzer G., Tsiantis J., Papanikolaou K., Maestrini E., Bacchelli E., Blasi F., Carone S., Toma C., van Engeland H., de Jonge M., Kemner C., Koop F., Langemeijer M., Hijmans C., Staal W. G., Baird G., Bolton P. F., Rutter M. L., Weisblatt E., Green J., Aldred C., Wilkinson J.-A., Pickles A., Couteur A. L., Berney T., McConachie H., Bailey A. J., Francis K., Honeyman G., Hutchinson A., Parr J. R., Wallace S., Monaco A. P., Barnby G., Kobayashi K., Lamb J. A., Sousa I., Sykes N., Cook E. H., Guter S. J., Leventhal B. L., Salt J., Lord C., Corsello C., Hus V., Weeks D. E., Volkmar F., Tauber M., Fombonne E., Shih A. Meyer K. J. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements // *Nat. Genet.* – 2007. – V. 39. – № 3. – P. 319–328.
265. Tadaki H., Saitsu H., Kanegane H., Miyake N., Imagawa T., Kikuchi M., Hara R., Kaneko U., Kishi T., Miyamae T., Nishimura A., Doi H., Tsurusaki Y., Sakai H., Yokota S., Matsumoto N. Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa // *Int. J. Immunogenet.* – 2011. – V. 38. – № 4. – P. 287–293.
266. Tai D. J. C., Ragavendran A., Manavalan P., Stortchevoi A., Seabra C. M., Erdin S., Collins R. L., Blumenthal I., Chen X., Shen Y., Sahin M., Zhang C., Lee C., Gusella J. F., Talkowski M. E. Engineering microdeletions and microduplications by targeting segmental duplications with CRISPR // *Nat. Neurosci.* – 2016. – V. 19. – № 3. – P. 517–522.
267. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 861–872.

268. Takeda Y., Akasaka K., Lee S., Kobayashi S., Kawano H., Murayama S., Takahashi N., Hashimoto K., Kano M., Asano M., Sudo K., Iwakura Y., Watanabe K. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup // *J. Neurobiol.* – 2003. – V. 56. – № 3. – P. 252–265.
269. Takumi T., Tamada K. CNV biology in neurodevelopmental disorders // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2018. – V. 48. – P. 183–192.
270. Tan R. P. A., Leshchyns'Ka I., Sytnyk V. Glycosylphosphatidylinositol-anchored immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules and their role in neuronal development and synapse regulation // *Front. Mol. Neurosci.* – 2017. – V. 10. – № 378. – P. 1–16.
271. Tanaka K., Besson V., Rivagorda M., Oury F., Marazzi G., Sassoon D. A. Paternally expressed gene 3 (*Pw1/Peg3*) promotes sexual dimorphism in metabolism and behavior // *PLoS Genet.* – 2022. – V. 18. – № 1:e1010003. – P. 1–23.
272. Tang L., Huang Q., Qin Z., Tang X. Distinguish CIDP with autoantibody from that without autoantibody: pathogenesis, histopathology, and clinical features // *J. Neurol.* – 2020. – V. 268. – № 8. – P. 2757–2768.
273. Tang W., Teichert M., Chasman D. I., Heit J. A., Morange P. E., Li G., Pankratz N., Leebeek F. W., Paré G., de Andrade M., Tzourio C., Psaty B. M., Basu S., Ruiter R., Rose L., Armasu S. M., Lumley T., Heckbert S. R., Uitterlinden A. G., Lathrop M., Rice K. M., Cushman M., Hofman A., Lambert J.-C., Glazer N. L., Pankow J. S., Witteman J. C., Amouyel P., Bis J. C., Bovill E. G., Kong X., Tracy R. P., Boerwinkle E., Rotter J. I., Trégouët D.-A., Loth D. W., Stricker B. H. Ch., Ridker P. M., Folsom A. R., Smith N. L. A Genome-Wide Association Study for Venous Thromboembolism: The Extended Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium // *Genet. Epidemiol.* – 2013. – V. 37. – № 5. – P. 512–521.
274. Tao W., Díaz-Alonso J., Sheng N., Nicoll R. Postsynaptic $\delta 1$ glutamate receptor assembles and maintains hippocampal synapses via *Cbln2* and neurexin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2018. – V. 115. – № 23. – P. 5373–5381.
275. Tărlungeanu D. C., Novarino G. Genomics in neurodevelopmental disorders: an avenue to personalized medicine // *Exp. Mol. Med.* – 2018. – V. 50. – № 8. – P. 1–7.
276. Tassano E., Uccella S., Giacomini T., Severino M., Fiorio P., Gimelli G., Ronchetto P. Clinical and Molecular Characterization of Two Patients with *CNTN6* Copy Number Variations // *Cytogenet. Genome Res.* – 2018. – V. 156. – № 3. – P. 144–149.
277. Taylor A. I. Autosomal trisomy syndromes: a detailed study of 27 cases of Edwards' syndrome and 27 cases of Patau's syndrome. // *J. Med. Genet.* – 1968. – V. 5. – № 3. – P. 227–252.

278. Taylor S. C., Ferri S. L., Grewal M., Smernoff Z., Bucan M., Weiner J. A., Abel T., Brodtkin E. S. The Role of Synaptic Cell Adhesion Molecules and Associated Scaffolding Proteins in Social Affiliative Behaviors // *Biol. Psychiatry*. – 2020. – V. 88. – № 6. – P. 442–451.
279. Tejada M. I., Elcoroaristizabal X., Ibarluzea N., Botella M. P., de la Hoz A. B., Ocio I. A novel nonsense homozygous variant in the *NLGN1* gene found in a pair of monozygotic twin brothers with intellectual disability and autism // *Clin. Genet*. – 2019. – V. 95. – № 2. – P. 339–340.
280. Terauchi A., Johnson-Venkatesh E., Toth A., Javed D., Sutton M., Umemori H. Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses // *Nature*. – 2010. – V. 465. – № 7299. – P. 783–787.
281. Terauchi A., Timmons K., Kikuma K., Pechmann Y., Kneussel M., Umemori H. Selective synaptic targeting of the excitatory and inhibitory presynaptic organizers FGF22 and FGF7 // *J. Cell Sci*. – 2015. – V. 128. – № 2. – P. 281–292.
282. Thapar A. Discoveries on the genetics of ADHD in the 21st century: New findings and their implications // *Am. J. Psychiatry*. – 2018. – V. 175. – № 10. – P. 943–950.
283. Thevenon J., Lopez E., Keren B., Heron D., Mignot C., Altuzarra C., Béri-Dexheimer M., Bonnet C., Magnin E., Burglen L., Minot D., Vigneron J., Morle S., Anheim M., Charles P., Brice A., Gallagher L., Amiel J., Haffen E., Mach C., Depienne C., Doummar D., Bonnet M., Duplomb L., Carmignac V., Callier P., Marle N., Mosca-Boidron A.-L., Roze V., Aral B., Razavi F., Jonveaux P., Faivre L., Thauvin-Robinet C. Intragenic *CAMTA1* rearrangements cause non-progressive congenital ataxia with or without intellectual disability // *J. Med. Genet*. – 2012. – V. 49. – № 6. – P. 400–408.
284. Thygesen J. H., Wolfe K., McQuillin A., Viñas-Jornet M., Baena N., Brison N., D'Haenens G., Esteba-Castillo S., Gabau E., Ribas-Vidal N., Ruiz A., Vermeesch L., Weyts E., Novell R., van Buggenhout G., Strydom A., Bass N., Guitart M., Vogels A. Neurodevelopmental risk copy number variants in adults with intellectual disabilities and comorbid psychiatric disorders // *Br. J. Psychiatry*. – 2018. – V. 212. – № 5. – P. 287–294.
285. Torres F., Barbosa M., Maciel P. Recurrent copy number variations as risk factors for neurodevelopmental disorders: Critical overview and analysis of clinical implications // *J. Med. Genet*. – 2015. – V. 53. – № 2. – P. 73–90.
286. Truty R., Paul J., Kennemer M., Lincoln S. E., Olivares E., Nussbaum R. L., Aradhya S. Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes // *Genet. Med*. – 2019. – V. 21. – № 1. – P. 114–123.

287. Tsuboyama M., Iqbal M. A. *CHL1* deletion is associated with cognitive and language disabilities - Case report and review of literature // *Mol. Genet. genomic Med.* – 2021. – V. 9. – № 7:e1725. – P. 1–7.
288. Turner T. N., Eichler E. E. The Role of *De Novo* Noncoding Regulatory Mutations in Neurodevelopmental Disorders // *Trends Neurosci.* – 2019. – V. 42. – № 2. – P. 115–127.
289. Turpin W., Espin-Garcia O., Xu W., Silverberg M. S., Kevans D., Smith M. I., Guttman D. S., Griffiths A., Panaccione R., Otley A., Xu L., Shestopaloff K., Moreno-Hagelsieb G., Paterson A. D., Croitoru K. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort // *Nat. Genet.* – 2016. – V. 48. – № 11. – P. 1413–1417.
290. Ulfarsson M. O., Walters G. B., Gustafsson O., Steinberg S., Silva A., Doyle O. M., Brammer M., Gudbjartsson D. F., Arnarsdottir S., Jonsdottir G. A., Gisladdottir R. S., Bjornsdottir G., Helgason H., Ellingsen L. M., Halldorsson J. G., Saemundsen E., Stefansdottir B., Jonsson L., Eiriksdottir V. K., Johannesdottir G. H., Unnsteinsdottir U., Jonsdottir B., Magnusdottir B. B., Sulem P., Thorsteinsdottir U., Sigurdsson E., Brandeis D., Meyer-Lindenberg A., Stefansson H., Stefansson K. 15q11.2 CNV affects cognitive, structural and functional correlates of dyslexia and dyscalculia // *Transl. Psychiatry.* – 2017. – V. 7. – № 4:e1109. – P. 1–8.
291. Ustyantseva E. I., Medvedev S. P., Vetchinova A. S., Illarioshkin S. N., Leonov S. V., Zakian S. M. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi014-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with homozygous D90A mutation in *SOD1* causing Amyotrophic lateral sclerosis // *Stem Cell Res.* – 2020. – V. 42. – № 101675. – P. 1–4.
292. Valbonesi S., Magri C., Traversa M., Faraone S. V., Cattaneo A., Milanesi E., Valenti V., Gennarelli M., Scassellati C. Copy number variants in attention-deficit hyperactive disorder: identification of the 15q13 deletion and its functional role. // *Psychiatr. Genet.* – 2015. – V. 25. – № 2. – P. 59–70.
293. Vasilyev S. A., Skryabin N. A., Kashevarova A. A., Tolmacheva E. N., Savchenko R. R., Vasilyeva O. Y., Lopatkina M. E., Zarubin A. A., Fishman V. S., Belyaeva E. O., Filippova M. O., Shorina A. R., Maslennikov A. B., Shestovskikh O. L., Gayner T. A., Čulić V., Vulić R., Nazarenko L. P., Lebedev I. N. Differential DNA Methylation of the *IMMP2L* Gene in Families with Maternally Inherited 7q31.1 Microdeletions is Associated with Intellectual Disability and Developmental Delay // *Cytogenet. Genome Res.* – 2021. – V. 161. – № 3–4. – P. 105–119.
294. Vicari S., Napoli E., Cordeddu V., Menghini D., Alesi V., Loddo S., Novelli A., Tartaglia M. Copy number variants in autism spectrum disorders // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* – 2019. – V. 92. – P. 421–427.

295. Vigont V. A., Grekhnev D. A., Lebedeva O. S., Gusev K. O., Volovikov E. A., Skopin A. Y., Bogomazova A. N., Shuvalova L. D., Zubkova O. A., Khomyakova E. A., Glushankova L. N., Klyushnikov S. A., Illarioshkin S. N., Lagarkova M. A., Kaznacheyeva E. V. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease // *Front. cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. – № 625231. – P. 1–13.
296. Vissers L. E. L. M., Gilissen C., Veltman J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders // *Nat. Rev. Genet.* – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 9–18.
297. Waggoner D., Wain K. E., Dubuc A. M., Conlin L., Hickey S. E., Lamb A. N., Martin C. L., Morton C. C., Rasmussen K., Schuette J. L., Schwartz S., Miller D. T. Yield of additional genetic testing after chromosomal microarray for diagnosis of neurodevelopmental disability and congenital anomalies: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) // *Genet. Med.* – 2018. – V. 20. – № 10. – P. 1105–1113.
298. Wakil S. M., Ram R., Muiya N. P., Andres E., Mazhar N., Hagos S., Alshahid M., Meyer B. F., Morahan G., Dzimir N. A common variant association study reveals novel susceptibility loci for low HDL-cholesterol levels in ethnic Arabs // *Clin. Genet.* – 2016. – V. 90. – № 6. – P. 518–525.
299. Wang D., Zhang J., Jiang W., Cao Z., Zhao F., Cai T., Aschner M., Luo W. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability // *Autophagy.* – 2017. – V. 13. – № 5. – P. 914–927.
300. Wang J., Song J., Gao Z., Huo X., Zhang Y., Wang W., Qi J., Zheng S. Analysis of gene expression profiles of non-small cell lung cancer at different stages reveals significantly altered biological functions and candidate genes // *Oncol. Rep.* – 2017. – V. 37. – № 3. – P. 1736–1746.
301. Wang K., Zhang H., Bloss C. S., Duvvuri V., Kaye W., Schork N. J., Berrettini W., Hakonarson H., Price Foundation Collaborative Group. A genome-wide association study on common SNPs and rare CNVs in anorexia nervosa // *Mol. Psychiatry.* – 2011. – V. 16. – № 9. – P. 949–959.
302. Wang L.-J., Wu C.-C., Lee M.-J., Chou M.-C., Lee S.-Y., Chou W.-J. Peripheral Brain-Derived Neurotrophic Factor and Contactin-1 Levels in Patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder // *J. Clin. Med.* – 2019. – V. 8. – № 9:1366. – P. 1–10.
303. Wang L.S., Hranilovic D., Wang K., Lindquist I. E., Yurcaba L., Petkovic Z.-B., Gidaya N., Jernej B., Hakonarson H., Bucan M. Population-based study of genetic variation in

- individuals with autism spectrum disorders from Croatia // *BMC Med. Genet.* – 2010. – V. 11. – № 1. – P. 9–13.
304. Watson C. T., Tomas M.-B., Sharp A. J., Mefford H. C. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2014. – V. 15. – № 1. – P. 215–244.
 305. Weehi L. Te, Maikoo R., Mc Cormack A., Mazzaschi R., Ashton F., Zhang L., George A. M., Love D. R. Microduplication of 3p26.3 Implicated in Cognitive Development // *Case Rep. Genet.* – 2014. – V. 2014. – № 295359 – P. 1–6.
 306. Wei H., Alberts I., Li X. The apoptotic perspective of autism // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2014. – V. 36. – P. 13–18.
 307. Weiss L., Arking D., Daly M., Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism // *Nature.* – 2009. – V. 461. – № 7265. – P. 802–808.
 308. Werling D. M. Clinically Defined Subtypes of Bipolar Disorder Are Reflected in Genomic Architecture // *Biol. Psychiatry.* – 2019. – V. 86. – № 2. – P. 78–80.
 309. Whiteley J. T., Fernandes S., Sharma A., Mendes A. P. D., Racha V., Benassi S. K., Marchetto M. C. Reaching into the toolbox: Stem cell models to study neuropsychiatric disorders // *Stem cell reports.* – 2022. – V. 17. – № 2. – P. 187–210.
 310. Xu R., Brawner A. T., Li S., Liu J. J., Kim H., Xue H., Pang Z. P., Kim W. Y., Hart R. P., Liu Y., Jiang P. OLIG2 Drives Abnormal Neurodevelopmental Phenotypes in Human iPSC-Based Organoid and Chimeric Mouse Models of Down Syndrome // *Cell Stem Cell.* – 2019. – V. 24. – № 6. – P. 908–926.
 311. Yamanaka S. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells // *Cell Stem Cell.* – 2007. – V. 1. – № 1. – P. 39–49.
 312. Yang T.-L., Hao R.-H., Guo Y., Papasian C. J., Deng H. W. Copy Number Variation // *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease.* – 2018. – P. 43–54.
 313. Ye H., Tan Y. L. J., Ponniah S., Takeda Y., Wang S. Q., Schachner M., Watanabe K., Pallen C. J., Xiao Z. C. Neural recognition molecules CHL1 and NB-3 regulate apical dendrite orientation in the neocortex via PTP α // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – № 1. – P. 188–200.
 314. Ye H., Zhao T., Tan Y. L. J., Liu J., Pallen C. J., Xiao Z.-C. C. Receptor-like protein-tyrosine phosphatase α enhances cell surface expression of neural adhesion molecule NB-3 // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – № 29. – P. 26071–26080.
 315. Yefroyev D. A., Jin S. Induced Pluripotent Stem Cells for Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases // *Biomedicines.* – 2022. – V. 10. – № 2:208. – P. 1–16.

