

*На правах рукописи*

**Липина Татьяна Викторовна**

**ВКЛАД ТОЧЕЧНОЙ МУТАЦИИ ГЕНА *DISC1* (DISRUPTED-IN-SCHIZOPHRENIA-1) В ПАТОГЕНЕЗ ШИЗОФРЕНИИ:  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

03.03.01 – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Новосибирск

2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Научно-исследовательском институте физиологии и фундаментальной медицины (НИИФФМ) (г. Новосибирск).

Научный

консультант - Тамара Геннадьевна Амстиславская, д-р биол. наук

Официальные  
оппоненты:

Ирина Васильевна Мухина, д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова и директор института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

Алла Борисовна Салмина, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биохимии ФГБОУ ВО "Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого" Минздрава России

Анатолий Александрович Овчинников, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии ФГБОУ ВО «Новосибирского государственного медицинского университета» Минздрава России

Ведущая

организация -

Санкт-Петербургский государственный университет

Защита состоится «\