316. Zahumenska R., Nosal V., Smolar M., Okajcekova T., Skovierova H., Strnadel J., Halasova E. Induced Pluripotency: A Powerful Tool for *In Vitro* Modeling // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – № 23. – P. 1–19.
317. Zarrei M., Burton C. L., Engchuan W., Young E. J., Higginbotham E. J., MacDonald J. R., Trost B., Chan A. J. S., Walker S., Lamoureux S., Heung T., Mojarad B. A., Kellam B., Paton T., Faheem M., Miron K., Lu C., Wang T., Samler K., Wang X., Costain G., Hoang N., Pellecchia G., Wei J., Patel R. V., Thiruvahindrapuram B., Roifman M., Merico D., Goodale T., Drmic I., Speevak M., Howe J. L., Yuen R. K. C., Buchanan J. A., Vorstman J. A. S., Marshall C. R., Wintle R. F., Rosenberg D. R., Hanna G. L., Woodbury-Smith M., Cytrynbaum C., Zwaigenbaum L., Elsabbagh M., Flanagan J., Fernandez B. A., Carter M. T., Szatmari P., Roberts W., Lerch J., Liu X., Nicolson R., Georgiades S., Weksberg R., Arnold P. D., Bassett A. S., Crosbie J., Schachar R., Stavropoulos D. J., Anagnostou E., Scherer S. W. A large data resource of genomic copy number variation across neurodevelopmental disorders // *NPJ Genomic Med.* – 2019. – V. 4. – № 26. – P. 1–13.
318. Zeitouni B., Boeva V., Janoueix-Lerosey I., Loeillet S., Legoix-né P., Nicolas A., Delattre O., Barillot E. SVDetect: a tool to identify genomic structural variations from paired-end and mate-pair sequencing data // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – № 15. – P. 1895–1896.
319. Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges // *Hum Mol Genet.* – 2014. – V. 23. – № R1. – P. 40–46.
320. Zhang R., Hao L., Wang L., Chen M., Li W., Li R., Yu J., Xiao J., Wu J. Gene expression analysis of induced pluripotent stem cells from aneuploid chromosomal syndromes // *BMC Genomics.* – 2013. – V. 14 (Suppl 5). – № S8. – P. 1–13.
321. Zhang X., Zhu J., Yang G., Wang Q., Qian L., Chen Y., Chen F., Tao Y., Hu H., Wang T., Luo Z. Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – № 7. – P. 743–754.
322. Zhang Y., Pak C. H., Han Y., Ahlenius H., Zhang Z., Chanda S., Marro S., Patzke C., Acuna C., Covy J., Xu W., Yang N., Danko T., Chen L., Wernig M., Südhof T. C. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells // *Neuron.* – 2013. – V. 78. – № 5. – P. 785–798.
323. Zhao X., Bhattacharyya A. Human Models Are Needed for Studying Human Neurodevelopmental Disorders // *Am. J. Hum. Genet.* – 2018. – V. 103. – № 6. – P. 829–857.
324. Zhong X., Drgonova J., Li C. Y., Uhl G. R. Human cell adhesion molecules: Annotated functional subtypes and overrepresentation of addiction-associated genes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2015. – V. 1349. – № 1. – P. 83–95.

325. Zhu L., Sun H., Tian G., Wang J., Zhou Q., Liu P., Tang X., Shi X., Yang L., Liu G. Development and validation of a risk prediction model and nomogram for colon adenocarcinoma based on methylation-driven genes // *Aging (Albany, NY)*. – 2021. – V. 13. – № 12. – P. 16600–16619.
326. Zhuo C., Hou W., Lin C., Hu L., Li J. Potential value of genomic copy number variations in schizophrenia // *Front. Mol. Neurosci.* – 2017. – V. 10. – № 204. – P. 1–9.
327. Zuko A., Bouyain S., van der Zwaag B., Burbach J. P. H. Contactins: Structural aspects in relation to developmental functions in brain disease // *Adv Protein Chem Struct Biol.* – 2011. – V. 84. – P. 143–180.
328. Zuko A., Kleijer K. T. E. E., Oguro-Ando A., Kas M. J. H. H., van Daalen E., van der Zwaag B., Burbach J. P. H. Contactins in the neurobiology of autism // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 719. – № 1–3. – P. 63–74.
329. Zuko A., Oguro-Ando A., van Dijk R., Gregorio-Jordan S., van der Zwaag B., Burbach J. P. H. Developmental role of the cell adhesion molecule Contactin-6 in the cerebral cortex and hippocampus // *Cell Adhes. Migr.* – 2016. – V. 10. – № 4. – P. 378–392.
330. Zuko A., Oguro-Ando A., Post H., Taggenbrock R. L. R. E., van Dijk R. E., Altelaar M. A. F., Heck A. J. R., Petrenko A. G., van der Zwaag B., Shimoda Y., Pasterkamp R. J., Burbach J. P. H. Association of cell adhesion molecules contactin-6 and latrophilin-1 regulates neuronal apoptosis // *Front. Mol. Neurosci.* – 2016. – V. 9. – № 143. – P. 1–16.

Интернет-ресурсы:

331. База данных геномных вариантов [Электронный ресурс] : Database of Genomic Variants. URL: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (дата обращения: 30.03.2022).
332. Геномный браузер Ensembl [Электронный ресурс] : Ensembl genome browser. URL: <https://uswest.ensembl.org/index.html> (дата обращения: 12.02.2022).
333. Инструмент для подбора праймеров [Электронный ресурс] : Primer designing tool – NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 30.03.2022).
334. Инструмент для подбора праймеров [Электронный ресурс] : Primer3 tool. URL: <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> (дата обращения: 14.02.2022).
335. Инструмент для проведения анализа обогащения Webgestalt [Электронный ресурс] : WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit. URL: <http://www.webgestalt.org/> (дата обращения: 24.04.2022).
336. База данных STRING [Электронный ресурс] : STRING database. URL: <https://string-db.org/> (дата обращения: 25.03.2022).

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
1	Схематичное изображение образования рекуррентных микроструктурных аберраций в области сегментных дупликаций по механизму NAHR. Черным цветом обозначены хромосомы, желтыми стрелками – области низкокопийных повторов [Stankiewicz, Lupski, 2002].	18
2	Основные симптомы и ассоциированные неврологические и системные нарушения у пациентов с PAC [https://www.clinicbarcelona.org]	23
3	Схематичное представление аддитивной, доминантной и U-образной моделей реализации фенотипических эффектов реципрокных CNV [Deshpande, Weiss, 2018].	25
4	Структура молекул CNTN4, CNTN5, CNTN6 [Zuko et al., 2013]. «ПМ» - плазматическая мембрана.	35
5	Молекулярные партнеры молекулы CNTN6: CHL1 и протеин-тирозинфосфатаза α (А), рецепторная протеин-тирозинфосфатаза γ (Б), молекула NOTCH1 (В) [Bouyain, Watkins, 2010; Cui et al., 2004; Ye et al., 2008]	38
6	Нейроны, полученные из ИПСК пациента, страдающего болезнью Паркинсона, иммуноцитохимическая реакция, продукт экспрессии зеленого цвета, ядра клеток окрашены DAPI в синий цвет: β -3-тубулин (А); тирозин-гидроксилаза (Б) [Некрасов и др., 2011]	49
7	Изменение экспрессии генов в фибробластах с трисомией 21 в сравнении с контрольной группой клеток. Цифрами обозначены номера хромосом. Домены гиперэкспрессирующихся генов обозначены темно-синим цветом, домены гипоекспрессирующихся генов – светло-голубым [Letourneau et al., 2014]	51
8	Схема исследования. Слева римскими цифрами обозначены этапы работы. Цифрой «0» обозначен задел настоящей работы. Справа указаны методы, которые были использованы на соответствующем этапе работы	58
9	Исследование семьи Ф. (А) Фенотип сибсов Ф1 и Ф2; (Б)	61

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
	Родословная семьи Ф.; (В) Подтверждение микроделеции 3p26.3 (<i>CNTN6</i>) у сибсов с помощью qPCR; (Г) – Гибридизационный профиль хромосомы 3 с делецией региона 3p26.3 (приведены результаты aCGH для пациента Ф1; профиль хромосомы 3 второго сибса аналогичен данному). Приведены рисунки из статьи Kashevarova et al. (2014)	
10	Исследование семьи К (А) Фенотип пациента К; (Б) родословная семьи К (серым обозначены члены семьи – бессимптомные носители микродупликации <i>CNTN6</i>); (В) подтверждение микродупликации 3p26.3 (<i>CNTN6</i>) у пробанда (III-1) и его отца (II-2) с помощью qPCR; (Г) Гибридизационный профиль хромосомы 3 с дупликацией региона 3p26.3. Приведены рисунки из статьи Kashevarova et al. (2014)	62
11	Этапы матричной сравнительной геномной гибридизации	67
12	Оценка мечения ДНК с помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000»	69
13	Внесение направленной мутации в ген <i>CNTN6</i> . Сверху: эндогенный аллель гена <i>CNTN6</i> человека. Показаны первый нетранслируемый экзон (Ex1) и второй экзон (Ex2) гена <i>CNTN6</i> человека. Специфичная последовательность gRNA-CNTN6, включающая старт кодон ATG в виде выноски. Стрелка указывает место внесения в геном двухцепочечного разрыва системой CRISPR/Cas9. Снизу: вектор pCNTN6_Arms_GFP, содержащий кодирующую часть гена GFP и сигнал терминации трансляции (стоп-кодон), фланкированный участками, гомологичными геномной ДНК человека (участки гомологии обозначены символом «X»)	73
14	Дизайн эксперимента по направленной дифференцировке линий ИПСК в нейроны. (А) Дизайн лентивирусных векторов, использованных для индукции дифференцировки ИПСК в нейроны; (Б) Схема эксперимента по индуцированной нейральной дифференцировке ИПСК с указанием состава сред и добавок	74
15	Этапы транскриптомного анализа на микрочипах	76

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
16	Оценка целостности РНК с помощью биоанализатора «Agilent 2100 Bioanalyzer» (Agilent Technologies, США)	77
17	Оценка качества мечения кРНК с помощью спектрофотометра «NanoDrop 8000»	80
18	Соотношение частоты микроделений и микродупликаций гена <i>CNTN6</i> в группе пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов; * – точный критерий Фишера ($p = 0,0372$)	88
19	Происхождение перестройки у 100 описанных в литературе случаев микроделений и микродупликаций гена <i>CNTN6</i>	89
20	Делеция 14q22.3 в фибробластах пациента Ф1 с недифференцированной УО, являющегося носителем микроделеции 3p26.3	90
21	Нормальная копияность локуса 14q22.3 у пациента Ф1 с микроделением 3p26.3 и его сестры Ф2 по результатам qPCR; оранжевым и желтым показаны результаты qPCR с праймерами на ген <i>LGALS3</i> и <i>TBPL2</i> , соответственно; «фибр.» – фибробласты; «лимф.» - лимфоциты	91
22	Дупликация 16p13.3–13.2 в фибробластах пациента К с недифференцированной УО, являющегося носителем микродупликации 3p26.3	91
23	Нормальная копияность локуса 16p13.3–13.2 у пациента К с микродупликацией 3p26.3 и его родственников по данным ПЦР в режиме реального времени; «фибр.» – фибробласты; «лимф.» - лимфоциты	92
24	Тандемная дупликация <i>CNTN6</i> на хромосоме 3 в фибробластах кожи пациента К	93
25	Наличие делеции гена <i>CNTN6</i> в линиях ИПСК (iTAF3) пациента Ф1 по данным qPCR; Контроль – линия ИПСК, полученная из фибробластов здорового донора с нормальным кариотипом (iTAF2); красной пунктирной линией показана верхняя граница для	94

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
	идентификации микроделеции	
26	Микродупликация 3p26.3 в линиях ИПСК по данным aCGH-анализа	96
27	Вариабельность числа копий <i>CNTN6</i> в линиях ИПСК (iTAF4) пациента с микродупликацией 3p26.3 по данным qPCR; Контроль – линия ИПСК, полученная из фибробластов здорового донора с нормальным кариотипом (iTAF2); пунктирной линией показана нижняя граница для идентификации микродупликации; «фибр.» – фибробласты	96
28	Иммунофлуоресцентный анализ транскрипционных факторов OCT4 и SOX2 и поверхностных антигенов TRA1-60 и SSEA-4 в клетках линии iTAF3-37. Позитивные клетки по данным маркерам окрашиваются в красный цвет. Ядра клеток дополнительно окрашены DAPI (синий цвет)	100
29	Эмбрионидные тельца, сформированные из клеток ИПСК линии iTAF3-37 с микроделецией 3p26.3, захватывающей ген <i>CNTN6</i>	101
30	Анализ субклонов ИПСК человека, полученных после трансфекции векторами системы CRISPR/Cas9; (А) ПЦР-анализ фрагмента гена <i>CNTN6</i> в клонах серии С9 и исходной линии ИПСК iTAF3del17. Изменение подвижности ПЦР продукта в клонах, отмеченных стрелкой, свидетельствует о возникновении мутаций в исследуемом гене; (Б) Результаты секвенирования фрагмента экзона 2 гена <i>CNTN6</i> в клонах С9-8 и С9-11. Возникшие адресные делеции (отмечены красным цветом) гена <i>CNTN6</i> приводят к либо к элиминации стартового кодона в клоне С9-11, либо к сдвигу рамки считывания в клоне С9-8. Рамкой выделен стартовый кодон ATG	104
31	Динамика дифференцировки в нейроны ИПСК линии iTAF1-25 с нормальным числом копий гена <i>CNTN6</i> на 3-й, 7-й и 26-й дни после индукции форсированной экспрессии экзогенного транскрипционного фактора Ngn2; (Б) Дифференцировка ИПСК линии iTAF4-22 с дупликацией гена <i>CNTN6</i> на 3-й, 15-й и 26-й дни. Клетки, в которые произошла встройка вводимых генетических конструкций, прижизненно маркированы зеленым флуоресцентным	106

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
	белком (EGFP)	
32	Иммунофлуоресцентный анализ на бета-тубулин 3 клеток линии iTAF4-24 на 2-й (А), 3-й (Б), 7-й (В) и 22-й (Г) дни после индукции дифференцировки в нейроны с помощью форсированной экспрессии Ngn2. Красный цвет – окрашивание клеток с использованием антител против бета-тубулина 3 (bTubb3); синий цвет – окрашивание ДНК ядер клеток DAPI. Клетки, в которые произошла встройка вводимых генетических конструкций, прижизненно маркированы зеленым флуоресцентным белком (EGFP). Хорошо видна сеть нейронов, позитивных по бета-тубулину 3 (нижний ряд)	107
33	Маркеры зрелых нейронов NF-H, MAP2 и SYP в нейронах, полученных после 25 дней дифференцировки ИПСК iTAF4-22 и iTAF4-14 с дупликацией гена <i>CNTN6</i> . (А) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против нейрофиламента (NF-H), дифференцировка в нейроны линии iTAF4-22; (Б) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против MAP2, дифференцировка в нейроны линии iTAF4-14; (В) Окрашивание (красный цвет) с использованием антител против синаптофизина (SYP), дифференцировка в нейроны линии iTAF4-14; синий цвет – ядра клеток, окрашенные DAPI; зеленый цвет – флуоресценция зеленого белка указывает на экспрессию гена <i>EGFP</i> в трансдуцированных клетках	108
34	Электрофизиологические характеристики нейрона, полученного на 45-й день нейрональной дифференцировки ИПСК линии iTAF1-36 с нормальным числом копий гена <i>CNTN6</i> (1) и iTAF4-14 с дупликацией гена <i>CNTN6</i> (2). (А) Флуоресцентное изображение нейрона, полученного в результате дифференцировки линии ИПСК iTAF1-36 и iTAF4-14. (Б, В) Записи токов этого нейрона. Хорошо виден высокоамплитудный натриевый ток отрицательной направленности (Б) и потенциал действия при подаче стимула амплитудой 100 пкА длительностью 100 мсек (В)	109
35	(А) Диаграмма рассеяния PCA. Первая (PC1) и вторая главные	110

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
	компоненты (PC2) объясняют 33 % и 15 % общей дисперсии, соответственно. Номера реплик, указанные в Приложении Б в круглых скобках рядом с названием образца, не отмечены на графике. «hc» (healthy carrier) – здоровый носитель дупликации <i>CNTN6</i> . (Б) Кластерная дендрограмма. Цветные области на графике PCA соответствуют цветным кладам на дендрограмме	
36	Тепловая карта дифференциальной экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК, и глиальных клетках мыши по сравнению с контрольной линией клеток. В строках на тепловой карте представлены образцы. На карте отображена экспрессия 15 % наиболее вариабельных ДЭГ. В правой части рисунка показана кластерная дендрограмма и цветовая шкала тепловой карты. Красный цвет указывает на повышение, а зеленый цвет – на снижение экспрессии генов. Цветные обозначения названий образцов соответствуют обозначениям на диаграмме рассеяния PCA и дендрограмме на рисунке 28	111
37	Нормированная диаграмма распределения числа гипер- и гипохэкспрессирующихся генов в шести группах сравнения (в скобках указаны процент от общего числа ДЭГ для каждой из групп сравнения)	114
38	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микроделецией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК брата, относительно нейронов без хромосомной мутации. Здесь и далее для всех представленных древовидных карт: размер прямоугольника пропорционален уровню значимости P_{FDR} (указан в скобках под названием категории). Цвет каждого прямоугольника отражает величину коэффициента обогащения, измеренного как отношение количества наблюдаемых генов и количества ожидаемых генов из каждой категории в списке ДЭГ	115
39	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микроделецией	117

Продолжение списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
	<i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации	
40	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди ДЭГ в нейронах с микродупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями, относительно нейронов без хромосомной мутации	121
41	Круговые диаграммы, отражающие ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК с микродупликацией (А) и микроделецией (Б) гена <i>CNTN6</i> , при сравнении с нейронами без хромосомной мутации	123
42	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих ДЭГ в нейронах с микроделецией и микродупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК пациентов с интеллектуальными нарушениями, относительно нейронов без хромосомной мутации	124
43	Круговые диаграммы, отражающие общие и уникальные ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда (А) и его условно здорового отца (Б), при сравнении с нейронами без хромосомной мутации	126
44	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих гипоэкспрессирующихся ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда и его условно здорового отца, относительно нейронов без хромосомной мутации	128
45	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди уникальных ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда, относительно нейронов без хромосомной мутации	129

Окончание списка иллюстративного материала

№ рисунка	Название рисунка	Номер страницы
46	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди уникальных ДЭГ в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных из ИПСК здорового отца, относительно нейронов без хромосомной мутации	129
47	Круговые диаграммы, отражающие общие и уникальные ДЭГ в нейронах с микроделецией 3p26.3, полученных из ИПСК пробанда (А) и его сестры (Б), при сравнении с нейронами без хромосомной мутации	130
48	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих ДЭГ в нейронах с микроделецией 3p26.3, полученных из ИПСК, полученных из ИПСК пробанда и его сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации	132
49	Древовидная карта статистически значимо обогащенных категорий биологических процессов среди общих гипоэкспрессирующихся ДЭГ в нейронах с микроделецией 3p26.3, полученных из ИПСК, полученных из ИПСК пробанда и его сестры, относительно нейронов без хромосомной мутации	132
50	Гистограммы, отражающие изменение экспрессии генов <i>CNTN6</i> (А) и <i>CBLN2</i> (Б) в нейронах с различным числом копий гена <i>CNTN6</i> в сравнении с уровнем экспрессии в контрольных образцах	134
51	Гистограммы, отражающие изменение экспрессии генов <i>PEG3</i> (А), <i>OXR1</i> (Б), <i>NOTCH1</i> (В) и <i>CHL1</i> (Г) в нейронах с различным числом копий гена <i>CNTN6</i> в сравнении с уровнем экспрессии в контрольных образцах	136
52	Схема белок-белковых взаимодействий, построенная на основании базы данных STRING	143

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Спектр наследственных заболеваний у пациентов с выявленными моногенными и внутригенными CNV

Ген	Патологическое состояние	Автор
<i>TRAPPC9</i>	Задержка физического, психомоторного, речевого и интеллектуального развития	Mortreux et al., 2018
<i>OPA1</i>	Атрофия зрительного нерва	Almind et al., 2011
<i>DMD</i>	Миодистрофия Дюшенна/Беккера	Brison et al., 2019
<i>LAMA2</i>	Ламинин- $\alpha 2$ -ассоциированная миодистрофия	Ge et al., 2018
<i>CAMTA1</i>	Врожденная атаксия	Thevenon et al., 2012
<i>SGCE</i>	Миоклоническая дистония	Han et al., 2008
<i>DOK7</i>	Врожденная миастения	Azuma et al., 2017
<i>CR1</i>	Болезнь Альцгеймера	Kucukkilic et al., 2018
<i>PDGFB</i>	Кальцификация базальных ядер головного мозга	Nicolas et al., 2014
<i>CHD2</i>	Шизофрения	Poisson et al., 2020
<i>AUTS2</i>	Расстройства аутистического спектра	Nagamani et al., 2013
<i>HLA</i>	Рассеянный склероз	Ferlini et al., 2010
<i>SACS</i>	Спастическая атаксия	Baets et al., 2010
<i>NF1</i>	Нейрофиброматоз	Hsiao et al., 2015
<i>NONO</i>	Врожденные пороки сердца	Scott et al., 2017
<i>FLG</i>	Атопический дерматит	Fernandez et al., 2017
<i>HNF1B</i>	Заболевания почек	Clissold et al., 2018
<i>IFT81</i>	Дисплазия скелета	Pettersson et al., 2018
<i>COL1A2</i>	Ранний остеопороз	Costantini et al., 2018
<i>CASP10</i>	Системный ювенильный идиопатический артрит	Tadaki et al., 2011
<i>LDLR</i>	Гиперхолестеринемия	Feddersen et al., 2013
<i>F8</i>	Гемофилия А	Lannoy et al., 2015
<i>FANCA</i>	Анемия Фанкони	Nicchia et al., 2015
<i>XIAP</i>	Воспалительные заболевания кишечника	Kelsen et al., 2015
<i>AR</i>	Гипоспадия	Kon et al., 2015
<i>ZFPM2</i>	Врожденная диафрагмальная грыжа	Longoni et al., 2015
<i>MSX2</i>	Колобома радужки	Plaisancié et al., 2015
<i>GCK</i>	Сахарный диабет взрослого типа у молодых	Berberich et al., 2019
<i>MANBA</i>	β -маннозидоз	Blomqvist et al., 2019

Окончание Таблицы А.1

Ген	Патологическое состояние	Автор
<i>GALNT14</i>	Мальротация кишечника	Salehi Karlslätt et al., 2019
<i>TBX5</i>	Синдром Холта-Орама	Patel et al., 2012
<i>IMMP2L</i>	Синдром Туретта	Bertelsen et al., 2014
<i>USH2A</i>	Синдром Ушера	Austin-Tse et al., 2018
<i>SCN1A</i>	Синдром Драве	Bene et al., 2015
<i>EHMT1</i>	Синдром Клифстра	Schwaibold et al., 2014
<i>HDAC8</i>	Синдром Корнелии де Ланге	Helgeson et al., 2018
<i>COH1</i>	Синдром Козна	Parri et al., 2010
<i>BHLHA9</i>	Синдром Крейга	Jamsheer et al., 2012
<i>MECP2</i>	Синдром Ретта	Sajan et al., 2017
<i>KMT2A</i>	Синдром Видемана-Штайнера	Mendelsohn et al., 2014
<i>ANKRD11</i>	Синдром KBG	Khalifa et al., 2013
<i>NDRG1</i>	Болезнь Шарко-Мари-Тус	Okamoto et al., 2014

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Клеточные линии, использованные для дифференцировки в нейроны и последующего проведения транскриптомного анализа на микрочипах

№ образца	Идентификатор линии ИПСК*	Генотип	Тип клеток
1	iTAF1nor36 (1)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
2	iTAF1nor36 (2)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
3	iTAF1nor25 (1)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
4	iTAF1nor25 (2)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
5	iTAF2nor24 (1)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
6	iTAF2nor24 (2)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
7	iTAF2nor5** (1)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
8	iNAF1nor6** (1)	Клетки дикого типа (контрольная группа)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
9	iTAF3del17 (1)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
10	iTAF3del17 (2)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
11	iTAF3del21 (1)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
12	iTAF3del21 (2)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
13	iTAF13del26 (1)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
14	iTAF13del26 (2)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
15	iTAF13del27 (1)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК

Окончание Таблицы Б.1

№ образца	Идентификатор линии ИПСК*	Генотип	Тип клеток
16	iTAF13del27 (2)	Гетерозиготная делеция гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
17	iTAF3del17C98 (1)	<i>CNTN6</i> ^{del/mut} (нокаут гена <i>CNTN6</i>)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
18	iTAF3del17C98 (2)	<i>CNTN6</i> ^{del/mut} (нокаут гена <i>CNTN6</i>)	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
19	iTAF4dup14 (1)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
20	iTAF4dup14 (2)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
21	iTAF4dup22 (1)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
22	iTAF4dup22 (2)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
23	iTAF4dup22** (3)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
24	iTAF14dup8 (1)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
25	iTAF14dup8 (2)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
26	iTAF14dup10 (1)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
27	iTAF14dup10 (2)	Гетерозиготная дупликация гена <i>CNTN6</i>	Нейроны, дифференцированные из ИПСК
28	mGlia*** (1)	—	Мышинные глиальные клетки
29	mGlia*** (2)	—	Мышинные глиальные клетки

Примечание: * – Номер в круглых скобках указывает на номер биологической реплики образца нейрональных клеток; ** – Результаты транскриптомного анализа данных образцов были исключены из дальнейшего биоинформатического анализа из-за возможных нарушений в процессе культивирования, направленной дифференцировки и пробоподготовки для проведения микроципового анализа; *** – Мышинные глиальные клетки. ДЭГ в мышиных глиальных клетках были исключены из финальных списков ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1 – Клинико-генетическая характеристика пациентов НИИ психического здоровья
Томского НИМЦ с клиническим диагнозом шизофрения

Номер п/п	№ пациента	Пол	Возраст	Код диагноза по МКБ-10	Результат ПЦР
1	SCH455	F	35	F20.8	норма
2	SCH762	F	27	F20.0	норма
3	SCH664	F	40	–	норма
4	SCH448	M	33	F20.03	норма
5	SCH437	M	31	F20.02	норма
6	SCH770	F	30	F20.02	норма
7	SCH782	M	47	F25	норма
8	SCH219	F	56	F25.2	норма
9	SCH567	M	33	F20.01	норма
10	SCH707	M	27	F20.00	норма
11	SCH596	M	28	F20.004	норма
12	SCH471	M	37	–	норма
13	SCH174	M	32	–	норма
14	SCH528	F	35	–	норма
15	SCH519	F	31	F20.02	норма
16	SCH647	F	54	F20.01	дупликация <i>CNTN6</i>
17	SCH576	F	31	F20.0	норма
18	SCH446	M	34	F20.0	дупликация <i>CNTN6</i>
19	SCH773	M	20	F20.02	дупликация <i>CNTN6</i>
20	SCH740	F	29	F20.0	норма
21	SCH743	M	26	F20.00	норма
22	SCH441	F	38	–	норма
23	SCH504	F	34	F20	норма
24	SCH739	F	31	F20.0	норма
25	SCH726	F	46	F20.0	норма
26	SCH670	F	43	F20.014	норма
27	SCH748	F	67	F20.5	норма
28	SCH454	F	43	–	норма
29	SCH735	M	35	F20.0	норма

Продолжение Таблицы В.1

Номер п/п	№ пациента	Пол	Возраст	Код диагноза по МКБ-10	Результат ПЦР
30	SCH358	M	59	F20.02	норма
31	SCH702	F	63	F20.02	норма
32	SCH497	F	26	F20.01	норма
33	SCH518	F	68	—	норма
34	SCH749	M	31	F20.0	норма
35	SCH152	M	22	F20.02	норма
36	SCH728	M	27	F20.3	норма
37	SCH621	M	29	F20.8	норма
38	SCH616	F	31	F20.00	норма
39	SCH443	F	33	F20.02	дупликация <i>CNTN6</i>
40	SCH234	F	26	F20.6	норма
41	SCH418	F	34	F20.61	норма
42	SCH129	F	25	F20.6	норма
43	SCH595	F	44	F20.02	норма
44	SCH164	M	24	F20.6	норма
45	SCH184	M	18	—	норма
46	SCH309	M	38	F20.02	норма
47	SCH438	F	46	F20.02	норма
48	SCH442	M	30	F20.0	норма
49	SCH449	M	31	F20.01	норма
50	SCH668	M	26	F20.01	норма
51	SCH335	M	20	F20.09	норма
52	SCH781	M	42	F20.02	норма
53	SCH160	F	20	F20	норма
54	SCH752	M	31	F20.0	норма
55	SCH759	M	29	F20.02	норма
56	SCH772	M	20	F20.0	норма
57	SCH663	F	53	F20.02	норма
58	SCH719	M	42	F20.0	норма
59	SCH703	M	28	—	норма
60	SCH414	M	32	F20.6	норма

Окончание Таблицы В.1

Номер п/п	№ пациента	Пол	Возраст	Код диагноза по МКБ-10	Результат ПЦР
61	SCH727	М	26	F20.0	норма
62	SCH644	Ф	33	F20.0	норма
63	SCH758	М	39	F20.02	норма
64	SCH317	Ф	26	F20.09	норма
65	KS202	Ф	42	F20.00	норма
66	KS203	Ф	43	F20.024	дупликация <i>CNTN6</i>
67	KS204	Ф	23	F20.02	норма
68	KS205	Ф	43	F20.02	норма
69	KS206	Ф	32	F20	норма
70	KS207	Ф	42	F20.00	норма
71	SCH575	Ф	56	F20.0	норма
72	SCH708	Ф	33	F20.00	норма
73	SCH315	М	32	–	норма
74	SCH643	М	40	F20.02	норма
75	SCH334	М	46	F20.09	норма
76	SCH580	М	35	F20.02	норма
77	SCH324	Ф	36	F20.01	норма
78	SCH336	М	29	F20.0	норма
79	SCH369	Ф	39	F20.02	норма
80	SCH600	М	54	–	норма
81	SCH635	М	32	F20.0	норма
82	SCH429	М	40	F20.5	норма
83	SCH180	М	31	F20.02	дупликация <i>CNTN6</i>
84	SCH425	М	25	F20.0	норма
85	SCH619	Ф	38	–	норма
86	SCH439	М	64	F20.02	норма

Примечание: Ф - женщины, М – мужчины. Код диагноза (по МКБ-10): F20 – Шизофрения; F20.0 – Параноидальный тип шизофрении; F20.00 – Параноидальный тип шизофрении, непрерывный; F20.004 – Параноидный тип шизофрении, непрерывного течения, с изменением эмоционально-волевой сферы, не компенсируемый; F20.01 – Параноидальный тип шизофрении, эпизодический с нарастающим дефектом; F20.014 – Параноидный тип шизофрении, эпизодический с нарастающим дефектом, с неполной ремиссией; F20.02 – Параноидальный тип шизофрении, эпизодический со стабильным дефектом; F20.024 – Шизофрения параноидного типа с приступообразно-прогредиентным течением в состоянии неполной лекарственной ремиссии с выраженным стабильным дефектом личности; F20.03 –

Параноидальный тип шизофрении, эпизодический ремиттирующий (рекуррентный); F20.09 – Параноидный тип шизофрении с периодом наблюдения менее года; F20.3 – Недифференцированная шизофрения; F20.5 – Остаточная шизофрения; F20.6 – Простой тип шизофрении; F20.8 – Другой тип шизофрении; F25 – Шизоаффективное расстройство; F25.2 – Шизоаффективное расстройство, смешанный тип.

Таблица В.2 – Частота и родительское происхождение микроструктурных aberrаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и в группе здоровых индивидов

Исследование	Делеция <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i>		Общее число CNV	Объем выборки	Наследование	Диагноз
Настоящее исследование + Kashevarova et al., 2014 Лопаткина и др., 2016	2 (1+1 ¹)	1 отц., 1 унасл.	1	1 отц.	3	1070	2 отц., 1 унасл.	УО, ЗПР, РАС, СДВГ, задержка речевого развития, тревожность, гиперкинезы, дизартрия, аномалии сердечно-сосудистой и скелетно-мышечной систем
Настоящее исследование	0	–	0	–	0	86	–	Шизофрения
Szatmari et al., 2007	1	1 неизв.	0	–	1	6709	1 неизв.	РАС
Elia et al., 2010	1	1 отц.	1	1 мат.	2	335	1 мат., 1 отц.	СДВГ
Saus et al., 2010	1	1 неизв.	0	–	1	724	1 неизв.	РАС
Wang et al., 2010	0	–	1	1 неизв.	1	1033	1 неизв.	Нервная анорексия
Kaminsky et al., 2011	3	2 мат., 1 неизв.	4	1 мат., 1 отц., 2 неизв.	7	15749	3 мат., 1 отц., 3 неизв.	ЗПР, УО, РАС, ВПР, лицевые дисморфизмы
Van Daalen et al., 2011	0	–	1	1 <i>de novo</i>	1	50	1 <i>de novo</i>	РАС
Martin et al., 2014	0	–	2	1 унасл., 1 неизв.	2	1723	1 унасл., 1 неизв.	РАС, СДВГ
Pinto et al., 2014	3	3 мат.	4	3 мат., 1 отц.	7	2446	6 мат., 1 отц.	РАС
Hu et al., 2015	7 (6+1 ¹)	1 отц., 6 неизв.	5	1 мат., 1 отц., 3 неизв.	12	3724	1 мат., 2 отц., 9 неизв.	ЗПР, УО, РАС, СДВГ, БАР, ОВР, судороги, страбизм, нистагм, нарушение поведения, трудности в обучении, аномалии сердечно- сосудистой и скелетно-мышечной систем

Продолжение Таблицы В.2

Исследование	Делеция <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i>		Общее число CNV	Объем выборки	Наследование	Диагноз
Brain & Body Genetic Resource Exchange database (цит. по Mercati et al., 2016)	9	4 мат., 3 отц., 2 неизв.	6 (5+1 ²)	2 мат., 1 отц., 2 неизв., 1 мат. ²	15	5891	7 мат., 4 отц., 4 неизв.	ЗВУР, ЗПР, задержка речевого развития, РАС, СДВГ, ОКР, диспраксия, синдром Туретта, нарушение поведения, тревожность, кардиологические нарушения, лицевые дисморфизмы
Fry et al., 2016	0	–	1	1 неизв.	1	80	1 неизв.	ЗПР, УО, РАС, генерализованная эпилепсия, гипертонус мышц нижних конечностей
Mercati et al. 2016	4 (3+1 ¹)	1 мат., 3 отц.	0	–	4	633	1 мат., 3 отц.	РАС, фобии, диспраксия, гиперакузия
Huang et al., 2017	1	1 неизв.	9	9 неизв.	10	2434	10 неизв.	Синдром Туретта, СДВГ, ОКР
Juan-Perez et al., 2018	1	1 мат.	0	–	1	–	1 мат.	Шизофрения, эпилепсия, пограничная УО
Tassano et al. 2018	1	1 отц.	1	1 отц.	2	–	2 отц.	УО, РАС, РСП, ОКР
Thygesen et al., 2018	0	–	2	2 неизв.	2	599	2 неизв.	УО, нарушение поведения, шизофрения
Repnikova et al., 2019	6	1 мат., 5 неизв.	13	4 мат., 1 отц., 8 неизв.	19	20226	5 мат., 1 отц., 13 неизв.	ЗПР, УО, РАС, СДВГ, ОКР, депрессия, тревожность, гипотония, судороги, синдром Туретта, болезнь Паркинсона, апраксия, кардиологические нарушения, скелетные аномалии, лицевые дисморфизмы
Zarrei et al., 2019	1	1 неизв.	0	0	1	2691	1 неизв.	РАС
Higginbotham E.J., 2020	2	2 неизв.	6	1 отц., 5 неизв.	8	2739	1 отц., 7 неизв.	Задержка речевого развития, РАС, СДВГ

Окончание Таблицы В.2

Исследование	Делеция <i>CNTN6</i>		Дупликация <i>CNTN6</i>		Общее число CNV	Объем выборки	Наследование	Диагноз
Итого (пациенты с нервно-психическими заболеваниями)	43	12 мат., 10 отц., 1 унасл.¹, 20 неизв.	57 (56+1²)	1 <i>de novo</i>, 13 мат., 8 отц., 1 унасл.¹, 34 неизв.	100	68942	1 <i>de novo</i>, 25 мат., 18 отц., 2 унасл.¹, 54 неизв.	1 : 711
Настоящее исследование	0	–	0	–	0	200	–	Здоровые индивиды
Elia et al., 2010	0	–	0	–	0	2026	–	Здоровые индивиды
Saus et al., 2010	1	1 неизв.	0	–	1	341	1 неизв.	Здоровые индивиды
Mercati et al., 2016	1	1 неизв.	12	12 неизв.	13	8936	13 неизв.	Здоровые индивиды
Huang et al., 2017	1	1 неизв.	2	2 неизв.	3	4093	3 неизв.	Здоровые индивиды
Итого (здоровые индивиды)	3	3 неизв.	14	14 неизв.	17	15596	17 неизв.	1 : 917

Примечания: В первых двух столбцах таблицы представлена информация о количестве выявленных микроделений и микродупликаций *CNTN6* и происхождении каждой конкретной перестройки. мат. – CNV унаследована от матери; отц. – CNV унаследована от отца; неизв. – нет данных о происхождении CNV; унасл. – представлены данные о наследовании перестройки от одного из родителей (без уточнения от матери или отца); ¹ – семейный случай хромосомной мутации гена *CNTN6* (случаи микроделений и микродупликации с одной семье у сибсов учитывались в расчетах как одно мутационное событие); ² – трипликация *CNTN6*; БАП – биполярное аффективное расстройство; ВПР – врожденные пороки развития; ЗВУР – задержка внутриутробного развития; ЗПР – задержка психомоторного развития; ОВР – оппозиционно-вызывающее расстройство; ОКР – обсессивно-компульсивное расстройство; РАС – расстройство аутистического спектра; РСП – расстройство социального поведения; СДВГ – синдром дефицита внимания и гиперактивности; УО – умственная отсталость

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г.1 – Анализ обогащения дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с различным числом копий гена *CNTN6*

Идентификатор	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
1. Группа сравнения «Нейроны с гетерозиготной делецией гена <i>CNTN6</i> (брат) – нейроны контрольной группы»				
GO:0007610	Поведение	44	2,02	$4,4 \times 10^{-3}$
GO:0007267	Клеточный сигналинг	106	1,79	$3,7 \times 10^{-6}$
GO:0071312	Ответ клетки на алкалоиды	7	5,62	4×10^{-2}
GO:0050890	Познание	31	2,94	$1,2 \times 10^{-4}$
GO:0007010	Организация цитоскелета	74	1,53	$3,6 \times 10^{-2}$
GO:0007565	Беременность	18	2,57	$4,3 \times 10^{-2}$
GO:0006928	Движение клетки или субклеточных компонентов	106	1,43	$2,3 \times 10^{-2}$
GO:0045071	Негативная регуляция репликации вирусного генома	11	5,65	2×10^{-3}
GO:0043085	Положительная регуляция каталитической активности	76	1,50	$4,2 \times 10^{-2}$
GO:0010647	Положительная регуляция клеточной коммуникации	98	1,51	$7,8 \times 10^{-3}$
GO:1990778	Локализация белка на периферии клетки	28	2,46	$5,2 \times 10^{-3}$
GO:0070372	Регуляция каскада ERK1 и ERK2	26	2,25	$2,8 \times 10^{-2}$
GO:0044057	Регуляция системных процессов	45	2,23	$4,7 \times 10^{-4}$
GO:0051049	Регуляция транспорта	105	1,58	$1,1 \times 10^{-3}$
GO:1903900	Регуляция жизненного цикла вируса	15	2,85	$4,4 \times 10^{-2}$
GO:0035455	Ответ на интерферон-альфа	6	7,70	$2,4 \times 10^{-2}$
GO:0016192	Везикулярный транспорт	106	1,45	$2,7 \times 10^{-2}$

Продолжение Таблицы Г.1

Идентификатор	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
2. Группа сравнения «Нейроны с гетерозиготной делецией гена <i>CNTN6</i> (сестра) – нейроны контрольной группы»				
GO:0016477	Клеточная миграция	206	1,35	2×10^{-2}
GO:0044770	Фазовый переход клеточного цикла	89	1,53	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0051270	Регуляция движения клеточных компонентов	144	1,36	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0006260	Репликация ДНК	51	1,72	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0050806	Положительная регуляция синаптической передачи	35	1,94	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0001501	Развитие костно-мышечной системы	84	1,50	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0007616	Долговременная память	12	3,35	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0003170	Развитие сердечного клапана	17	2,68	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0060485	Развитие мезенхимы	50	1,70	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0006928	Движение клетки или субклеточных компонентов	269	1,23	$4,9 \times 10^{-2}$
GO:0040011	Передвижение	241	1,24	$4,9 \times 10^{-2}$
3. Группа сравнения «Нейроны с нокаутом гена <i>CNTN6</i> ^{del/mut} и нейроны контрольной группы»				
GO:0006812	Транспорт катионов	18	2,69	0,23
GO:0006468	Фосфорилирование белков	24	2,15	0,23
GO:0031399	Регуляция процесса модификации белка	23	2,16	0,23
GO:0007267	Клеточный сигналинг	21	2,20	0,27
GO:0010648	Негативная регуляция клеточной коммуникации	18	2,28	0,27
GO:0072659	Локализация белка на плазматической мембране	7	4,56	0,27
GO:0006811	Ионный транспорт	20	2,07	0,3
GO:0003008	Системный процесс	23	1,87	0,38

Продолжение Таблицы Г.1

Идентификатор	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0006182	Процесс биосинтеза цГМФ	2	28,99	0,38
GO:0022008	Нейрогенез	19	2,03	0,38
4. Группа сравнения «Нейроны с нокаутом гена <i>CNTN6</i> ^{del/mut} и нейроны с гетерозиготной делецией гена <i>CNTN6</i> »				
GO:0034097	Ответ на цитокин	22	2,50	0,16
GO:0016477	Миграция клеток	25	2,24	0,16
GO:0045216	Организация клеточных контактов	7	5,66	0,21
GO:0007155	Клеточная адгезия	24	2,15	0,21
GO:0061061	Развитие мышечной ткани	14	2,81	0,21
GO:0010469	Регуляция активности сигнальных рецепторов	13	2,94	0,21
GO:0007586	Пищеварение	6	5,72	0,24
GO:0030855	Дифференцировка эпителиальных клеток	15	2,49	0,27
GO:0006955	Иммунная реакция	28	1,81	0,28
GO:0050808	Организация синапсов	10	3,18	0,28
GO:0000122	Негативная регуляция транскрипции РНК-полимеразой II	16	2,35	0,28
GO:0007417	Развитие центральной нервной системы	17	2,19	0,31
GO:0035235	Сигнальный путь ионотропного рецептора глутамата	3	14,17	0,28
5. Группа сравнения «Нейроны пробанда с гетерозиготной дупликацией гена <i>CNTN6</i> и нейроны контрольной группы»				
GO:0046907	Внутриклеточный транспорт	295	1,41	$8,8 \times 10^{-7}$
GO:0034613	Локализация белка в клетке	295	1,40	$8,8 \times 10^{-7}$
GO:0042886	Транспорт амидов	304	1,30	$3,4 \times 10^{-4}$
GO:0070647	Модификация белка путем	171	1,44	$4,5 \times 10^{-4}$

Продолжение Таблицы Г.1

Идентификатор	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
	конъюгации или удаления малых белковых молекул			
GO:0065003	Сборка белковых комплексов	280	1,31	$4,6 \times 10^{-4}$
GO:0045184	Установление локализации белка	306	1,28	7×10^{-4}
GO:0006396	Процессинг РНК	148	1,46	$7,6 \times 10^{-4}$
GO:0007005	Организация митохондрий	94	1,60	$1,4 \times 10^{-3}$
GO:0016050	Организация везикул	64	1,74	$2,8 \times 10^{-3}$
GO:0033043	Регуляция организации органелл	195	1,34	$2,8 \times 10^{-3}$
GO:0051640	Локализация органелл	118	1,46	$5,3 \times 10^{-3}$
GO:0031503	Локализация белковых комплексов	58	1,73	$5,8 \times 10^{-3}$
GO:0070925	Сборка органелл	139	1,38	$1,1 \times 10^{-2}$
GO:0007049	Клеточный цикл	251	1,24	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0051276	Организация хромосом	172	1,31	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0060341	Регуляция клеточной локализации	139	1,36	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0033554	Клеточный ответ на стресс	266	1,23	2×10^{-2}
GO:0030030	Организация проекции клетки	223	1,26	2×10^{-2}
GO:1902991	Регуляция катаболического процесса белка-предшественника амилоида	11	3,50	2×10^{-2}
6. Группа сравнения «Нейроны бессимптомного носителя гетерозиготной дупликации гена CNTN6 и нейроны контрольной группы»				
GO:0016477	Миграция клеток	206	1,35	$2,7 \times 10^{-2}$
GO:0003179	Морфогенез сердечного клапана	16	2,82	$5,3 \times 10^{-2}$
GO:0007616	Долговременная память	12	3,34	$5,3 \times 10^{-2}$

Окончание Таблицы Г.1

Идентификатор	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0001501	Развитие костно-мышечной системы	84	1,49	$5,3 \times 10^{-2}$
GO:0040011	Передвижение	242	1,24	$5,3 \times 10^{-2}$
GO:0060485	Развитие мезенхимы	50	1,69	$5,3 \times 10^{-2}$
GO:0006928	Движение клетки или субклеточных компонентов	269	1,22	6×10^{-2}
GO:0006259	Метаболизм ДНК	143	1,33	6×10^{-2}
GO:0007267	Клеточный сигналинг	220	1,25	$6,8 \times 10^{-2}$
GO:0010564	Регуляция клеточного цикла	106	1,39	$7,5 \times 10^{-2}$
GO:0046133	Катаболический процесс пиримидинрибонуклеозидов	7	4,65	$7,6 \times 10^{-2}$
GO:0045071	Негативная регуляция репликации вирусного генома	15	2,59	$9,1 \times 10^{-2}$
GO:0043062	Организация внеклеточных компонентов	67	1,50	0,1
GO:0044093	Положительная регуляция молекулярной функции	230	1,22	0,11
GO:1903047	Митотический цикл	117	1,34	0,11
GO:0001933	Негативная регуляция фосфорилирования белков	65	1,50	0,11
GO:1900449	Регуляция сигнального пути рецептора глутамата	14	2,57	0,11
GO:0070374	Положительная регуляция каскадов ERK1 и ERK2	43	1,65	0,11

Примечание: Уменьшение избыточности списка категорий генной онтологии было проведено с помощью метода взвешенного покрытия множества. * – Идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology»; ** – Представлена информация о числе общих генов в сравниваемых линиях нейронов, принадлежащих определенной категории генной онтологии (наблюдаемое число генов из категории); *** – Уровень значимости рассчитан с поправкой на множественные сравнения.

Таблица Г.2 – Четыре группы транскриптомных эффектов реципрокных микроделений и микродупликаций в регионе 3p26.3, затрагивающих ген *CNTN6*

		Микродупликация 3p26.3 (пробанд)	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Микроделеция 3p26.3	Гиперэкспрессирующиеся гены	<i>ENST00000366398</i>, <i>THC2538174</i>, <i>HLA-DRB5</i>, <i>SLC15A3</i>, <i>ENST00000577546</i>, <i>BU955595</i>, <i>ENST00000511793</i>, <i>POTED</i>, <i>SLC11A1</i>, <i>MSR1</i>, <i>LOC100134317</i>, <i>PSG1</i>, <i>LCAT</i>, <i>STAB1</i>, <i>LSR</i>, <i>DOCK8</i>, <i>BARX1</i>, <i>lnc-PTPRD-5</i>, <i>FRK</i>, <i>KRT8</i>, <i>NCKAP1L</i>, <i>UNC93B1</i>, <i>CD37</i>, <i>HLA-B</i>, <i>MYL3</i>	<i>PMEL</i>, <i>NEUROD1</i>, <i>CNN2</i>, <i>OXR1</i>, <i>LAMP2</i>, <i>RAB11FIP1</i>, <i>RNF144B</i>, <i>IFITM1</i>, <i>FERMT1</i>, <i>POU5F1</i>, <i>CMTM6</i>, <i>GM2A</i>, <i>SPARC</i>, <i>RAB17</i>, <i>HLA-DQB1</i>, <i>IGFBP3</i>, <i>PLS3</i>, <i>ZNF385C</i>, <i>DNMT3B</i>, <i>EPCAM</i>, <i>DSP</i>, <i>SPTY2D1</i>, <i>PRSS23</i>, <i>PLAU</i>, <i>ENST00000432694</i>, <i>NEAT1</i>, <i>lnc-ARSJ-1</i>, <i>EPN3</i>, <i>SERPINH1</i>, <i>LINC01021</i>, <i>ISG20</i>, <i>CREB3L2</i>, <i>ENST00000276974</i>, <i>OXTR</i>, <i>CYP1B1</i>, <i>NNMT</i>, <i>TNFRSF10D</i>, <i>IFITM3</i>, <i>THC2527965</i>, <i>F11R</i>, <i>FBXO32</i>, <i>GNG11</i>, <i>CTSO</i>, <i>ENST00000586348</i>, <i>ABCA12</i>, <i>GPX8</i>, <i>FHL2</i>, <i>NANOG</i>, <i>FAM129A</i>, <i>SFTA1P</i>, <i>PAPSS2</i>
	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>A_33_P3230676</i>, <i>ENST00000560709</i>, <i>MIR143HG</i>, <i>LOC100131372</i>, <i>lnc-ADRA1D-1</i>, <i>LOC101927762</i>, <i>LOC100287792</i>	<i>PEG3</i>, <i>CHCHD2</i>, <i>CBLN2</i>, <i>SEMA5A</i>, <i>ENST00000575722</i>, <i>lnc-DLK1-6</i>, <i>FGF7</i>, <i>ENST00000573860</i>, <i>LGI1</i>, <i>SYN3</i>, <i>KCNT1</i>, <i>ENST00000460407</i>, <i>LOC100506472</i>, <i>ABCC8</i>, <i>PCYT1B</i>, <i>MAPRE2</i>, <i>CACNG4</i>, <i>MYO16</i>, <i>RAB3B</i>, <i>PBX3</i>, <i>PAX8-AS1</i>, <i>PRKAR2B</i>, <i>KHDRBS2</i>, <i>RNF152</i>, <i>SNORD114-21</i>, <i>SNX13</i>, <i>MLLT11</i>, <i>APLP2</i>, <i>SPATA13</i>, <i>SEPW1</i>, <i>CHGA</i>, <i>LINC01089</i>, <i>GDI1</i>, <i>CDKN1C</i>, <i>FAM182B</i>, <i>MFI2-AS1</i>, <i>LGI4</i>, <i>GRIA2</i>, <i>ATE1-AS1</i>, <i>REEP6</i>, <i>RXRG</i>, <i>ADCY8</i>, <i>ENST00000572007</i>, <i>SLC8A1</i>, <i>RGS11</i>, <i>SLC5A7</i>, <i>ZNF890P</i>, <i>POU6F2</i>, <i>TERF2</i>, <i>ATP6V0A1</i>, <i>RTN4</i>, <i>lnc-C10orf96-1</i>, <i>IDH1</i>, <i>GPRIN1</i>, <i>lnc-SLC24A5-3</i>, <i>STK32B</i>, <i>HS3ST5</i>, <i>ELOVL6</i>, <i>ENST00000601814</i>, <i>DLST</i>, <i>XLOC_l2_008976</i>, <i>ATAT1</i>, <i>FDPS</i>, <i>CCDC107</i>, <i>STXBP5-AS1</i>, <i>KAT2A</i>, <i>GOLGA2P7</i>, <i>ERC1</i>, <i>HCN4</i>, <i>ENST00000433673</i>, <i>SV2C</i>, <i>lnc-RASSF7-1</i>, <i>lnc-SNX11-2</i>, <i>EPHA8</i>,

Продолжение Таблицы Г.2

		Микродупликация 3p26.3 (пробанд)	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Микроделеция 3p26.3	Гипоэкспрессирующиеся гены		<i>SCRN1, ENST00000402318, LRRC61, ENST00000624918, POLR1B, SNORD114-20, C1orf220, EGFL6, TUBA1B, GNAS, SNORD114-9, NOV, HIP1R, LSS, ASRGL1, GUCY1A2, DCLK1, RNF144A, GUSBP1, CDK10, MSMO1, MAP3K9, ELOVL5, lnc-XXYLT1-1, RGPD1, KIDINS220, MCF2L, LOC101927042, RMST, FDFT1, CAMKV, PTK6, PILRB, PNMA1, CCDC144A, KCNJ18, KBTBD11, BRSK2, FTO, FAM27E3, CHRNA7, QDPR, UBQLN4, lnc-TULP4-1, GRIPAP1, ETS2, ZBTB8B, TUBB, ETV3L, PKP4, TCF7, ZNF580, SCN2A, GPR56, RTN3, C9orf142, PRKCZ, IL10RA, CLUHP3, GABPB1-AS1, A_21_P0014541, BACE1, AES, CACNA1B, lnc-UTP23-3, NLGN3, TMEM91, GALNT15, KIF3C, RIMBP3, PNMAL1, FCHSD2, PTPRT, ANKRD36, TSPAN18, HIST2H2BE, SCUBE1, NTNG2, P2RY1, SEPT8, TMEM97, ABLIM3, APBA2, RARB, TBC1D3P1-DHX40P1, ARPC4-TTLL3, C10orf35, ENO2, GXYLT1P3, ABHD14A, VSNL1, GRID1, MPP2, C16orf45, LOC101927824, SCAMP5, RFPL3S, PIP4K2B, DGKD, SMKR1, CPXM1, DGCR5, FAM189B, HCN3, AOC3, BEND7, PDE4A, FAM149A, C1QL4, LRRC36, CAPN5, lnc-RAB1A-3, SKAP1, SYP, SLC8A3, PRDM2, SPIN3, MICALL2, LOC401433, GABRB3, LOC101928058, BBS4, HSF1, SCN3B, CKMT1A, GUSBP2, LSM11, PPM1H, TNFAIP2, lnc-SHPRH-2, CHST1, PCNXL2, LINC00087, PGRMC1, ENST00000610060, AGRN, MEGF11, SNORD113-3, ZNRF1, lnc-VAMP1-1, PASK, AP2B1, LOC100506271, SNRK, ENST00000553378, ARHGDI, GOLGA2P2Y, LOC102724238, ZGLP1, TSC22D2, ADRA2C, LDOC1, PROX2, C8orf31, lnc-IDH2-1, LRFN1, BX445743, SPOCK1, SDC3, ZNF438, RNF157, AS3MT, MAPRE3, A_21_P0014734, CNTN1, GUCY1B3, GFOD2,</i>

Окончание Таблицы Г.2

		Микродупликация 3p26.3 (пробанд)	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Микроделеция 3p26.3	Гипоэкспрессирующиеся гены		<i>C14orf1</i> , <i>NUP133</i> , <i>XLOC_l2_007167</i> , <i>UNC13B</i> , <i>FRY</i> , <i>KIFAP3</i> , <i>TMEM151B</i> , <i>LOC101059976</i> , <i>GOLGA6L4</i> , <i>GNAI1</i> , <i>ARMCX6</i> , <i>BAIAP2-AS1</i> , <i>RNF215</i> , <i>ZNF501</i> , <i>NANS</i> , <i>TSNAXIP1</i> , <i>DCAF15</i> , <i>PRKCB</i> , <i>PLEKHB1</i> , <i>AP1M1</i> , <i>TMEM240</i> , <i>LINC00924</i> , <i>RAD9A</i> , <i>NAV3</i> , <i>ARL4C</i> , <i>HSPA1A</i> , <i>ISLR2</i> , <i>STXBP5L</i> , <i>FBN3</i> , <i>IFT140</i> , <i>RECQL4</i> , <i>LETMD1</i> , <i>MMP11</i> , <i>ISL2</i> , <i>HSPA12A</i> , <i>ANKS1B</i> , <i>FXYP7</i> , <i>NSG1</i> , <i>NDUFA4L2</i> , <i>KCNJ12</i> , <i>HSBP1</i> , <i>NAIP</i> , <i>C14orf80</i> , <i>ND1</i> , <i>ZFR2</i> , <i>CNTRL</i> , <i>MANSC1</i> , <i>ZFYVE9</i> , <i>TTLL12</i> , <i>ST8SIA2</i> , <i>FAM98C</i> , <i>AMER3</i> , <i>ARL4D</i> , <i>CREG2</i> , <i>CLVS2</i> , <i>ADRA1B</i> , <i>PDYN</i> , <i>CFAP74</i> , <i>SLC37A1</i> , <i>HSPA1L</i> , <i>GDPD3</i> , <i>SLC9A6</i> , <i>SYT13</i> , <i>FUT3</i> , <i>DOK6</i> , <i>ARHGEF9</i> , <i>SPATA33</i> , <i>PRRT4</i> , <i>LRP8</i> , <i>B3GAT1</i> , <i>EFNB3</i> , <i>SAC3D1</i> , <i>lnc-AVEN-1</i> , <i>FAM131B</i> , <i>DIRAS2</i> , <i>MYNN</i> , <i>ENST00000472227</i> , <i>lnc-SNURF-3</i> , <i>ARL3</i> , <i>SNORD114-14</i> , <i>MYO18A</i> , <i>BZRAP1</i> , <i>RNF41</i> , <i>KIAA1467</i> , <i>SLITRK5</i> , <i>CIT</i> , <i>LRRC3</i> , <i>EMID1</i> , <i>TSPYL4</i> , <i>GOPC</i> , <i>ZNF177</i> , <i>COCH</i> , <i>C2orf74</i> , <i>TPPP</i> , <i>LRRC27</i> , <i>KCNK2</i> , <i>KIF5A</i> , <i>GPR123</i> , <i>lnc-H2AFJ-2</i> , <i>ZCCHC18</i> , <i>SCN1A</i> , <i>SMAP2</i> , <i>ATCAY</i> , <i>LRRC75A</i> , <i>CGREF1</i> , <i>CXADR</i> , <i>lnc-WDR11-1</i> , <i>PACS2</i> , <i>LYPD1</i> , <i>CFAP46</i> , <i>ZNF720</i> , <i>NME5</i> , <i>FAM155B</i> , <i>CRHBP</i> , <i>lnc-TAF15-1</i> , <i>LOC101928092</i> , <i>DPP10</i> , <i>MFSD4</i> , <i>LOC100131043</i> , <i>DNASE1L2</i> , <i>ADCY1</i> , <i>MAATS1</i> , <i>GLS</i> , <i>LINC00403</i> , <i>lnc-PPIAL4G-4</i> , <i>ENST00000481710</i> , <i>DCLK2</i> , <i>FREM1</i> , <i>GSTM2</i> , <i>POU6F1</i> , <i>LOC102724689</i> , <i>LKAAEAR1</i> , <i>CEP19</i> , <i>NYAP2</i> , <i>GUCY1A3</i> , <i>LINC00889</i> , <i>GPR123-AS1</i> , <i>PLCXD1</i> , <i>ZBTB6</i> , <i>FBXO41</i> , <i>MPP3</i> , <i>ZNF174</i> , <i>ATP13A4</i> , <i>ANKRD46</i> , <i>lnc-BPHL-2</i> , <i>ABLIM2</i> , <i>LHX5-AS1</i> , <i>CHTOP</i> , <i>SCAI</i> , <i>FAM167A</i> , <i>ABCB9</i> , <i>ISCA1</i> , <i>KIAA1045</i> , <i>CCDC64</i> , <i>REPS2</i> , <i>XLOC_l2_015213</i> , <i>GABRA2</i> , <i>KIAA0319</i> , <i>lnc-MCHR1-1</i> , <i>FABP3</i> , <i>EP400NL</i>

Таблица Г.3 – Транскриптомные эффекты CNV, затрагивающих ген *CNTN6* в трех группах сравнения

№	Транскриптомный эффект	Общее число ДЭГ	Теоретическая модель (по Deshpande, Weiss, 2018)
ДЭГ в нейронах с дупликацией <i>CNTN6</i> – ДЭГ в нейронах с делецией <i>CNTN6</i>			
1	дупликация ↑/ делеция ↑	25	U-образная модель
2	дупликация ↓/ делеция ↓	402	U-образная модель
3	дупликация ↓ / делеция ↑	51	Аддитивная модель
4	дупликация ↑/ делеция ↓	7	Аддитивная модель
5	дупликация ↑	352	Доминантная модель
6	дупликация ↓	2685	Доминантная модель
7	делеция ↑	262	Доминантная модель
8	делеция ↓	394	Доминантная модель
ДЭГ в нейронах с дупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК сына – ДЭГ в нейронах с дупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК отца			
1	сын ↑ / отец ↑	47	U-образная модель
2	сын ↓ / отец ↓	784	U-образная модель
3	сын ↓ / отец ↑	634	Аддитивная модель
4	сын ↑ / отец ↓	14	Аддитивная модель
5	сын ↑	323	Доминантная модель
6	сын ↓	1720	Доминантная модель
7	отец ↑	1154	Доминантная модель
8	отец ↓	595	Доминантная модель
ДЭГ в нейронах с дупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК брата – ДЭГ в нейронах с дупликацией <i>CNTN6</i> , полученных из ИПСК отца			
1	брат ↑ / сестра ↑	248	U-образная модель
2	брат ↓ / сестра ↓	404	U-образная модель
3	брат ↓ / сестра ↑	24	Аддитивная модель
4	брат ↑ / сестра ↓	8	Аддитивная модель
5	брат ↑	82	Доминантная модель
6	брат ↓	375	Доминантная модель
7	сестра ↑	1560	Доминантная модель
8	сестра ↓	974	Доминантная модель

Примечание: стрелки указывают направление изменения экспрессии по отношению к экспрессии в нейронах с нормальным кариотипом (↑ - повышение экспрессии, ↓ - снижение экспрессии). Нейроны, дифференцированные из ИПСК различных индивидов, обозначены как «дупликация», «сын» - нейроны, полученные от пациента с дупликацией *CNTN6*, «делеция», «брат» - нейроны, полученные от пациента с делецией *CNTN6*, «отец» - нейроны, полученные от здорового носителя дупликации *CNTN6*, «сестра» - нейроны, полученные от сестры пациента с делецией *CNTN6*.

Таблица Г.4 – Анализ обогащения общих дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах с микроделецией и нейронах с микродупликацией *CNTN6*

GO ID*	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0007267	Клеточный сигналинг	59	2,05	$1,1 \times 10^{-4}$
GO:0044057	Регуляция системных процессов	28	2,86	$6,8 \times 10^{-4}$
GO:0030030	Организация проекции клеток	54	1,95	$1,3 \times 10^{-3}$
GO:0022008	Нейрогенез	51	1,81	$1,2 \times 10^{-2}$
GO:0016192	Везикулярный транспорт	60	1,69	$1,5 \times 10^{-2}$
GO:0051049	Регуляция транспорта	55	1,70	2×10^{-2}
GO:0042391	Регуляция мембранного потенциала	20	2,70	2×10^{-2}
GO:0007610	Поведение	25	2,37	$2,1 \times 10^{-2}$
GO:0031503	Локализация белковых комплексов	16	3,06	$2,3 \times 10^{-2}$
GO:0048468	Развитие клеток	60	1,59	$4,2 \times 10^{-2}$
GO:0050807	Регуляция организации синапсов	13	3,30	$4,4 \times 10^{-2}$
GO:0033628	Регуляция клеточной адгезии, опосредованной интегрином	6	7,06	$4,5 \times 10^{-2}$

Примечание: Уменьшение избыточности списка категорий генной онтологии было проведено с помощью метода взвешенного покрытия множества. * – Идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology»; ** – Представлена информация о числе общих генов в сравниваемых линиях нейронов, принадлежащих определенной категории генной онтологии (наблюдаемое число генов из категории); *** – Уровень значимости рассчитан с поправкой на множественные сравнения.

Таблица Г.5 – Четыре группы транскриптомных эффектов реципрокных микродупликаций в регионе 3p26.3, затрагивающей ген *CNTN6*, в нейронах, дифференцированных из ИСПК пациента с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гиперэкспрессирующиеся гены	<i>A_33_P3324552, BARX1, BU955595, CA4, CDC6, CNPY1, DOCK8, DUSP5P1, ENST00000450760, ENST00000511793, ENST00000520558, ENST00000577546, FRK, GALM, HLA-DRB5, HTRA3, IGF2, IGFBP5, KCNK1, KRT8, LAMA4, LCAT, lnc-EPHA7-4, lnc-LAMA2-1, LOC100134317, LOC100287944, LOC100507487, LOC403323, LSR, MAGEA2B, MYL3, NMRK2, POTES, PSG1, RFESD, RGS16, SCNN1B, SPATA8, SPATC1, SULT1C4, THC2538174, THC2546670, UNC93B1, USP41, WEE2-AS1, XLOC_l2_005814, XLOC_l2_006584</i>	<i>A_33_P3233100, APOL4, ENST00000570153, HLA-B, LDLRAD4, LINC01048, lnc-DNTT-1, lnc-SHANK2-6, lnc-TSPYL6-2, LOC100287792, NEURL4, PPP1R14C, PTCHD2, XLOC_l2_001592</i>
	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>A_21_P0014771, A_32_P152696, A_32_P88905, A_33_P3303302, ABHD3, ABHD5, ACACB, ACAP2, ACBD3, ACER3, ADAMTS4, ADD3, ADNP2, ADSS, AFAP1L2, AGFG1, AHR, AIFM1, AK2, ALDH6A1, ANAPC1, ANGPT1, ANKRD49, ANLN, ANO6, ANP32D, ANP32E, AP1S2, AP4E1, APH1A, APOM, APRT, APTX, ARAP3, ARHGAP10, ARHGEF10, ARHGEF19, ARID3A, ARMC4, ATG10, ATG12, ATP11A, ATXN7L1, BATF2, BBX, BIK, BMF, BMP2K,</i>	<i>HIP1R, CHGA, RGS11, ABCC8, SYP, SMPD3, TMEM151B, SCN3B, ONECUT1, DCX, SRRM4, MYO16, SIX1, SYT4, ZCCHC18, PACS2, KIF3C, ENO2, SCN2A, DACH1, LOC285178, CACNG2, SYT13, ABLIM2, SPOCK1, ATAT1, BZRAP1, HSPA12A, CACNA1B, FXYD7, TPPP, APBA2, ISL1, PEG3, AMER3, SEPT8, RAB9B, GDI1, NSG1, GPRIN1, BRSK2, CREG2, CLCN4, DCLK2, XKR4, RNF157, FRMD3, ISL2, ARL3, GPR123-AS1, C16orf45, ANKRD36, SCUBE1, CNTNAP5, ANKRD12, LINC00599, GNAS, SVOP, PLCXD3, ADCY1, A_33_P3225983, SCAMP5, GRIK1, GPR162, MAPRE3, MPP3,</i>

Продолжение таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>BMPR1A, BNIP2, BOLA3, BUD13, C10orf76, C11orf31, C14orf1, C17orf96, C18orf54, C1QBP, C4orf46, C6orf163, C6orf164, C6orf211, CANX, CBLB, CBR3, CBX2, CBX3, CCDC169, CCDC174, CCDC28A, CCDC71, CCT2, CCT6A, CD63, CD99P1, CDK2AP2, CENPQ, CFLAR, CHCHD3, CHST6, CLDN3, CLEC2D, CLMP, CMTM6, CMTR2, CNBP, CNIH3, CNN2, CNOT7, CNTLN, COA4, COQ3, COQ5, COX15, CPD, CPSF6, CREB3L2, CRY1, CSE1L, CSTF1, CTSO, CWC27, CWF19L2, CYP1B1, DAP3, DBI, DCP2, DDB1, DDT, DDX10, DDX27, DDX28, DEK, DFNB59, DHRSX, DHTKD1, DHX33, DNAJB6, DNAJC10, DNMT3B, DONSON, DPH2, DPY19L1, DPY19L4, DQ786257, DR1, DRAM2, DSCR3, DSP, DTL, DTWD1, DZIP1L, EFEMP1, EFTUD1, EFTUD2, EGFL6, EIF1AX, EIF2AK2, EIF3H, EIF4A3, EIF4B, ELP2, ELP3, ELP4, ENOSF1, ENST00000276974, ENST00000399148, ENST00000420335, ENST00000439440, ENST00000502883, ENST00000520819, ENST00000539303, ENST00000552481, ENST00000560054, ENST00000563695, ENST00000566446, ENST000005682486, ENST00000612143, ENST00000614063, ENST00000618352, EPB41L2, EPB41L5, EPCAM, EPN3, ERCC6L2, ERH, ERI2,</i>	<i>ENST00000624918, PDE4DIP, ST8SIA2, lnc-SNURF-3, ZGLP1, GPR123, CBLN2, SEMA4D, HCN3, MAB21L1, ELAVL3, SERP2, PBX3, SHC2, HSD11B1L, ENST00000613771, SV2C, lnc-MAPK10-1, SLC26A10, BEX1, FAM229B, FBXO41, SLC8A3, LPPR1, CHST1, NAV3, ADCYAP1, FRY, GOLGA2P7, PSIP1, CPE, ZNRF1, ENST00000573860, TMEM240, TCAF1, KCNH1, MCF2L, SMC1A, SYN3, MFI2-AS1, PAX8-AS1, GABRA2, LYPD1, SLC5A7, SFXN3, CORO2B, GFOD1, LOC283728, PPFIA2, GRIA2, MLLT11, ILDR1, DGCR5, NTNG2, COCH, LOC283516, lnc-JPH1-1, MAN2A2, HCN4, DCHS1, RFPL3S, PNMAL1, CAMKV, C2CD2L, FNDC5, DYNC1LI2, LINC00087, PRKCB, KIAA1045, lnc-C14orf37-1, DNAJB2, ARHGEF9, SLC1A2, RTN4RL1, KCNT1, KCNA4, lnc-C2orf84-1, CPB2-AS1, KIF5A, CNTN1, ENST00000619511, PILRB, PHF21B, lnc-IDH2-1, TMSB15A, DCLK1, GUCY1A2, LOC646241, SEMA6C, KBTBD11, BX095413, HS3ST5, ZFP90, LINC01089, EPHA8, STH, LRFN1, LGI1, C1QL4, GABRB3, PTPRT, ABHD14A, XLOC_l2_005503, HSBP1, SLC8A1, ATP6V0A1, MAP3K9, B3GAT1, CHL1, SHF, CUL4B, RXRG, LOC100507520, MEGF11, ATCAY, ZFR2, KIDINS220, RTN3, CGREF1, PAXBP1-AS1, SCRNI, ISLR2, lnc-IL5RA-6, PCNXL2, CDO1, FAM27E3, lnc-C10orf96-1, LOC101929759, MPP2, RNF152, GOLGA6L4, KHDRBS2, MVB12B, IL10RA, ND1, PRKAR2B, ABCA7, MEAF6, NCOR1, ZNF821, FAM131B,</i>

Продолжение таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>EXOSC9, F11R, FAM103A1, FAM122B, FAM129A, FAM173B, FAM46C, FAM83D, FANCC, FANCL, FAT1, FBLN1, FBXL4, FBXO28, FBXO32, FBXO5, FBXO7, FCHO2, FDFT1, FERMT1, FEZ2, FGD6, FGFR1OP, FHL2, FILIP1, FKBP11, FKBP5, FLJ11710, FLJ35934, FLJ37035, FOXN3, FREM1, FRZB, FUT4, FUT8-AS1, GALNT12, GANAB, GATC, GCAT, GEMIN4, GEN1, GGCX, GINS3, GLI1, GLIPR2, GLYCTK, GM2A, GMCL1, GMNN, GNA12, GNAI3, GNB4, GNG11, GORAB, GPATCH4, GPX8, GSKIP, GSTO1, GTF2E1, GTF3C3, GTPBP4, GUCY1A3, GXYLT2, HACE1, HAUS2, HDAC3, HEATR1, HHIPL1, HHLA1, HIF1A, HMGB2, HMGN1, HMGXB4, HNRNPC, HNRNPLL, HOXB2, HSD17B11, HSD17B4, HSD17B7, HYKK, ICE1, IDH1-AS1, IER2, IFITM1, IFITM3, IGFBP3, IL10RB, IL17RA, IPW, IQCB1, ISCA2, ISG20, ISPD, JMJD1C-AS1, JPX, KANK2, KCNQ1OT1, KCTD9, KDELC2, KDELR2, KDSR, KIT, KNOP1, KRCC1, KRIT1, LAMC1, LAMP2, LARP1B, LATS2, LCTL, LEFTY1, LIMS1, LINC00467, LLPH, lnc-AF131215.3.1-1, lnc-C7orf23-1, lnc-CDKAL1-1, lnc-CTSL1-1, lnc-DHX34-2, lnc-EBPL-2, lnc-HNMT-2, lnc-KB-1980E6.3.1-1, lnc-MTX1-1, lnc-SHFM1-1, lnc-SMC1B-2,</i>	<i>lnc-SNX11-2, LOC102724689, ADCY8, EYA1, SKAP1, SGSM2, AF416714, C10orf35, ENST00000612359, CACNB4, GFOD2, LINC00403, CCDC88A, RNF41, LOC102724416, SLITRK5, POU6F2, PIP4K2B, ABLIM3, ATP5E, SMAP2, C20orf194, RPS12, PRRT4, DOK6, CLASP1, ZKSCAN1, SDC3, ZHX3, AKAP11, ANKRD11, FGF7, NYAP2, YAF2, ANKS1B, MEGF9, ENST00000572007, NDUFA4L2, CELSR3, SLC2A11, ENST00000470810, ANKRD36B, HDAC9, XLOC_l2_008976, SLC9A7, ENST00000254810, CPEB3, PKIG, CXCR4, SLC25A27, lnc-SLC24A5-3, PEX5L, C3orf18, BTBD9, NRXN1, UCN, lnc-ATP2B3-1, ERP44, GOLGA2P6, SLC37A1, CCDC107, TMEM170B, SLC29A4, MYO18A, RAB3B, KIAA0226, CLASP2, RAPGEF6, PLXNA3, NDFIP1, RNF144A, ARL4C, LRRC3B, PROX2, TMX4, KIAA1467, SMC5, LRRC27, FZD3, CEP19, MICALL2, GLS, A_21_P0014219, PNMA1, lnc-RP11-195B21.3.1-2, XLOC_l2_010064, UNC13A, lnc-TULP4-1, LOC728730, LSM11, KCNA3, NRSN2, LOC101928092, RBFADN, GALNTL6, GNAI1, LINC01351, PTK6, EPS15, GOLGA6L9, KCTD16, FAM149A, SLCO5A1, LHX5-AS1, DIRAS2, PRDM2, LOC100506472, STXBP5-AS1, LOC101927824, DKFZP564C152, C11orf95, ENST00000367272, KLHL7, SIMC1, SARAF, BZRAP1-AS1, THC2502236, GPD1L, BEX4, PKD1, LOC100506411, CACNG4, HES6, XLOC_l2_013808, APBB3, LCOR, WASF3, CACNA2D1,</i>

Продолжение таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>lnc-SNURF-1, lnc-TMEM18-12, lnc-TTR-1, LOC100049716, LOC100240735, LOC101927481, LOC101927752, LOC101928076, LOC102725134, LOC400684, LOC654841, LOC81691, LRRC1, LRRN1, LSM5, LXN, LYPLA1, LYRM4, M6PR, MAGOHB, MAN1A2, MAN2A1, MAPK1IP1L, MARC1, MAT2B, MAVS, MCM6, MCU, MDM1, MDM2, MED23, MGME1, MIR17HG, MIR3916, MITD1, MLLT4, MMS22L, MPHOSPH9, MPP7, MPRIP, MPZL1, MRPL1, MRPL10, MRPL16, MRPL19, MRPL45, MRPS10, MRRF, MSRB3, MTIF2, MTL5, MTMR10, MUTYH, MYADM, MYO7A, NAA15, NAB1, NANOG, NCAPD2, NCAPD3, NEAT1, NET1, NFE2L3, NFXL1, NIF3L1, NMU, NNMT, NOP14, NPHP3, NR1D2, NRAS, NRIP1, NSUN2, NUBPL, NUCKS1, NUDT7, NUP35, NUP43, NUP50-AS1, NUS1, OARD1, OGFOD3, OGFRL1, ORAI1, OSTF1, OXR1, P3H4, P4HA1, PAIP2B, PALB2, PAPOLG, PAPSS2, PARL, PARP1, PAWR, PCGF3, PDCD6, PDE8A, PDIA6, PDK1, PFAS, PGAM1, PGM2, PGM3, PHACTR2, PHB, PHF11, PI4K2B, PIGA, PIP5K1B, PLA2G12A, PLAU, PLEKHA4, PLS1, PLS3, PNKP, PNRC1, POLE3, POLR2G, POLR2L, POP5, POPDC3, POU5F1, PPIH, PPP1R35, PPP4R2, PRCP,</i>	<i>ENST00000575722, KIF25, lnc-WRAP73-1, LOC100506191, INSM1, GRID1, UTS2B, PIN4, AES, VPS53, PRNP, CCDC64, LRRC36, ENST00000419960, AFAP1, LOC102723461, FBXO25, LRRC20, ZEB1-AS1, SNHG7, lnc-VCAM1-1, SEMA3C, TSPYL4, SEPT14, GRIPAP1, BAIAP2-AS1, TSPAN2, BACE1, BEND7, STK32B, CYLD, LRRC49, HSP90AA1, ARID1B, ARL14EP, HIC2, LGI4, SPATA33, ENST00000457390, XLOC_l2_013314, MUC20, PPP1R17, PHC2, POLR3GL, RBM4B, LOC283683, HRH3, CERS1, ZNF580, CLUHP3, CAMTA1, ENST00000402318, PRKCE, ENAH, MTMR9, HRK, CLVS1, RGPD1, CDK11B, C5orf24, CUL3, GOLGA2P2Y, MARK1, NLGN3, LOC100289455, AFF3, SLC44A5, lnc-DGCR6-2, MAML3, DAAM1, ZSCAN9, EHBP1, AGPAT1, ZNF248, ENST00000481710, CCDC144A, RMST, LDOC1, TAOK2, LOC101929741, ZNF33B, ZBTB8B, PLGLB1, ASRGL1, KIAA0319, MAPRE2, lnc-MAB21L2-1, NOV, CCDC180, TBC1D3P1-DHX40P1, CABLES2, MCTS1, LRPAP1, KIAA1324, FAM219B, AHNAK2, MLLT4-AS1, HERC2P4, CPT1B, SLC9A6, LINC00682, CAPRIN1, SENP6, CHRNA7, TCTEX1D2, TSPYL5, RNASEH2C, DGUOK, ENST00000553648, MRPS16, ZNF37BP, FTO, L1CAM, KLF7, SLC25A14, EGFLAM, CEP170, ITGA3, PIK3C2B, SZT2, XKR6, KCNJ12, DICER1-AS1, AP1M1, HCFC2, TMEM74, AKAP9, KLHL24, GPD3, A_21_P0014734, CXorf23, GALNT15, FTH1,</i>

Продолжение таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены	<i>PRKCI, PRKCQ-AS1, PRKD3, PRMT9, PROSER1, PRPF4B, PRSS12, PRSS23, PRTFDC1, PRTG, PTAR1, PTC1D1, PTGIS, PTPN11, PTPN21, PTRH2, RAB11B-AS1, RAB11FIP1, RAB17, RAB3GAP1, RACGAP1, RAD54B, RBBP4, RBM12B, RBM38, RBM7, RCC2, RECQL, RECQL4, RFFL, RFWD3, RHBDD1, RHOBTB1, RIF1, RMI2, RMND5A, RNF144B, RPGR, RPL17, RPL39, RPS15A, RPS6KA5, RPS9, RRM1, S100PBP, SAPCD1, SAR1A, SAR1B, SCPEP1, SDE2, SEC24D, SERPINB6, SERPINH1, SERTAD1, SETD7, SFPQ, SFR1, SGK223, SGK3, SGOL2, SH3BGR, SHFM1, SHMT2, SKP2, SLC19A2, SLC25A15, SLC25A16, SLC25A30, SLC29A1, SLC30A7, SLC38A6, SLC39A14, SLC45A3, SLC45A4, SLC7A4, SLC9B1, SMAD4, SMCO4, SMIM20, SMN1, SMYD4, SND1, SNORA32, SNORD109B, SNORD11, SNORD47, SNRPD1, SNX24, SNX3, SNX7, SOX13, SPATA5L1, SPG20, SPG7, SPINK5, SPOPL, SPRED1, SPSB2, SPTLC1, SPTSSA, SPTY2D1, SRBD1, SRD5A3, SRRM1, SRSF10, STARD4, STAT6, STK26, STRA6, STX3, STX6, STXBP3, SUDS3, SUS2, SVIL, TAMM41, TCF12, TCF7, THAP9, THC2520108, TIGD2, TIMELESS, TIMM8A, TIPIN, TM7SF3, TMED2, TMEM110,</i>	<i>ZNF512, ZDHHC21, XLOC_l2_015561, ENST00000433673, PPP1R12B, ZNF324, C1orf220, CSMD1, lnc-MCHR1-1, GNE, LOC102723539, TECPR2, XLOC_l2_009571, SMARCE1, CLK1, MFSD4, AGRN, CRYBB2P1, OSGEPL1, SLC4A5, DNASE1L2, OS9, lnc-TAF15-1, BTF3L4, STXBP5L, HIST2H2BE, TMEM237, ELOVL6, XPNPEP3, GUSBP1, CCDC88C, GLRX, A_33_P3251209, VAT1, LINC00294, SENP7, lnc-TSHB-2, lnc-XXYLT1-1, lnc-BPHL-2, KLHL42, SPATA2L, ENST00000420453, lnc-RAB9B-1, BIVM, PTPRH, LINC00924, IAH1, DACT3-AS1, ATP2B1, SMKR1, MAP1LC3B, LOC401433, SRSF11, SRI, IFT140, LOC100507195, lnc-KHDRBS2-1, PDYN, GDAP1, ZNF382, ZNF671, TRAPPC1, ETV3L, ENST00000623879, MYLK-AS1, SDCCAG8, EME2, DNM1L, lnc-TSC22D1-2, KIF21A, ENST00000507217, RBM6, DYNC1LI1, lnc-TMED5-1, LINC00889, TTBK2, C6orf165, lnc-LOXHD1-1, BAZ2B, GPR56, SNORD113-3, ENST00000535704, KCNJ18, ZNF33A, ARPC4-TTLL3, VARS2, ENST00000551075, LDLRAD3, RAB5B, CXADR, lnc-PCYOX1L-1, CPTP, AZI2, RRP7B, GABPB1-AS1, EML5, ENST00000521696, TRIM52-AS1, H1FX-AS1, LRRC75A, IBA57-AS1, FAM167A, LINC00265, PSMG3-AS1, C19orf68, ASPRV1, NIFK-AS1, lnc-DALRD3-2, C19orf73, COL11A2, lnc-RP11-582J16.5.1-1, FLJ44124, LOC100128398, ABI2, lnc-MCTP2-8, REPIN1, ENST00000414339,</i>

Продолжение таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены	TMEM14B, TMEM14C, TMEM167B, TMEM170A, TMEM183B, TMEM189, TMEM194A, TMEM27, TMEM39A, TMEM88, TMEM97, TMOD3, TMPO, TMTC1, TNFAIP2, TOMM7, TOP1, TOP1MT, TOR1AIP1, TOR1AIP2, TOR3A, TPP1, TPST2, TRIAP1, TRIM13, TRIM24, TRMT10A, TRMT10C, TRMT11, TRPM6, TRRAP, TSN, TTC12, TTC30A, TTC39B, TTLL12, TUNAR, TWF1, TXNDC5, UBA6, UBAC2, UBE2G1, UBQLN1, UEVLD, UPP1, URB2, USP39, UTP15, UTRN, VRK1, VWA9, WDFY2, WDHD1, WDR35, WDR36, WDR86-AS1, WDR89, WWC2, XLOC_l2_006665, XLOC_l2_011225, XLOC_l2_015760, XRCC3, ZCCHC7, ZCCHC8, ZDHHC23, ZHX1-C8orf76, ZMPSTE24, ZMYM5, ZNF134, ZNF320, ZNF345, ZNF44, ZNF480, ZNF501, ZNF530, ZNF587B, ZNF613, ZNF615, ZNF695, ZNF730, ZNF788, ZNF808, ZNF814, ZNRF2P1, ZSCAN31, ZSCAN5A, ZSWIM7, ZW10	XLOC_l2_013648, MAP4K4, LOC102724851, FBXL19-AS1, TIMM13, EMID1, CCNJL, LOC100507661, PXK, RAB27B, STARD9, lnc-FBXW5-1, LRRTM3, lnc-PPFIA2-1, ENST00000424493, CIAO1, MLXIP, ZNF575, ADAMTS13, MALAT1, MOB3A, USP47, TSC22D2, GOSR1, SPPL3, EYS, FAM104B, ENST00000431580, LOC646034, LOC730338, ENST00000570151, KLHL18, ERC1, PRR3, TSNAXIP1, AGPAT4, ANKRD46, ENST00000432694, AK094623, CDK3, LEKR1, DCTN5, PHTF1, NBEAP1, LOC100506235, SNRK, lnc-GATAD1-2, LOC102723859, FAM135B, PIGX, CDK10, SNORD113-2, A_32_P48615, GTF2IRD2B, EFCAB5, lnc-PEX2-1, LOC101927042, COX11, GOLGB1, LOC101928433, NFKBIE, LSM3, GRAMD4, lnc-RPL30-1, ENST00000504808, MEGF8, ZNF720, KIFAP3, DLC1, lnc-CPO-1, COX19, ATE1-AS1, PPP5D1, KMT2C, PHF6, LRRC61, ZNF890P, ORC4, XLOC_l2_015213, GOLGA2P5, VPS13C, LINC00869, AY358815, ZNF69, PI4KB, LINC-PINT, MKKS, CFAP74, NRSN1, BMPR2, GUSBP2, lnc-GTF2F2-2, XLOC_l2_006152, ZNF318, PMFBP1, CENPT, CIT, lnc-IRX3-4, lnc-MATN2-2, SNORD114-21, TUG1, lnc-SMC1A-2, LINC00847, HLA-DQB1, NOL4L, DGKD, MGC27345, AP2B1, ZNF250, CCDC7, BMP3, NEUROD1, lnc-AC069257.9.1-5, LOC283887, CAPRIN2, RUFY2, NAIP, lnc-FAM182B-2, NOVA1, FAM182B, ENST00000442518, LINC01410, IGFBPL1,

Окончание таблицы Г.5

		Условно здоровый родитель	
		Гиперэкспрессирующиеся гены	Гипоэкспрессирующиеся гены
Пробанд	Гипоэкспрессирующиеся гены		<i>GGA3, FAM98C, ZDHHC8, SCN1A, DYNLT1, FLJ10038, POT1-AS1, CIZ1, lnc-RASSF7-1, lnc-CERK-1, PMVK, MIR4500HG, LOC100506538, LOC100506127, ZFYVE19, METTL2B, UNC13B, TOX4, SNHG21, ENST00000553378, KALRN, TMSB10, SNORD114-20, CSGALNACT2, SPIN3, XLOC_l2_013873, lnc-APPL2-1, ENST00000559698, CLVS2, ERVK13-1, TMEM30A, CCSER2, ACBD6, ENST00000427824, ABCB9, TAPT1, MAST2, RIMBP3, AREL1, CCDC60, HSPA1L, NDUFAF5, ZBED8, KMT2A, DENND1B, PDE4A, LOC256880, CCDC102B, XPA, lnc-KIAA0226-3, FAM175B, lnc-SUMO1-1, BC021857, lnc-LRCH1-5, C9orf142, CCNG2, ENST00000602672, PITPNC1, LRRC37A2, PPP1R15A, WIPI2, FKRP, ENST00000433633, COMMD9, PSMD5-AS1, ACTR1B, SNX13, ZFYVE9, LOC91450, TTTY14, MAP9, STK32C, NBPF10, PAXIP1-AS1, COG4, LOC101927359</i>

Таблица Г.6 – Анализ обогащения общих гипозэкспрессирующихся генов в нейронах, дифференцированных из ИСПК пациента с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя

GO ID*	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0120036	Организация проекции клеток	90	2.27	4.8×10^{-10}
GO:0022008	Нейрогенез	83	2.01	9.7×10^{-7}
GO:0007267	Клеточный сигналинг	83	1.97	1.2×10^{-6}
GO:0051049	Регуляция транспорта	85	1.79	3.3×10^{-5}
GO:0051130	Положительная регуляция организации клеточных компонентов	61	1.90	3.3×10^{-4}
GO:0048468	Развитие клеток	91	1.64	3.4×10^{-4}
GO:0051648	Локализация везикул	25	3.02	3.5×10^{-4}
GO:0006811	Ионный транспорт	73	1.71	9.1×10^{-4}
GO:0007017	Процесс на основе микротрубочек	41	2.11	1.2×10^{-3}
GO:0050808	Организация синапсов	27	2.62	1.2×10^{-3}
GO:0099003	Опосредованный везикулами транспорт в синапсах	18	3.25	2.3×10^{-3}
GO:0070925	Сборка органелл	45	1.95	2.6×10^{-3}

Примечание: Уменьшение избыточности списка категорий генной онтологии было проведено с помощью метода взвешенного покрытия множества. * – Идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology»; ** – Представлена информация о числе общих генов в сравниваемых линиях нейронов, принадлежащих определенной категории генной онтологии (наблюдаемое число генов из категории); *** – Уровень значимости рассчитан с поправкой на множественные сравнения.

Таблица Г.7 – Анализ обогащения общих дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах, дифференцированных из ИСПК пациента с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя (снижение экспрессии в нейронах пробанда и повышение экспрессии в нейронах условно здорового родителя)

GO ID*	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0006259	Метаболизм ДНК	55	2.04	2.3×10^{-3}
GO:0033554	Клеточный ответ на стресс	82	1.58	1.6×10^{-3}
GO:0006396	Процессинг РНК	46	1.88	2.3×10^{-3}
GO:1901566	Процесс биосинтеза азоторганических соединений	73	1.46	0.16
GO:0016071	Метаболизм мРНК	37	1.73	0.23
GO:0007049	Клеточный цикл	70	1.44	0.25
GO:0009314	Реакция клетки на радиацию	24	1.95	0.29
GO:1903900	Регуляция жизненного цикла вируса	11	2.8	0.36
GO:0033044	Регуляция организации хромосом	19	2.08	0.39

Примечание: Уменьшение избыточности списка категорий генной онтологии было проведено с помощью метода взвешенного покрытия множества; * – Идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology»; ** – Представлена информация о числе общих генов в сравниваемых линиях нейронов, принадлежащих определенной категории генной онтологии (наблюдаемое число генов из категории); *** – Уровень значимости рассчитан с поправкой на множественные сравнения.

Таблица Г.8 – Анализ обогащения уникальных дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах, дифференцированных из ИСПК пациента с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового родителя

GO ID*	Категория геной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
1. Уникальные ДЭГ в нейронах пробанда				
GO:0032446	Модификация белков путем конъюгации малых белковых молекул	83	1,76	1×10^{-3}
GO:0042886	Транспорт амидов	172	1,43	1×10^{-3}
GO:0046907	Внутриклеточный транспорт	157	1,45	1×10^{-3}
GO:0034613	Локализация белка в клетке	156	1,44	$1,2 \times 10^{-3}$
GO:0045184	Установление локализации белка	171	1,39	$1,9 \times 10^{-3}$
GO:0007005	Организация митохондрий	57	1,88	$1,9 \times 10^{-3}$
GO:0006396	Процессинг РНК	85	1,63	$3,1 \times 10^{-3}$
GO:0051276	Организация хромосом	100	1,48	$1,6 \times 10^{-3}$
GO:0009894	Регуляция катаболических процессов	81	1,55	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0016050	Организация везикул	37	1,95	$2,5 \times 10^{-2}$
GO:0006914	Аутофагия	49	1,75	$2,8 \times 10^{-2}$
GO:0034660	Метаболизм некодирующих РНК	53	1,69	$3,3 \times 10^{-2}$
GO:0009057	Катаболизм макромолекул	112	1,40	$3,4 \times 10^{-2}$
GO:1902187	Негативная регуляция высвобождения вируса из клетки-хозяина	6	6,43	$3,6 \times 10^{-2}$
GO:0006974	Клеточный ответ на повреждение ДНК	73	1,53	$3,8 \times 10^{-2}$
GO:0031365	Аминокислотная модификация N-концевой аминокислоты	8	4,59	$4,3 \times 10^{-2}$
2. Уникальные ДЭГ в нейронах условно здорового родителя				
GO:0070371	Каскад ERK1 и ERK2	38	2,10	$1,6 \times 10^{-2}$
GO:0006216	Катаболизм цитидина	6	9,51	$1,6 \times 10^{-2}$
GO:0016554	Превращение цитидина в уридин	6	9,51	$1,6 \times 10^{-2}$

Окончание Таблицы Г.8

GO ID*	Категория генной онтологии	Число генов**	Коэффициент обогащения	Уровень значимости P_{FDR}^{***}
GO:0048646	Формирование анатомических структур, участвующих в морфогенезе	91	1,55	$1,7 \times 10^{-2}$
GO:0030335	Положительная регуляция миграции клеток	48	1,84	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0050673	Пролиферация эпителиальных клеток	40	1,96	$1,9 \times 10^{-2}$
GO:0072359	Развитие кровеносной системы	86	1,51	$2,9 \times 10^{-2}$
GO:0009887	Морфогенез органов животных	82	1,52	$2,9 \times 10^{-2}$
GO:0001501	Развитие скелетной системы	49	1,76	$2,9 \times 10^{-2}$
GO:0043062	Организация внеклеточных структур	41	1,85	$3,3 \times 10^{-2}$
GO:0043410	Положительная регуляция MAPK каскада	51	1,71	$3,8 \times 10^{-2}$
GO:0060485	Развитие мезенхимы	30	2,05	$4,2 \times 10^{-2}$

Примечание: Уменьшение избыточности списка категорий генной онтологии было проведено с помощью метода взвешенного покрытия множества; * – Идентификатор функциональной категории по классификации базы данных «Gene Ontology»; ** – Представлена информация о числе общих генов в сравниваемых линиях нейронов, принадлежащих определенной категории генной онтологии (наблюдаемое число генов из категории); *** – Уровень значимости рассчитан с поправкой на множественные сравнения.

Таблица Г.9 – Десять общих гипоэкспрессирующихся генов с наиболее статистически значимым изменением экспрессии в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделецией и микродупликацией гена *CNTN6*

Название гена, номер в каталоге MIM	Характер изменения экспрессии в клетках с		Гено-фенотипические корреляции
	микроделецией гена <i>CNTN6</i>	микродупликацией гена <i>CNTN6</i>	
<i>PEG3</i> OMIM 601483	в 13,0 раз (↓)	в 20,1 раз (↓)	Импринтированный ген <i>PEG3</i> , экспрессирующийся с отцовского гомолога, кодирует белок цинковых пальцев, участвующий в регуляции иммунного ответа на действие опухолевого супрессорного цитокина TNF [Bosire et al., 2021]. <i>PEG3</i> может участвовать в пролиферации клеток и p53-опосредованном апоптозе. Снижение экспрессии <i>PEG3</i> может быть ассоциирована с низким уровнем плацентарных гормонов и недоношенностью новорожденного [Creeth, John, 2020]. Метилирование <i>PEG3</i> может лежать в основе гиперинтенсивности серого и белого вещества гиппокампа [Lorgen-Ritchie et al., 2021] и быть связано с развитием нервной системы [Creeth, John, 2020; Dorus et al., 2004].
<i>CBLN2</i> OMIM 600433	в 11,0 раз (↓)	в 12,9 раз (↓)	<i>CBLN2</i> (предшественник церебеллина 2) кодирует секретируемый нейрональный гликопротеин, выступающий в качестве важного синаптического организатора. <i>CBLN2</i> участвует в синаптогенезе клеток гиппокампа и параллельных волокон – клеток Пуркинье [Tao et al., 2018]. Связываясь с пресинаптическими нейрексинами и постсинаптическими GluD1 и GluD2, <i>Cbln2</i> образует транс-синаптические адгезионные комплексы и может контролировать компульсивное поведение [Seigneur et al., 2021]. <i>CBLN2</i> рассматривается в качестве

Продолжение таблицы Г.9

Название гена, номер в каталоге MIM	Характер изменения экспрессии в клетках с		Гено-фенотипические корреляции
	микроделецией гена <i>CNTN6</i>	микродупликацией гена <i>CNTN6</i>	
<i>CBLN2</i> OMIM 600433	в 11,0 раз (↓)	в 12,9 раз (↓)	кандидатного гена развития РАС и синдрома Туретта, а также потенциального прогностического биомаркера аденокарциномы толстой кишки [Clarke et al., 2012; Zhu et al., 2021].
<i>CHCHD2</i> OMIM 616244	в 4,4 раз (↓)	в 13,3 раз (↓)	<i>CHCHD2</i> кодирует фактор транскрипции, который связывается с консервативным регуляторным элементом в гене <i>COX4I2</i> и активирует его. Продукт гена <i>CHCHD2</i> участвует в миграции и дифференцировке клеток, апоптозе, а также формировании структуры митохондриальных крист. Показана ассоциация между точковыми мутациями в гене <i>CHCHD2</i> и развитием аутосомно-доминантного паркинсонизма (OMIM 616710) и деменции с тельцами Леви [Kee et al., 2021]. Точковые мутации в гене <i>CHCHD2</i> были выявлены у пациентов с болезнью Паркинсона и Альцгеймера, боковым амиотрофическим склерозом, множественной системной атрофией, деменцией с тельцами Леви и фронтотемпоральной деменцией [Kee et al., 2021]. Экспрессия <i>CHCHD2</i> снижается в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с лиссэнцефалией, что указывает на потенциальную роль <i>CHCHD2</i> в дисгенезии коры головного мозга [Shimojima et al., 2015].

Продолжение таблицы Г.9

Название гена, номер в каталоге MIM	Характер изменения экспрессии в клетках с		Гено-фенотипические корреляции
	микроделецией гена <i>CNTN6</i>	микродупликацией гена <i>CNTN6</i>	
<i>KCNT1</i> OMIM 608167	в 13,9 раз (↓)	в 6,7 раз (↓)	Ген <i>KCNT1</i> кодирует молекулу активируемого натрием калиевого канала, высоко экспрессирующегося в ЦНС. Мутации в данном гене приводят к увеличению ионного тока в нейронах и изменению возбудимости клетки, что, в конечном итоге, может стать причиной развития судорог [Quraishi et al., 2019]. Мутации в этом гене ассоциированы с развитием энцефалопатии (OMIM 614959 и 615005). Другие клинические проявления мутаций в гене <i>KCNT1</i> включают в себя синдром Веста и Охтаха, раннюю миоклоническую энцефалопатию, лейкодистрофию и / или лейкоэнцефалопатию, фокальную и мультифокальную эпилепсию, задержку развития, микроцефалию, косоглазие, гипотонию и двигательные расстройства.
<i>SEMA5A</i> OMIM 609297	в 6,4 раз (↓)	в 9,4 раз (↓)	Мембранный белок <i>SEMA5A</i> участвует в аксональном наведении в процессе развития нервной системы. Снижение экспрессии <i>SEMA5A</i> обнаружено у пациентов с PAC [Weiss et al., 2009]. Мутации в гене <i>SEMA5A</i> могут быть ассоциированы с развитием инфантильных спазмов [Wang et al., 2019], , УО [Mosca-Boidron et al., 2016] и онкологических заболеваний [D'Aguanno et al., 2018]. <i>SEMA5A</i> рассматривается в качестве прогностического биомаркера немелкоклеточного рака легкого [Lu et al., 2010], рака толстой кишки [Demirkol et al., 2017] и ревматоидного артрита [Gras et al., 2014].

Продолжение таблицы Г.9

Название гена, номер в каталоге MIM	Характер изменения экспрессии в клетках с		Гено-фенотипические корреляции
	микроделецией гена <i>CNTN6</i>	микродупликацией гена <i>CNTN6</i>	
<i>FGF7</i> OMIM 148180	в 4,2 раз (↓)	в 8,0 раз (↓)	<i>FGF7</i> является членом семейства факторов роста фибробластов. Данные молекулы участвуют в эмбриональном развитии, росте клеток, морфогенезе, восстановлении тканей, процессах роста опухоли и ее инвазии. <i>FGF7</i> вовлечен в организацию специфических пресинаптических терминалей в головном мозге млекопитающих и формирование тормозных синапсов [Terauchi et al., 2010; Terauchi et al., 2015]. <i>Fgf7/9/10/22</i> экспрессируются в развивающейся первичной соматосенсорной коре [Huang et al., 2017].
<i>LGI1</i> OMIM 604619	в 2,3 раз (↓)	в 7,0 раз (↓)	<i>LGI1</i> является членом суперсемейства секретируемых белков, содержащих богатые лейцином повторы. Молекулы данного семейства экспрессируются в головном мозге и участвуют в регуляции постнатального развития глутаматергических синапсов. <i>LGI1</i> регулирует активность потенциалзависимых калиевых каналов и участвует в регуляции роста нейронов и выживании клеток. Мутации, затрагивающие ген <i>LGI1</i> , могут приводить к увеличению активности работы канала и развитию эпилепсии [Schulte et al., 2006]. Гетерозиготные точечные мутации и делеции <i>LGI1</i> ассоциированы с развитием боковой височной эпилепсией, аутосомно-доминантной тип наследования (OMIM 600512). Антитела к <i>LGI1</i> являются одной из наиболее

Окончание таблицы Г.9

Название гена, номер в каталоге MIM	Характер изменения экспрессии в клетках с		Гено-фенотипические корреляции
	микроделецией гена <i>CNTN6</i>	микродупликацией гена <i>CNTN6</i>	
<i>LGII</i> OMIM 604619	в 2,3 раз (↓)	в 7,0 раз (↓)	частых причин развития аутоиммунного энцефалита, сопровождающегося поражением лимбической системы [Li et al., 2021a].
<i>SYN3</i> OMIM 602705	в 3,3 раз (↓)	в 6,8 раз (↓)	Продукт гена является синаптическим фосфопротеином, который в сотрудничестве с α -синуклеином контролирует высвобождение дофамина. Синапсины кодируют фосфопротеины нейронов, которые связываются с поверхностью синаптических пузырьков и участвуют в росте аксонов и синаптогенезе. <i>SYN3</i> является кандидатным геном развития шизофрении [Longhena et al., 2018], PAC [Griswold et al., 2012], болезни Паркинсона и СДВГ [Casiraghi et al., 2020].
<i>LOC100506472</i>	в 2,1 раз (↓)	в 6,6 раз (↓)	Продукт гена <i>LOC100506472</i> может принимать участие в патогенезе аневризмы грудного отдела аорты [Li, Yang, 2018].
<i>ABCC8</i> OMIM 600509	в 2,9 раз (↓)	в 6,4 раз (↓)	Ген <i>ABCC8</i> кодирует АТФ-связывающий кассетный транспортёр. <i>ABCC8</i> выступает в роли модулятора АТФ-чувствительных калиевых каналов и высвобождения инсулина. Мутации в гене <i>ABCC8</i> ассоциированы с развитием неонатального сахарного диабета (OMIM 610374 и 618857) и семейной формы гиперинсулинемической гипогликемии (OMIM 256450). Редкие миссенс-варианты в гене <i>ABCC8</i> связаны с легочной артериальной гипертензией [Bohnen et al., 2018].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор глубоко признателен своему научному руководителю – д.б.н., профессору РАН И.Н. Лебедеву за всестороннюю помощь, безграничное терпение и поддержку на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор благодарен своему научному консультанту – д.м.н., профессору С.А. Ивановой и коллективу лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ за помощь и сотрудничество в процессе выполнения диссертационной работы.

Автор выражает признательность д.б.н., профессору О.Л. Серову и всему коллективу Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН за всестороннюю помощь в проведении экспериментальной части исследования и обсуждении результатов. Особую благодарность хочется выразить к.б.н. М.М. Гридиной и к.б.н. В.С. Фишману за ценные советы и помощь при анализе полученных данных.

Автор выражает искреннюю благодарность коллективу лаборатории цитогенетики, лаборатории онтогенетики и лаборатории молекулярной диагностики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за участие в обсуждении результатов, помощь в планировании и проведении исследования.

Огромная благодарность врачам Генетической клиники НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также врачам клиник НИИ психического здоровья Томского НИМЦ и Томской клинической психиатрической больницы за помощь в обследовании пациентов и сборе биологического материала.

Автор выражает признательность учёному секретарю диссертационного совета, к.б.н. Ирине Юрьевне Хитринской за организационную помощь в учебном процессе в аспирантуре и за методическую помощь в подготовке документов к защите.

Автор выражает слова искренней благодарности всем сотрудникам института за участие в обсуждении результатов диссертационной работы на заседаниях ученого совета и в личной беседе.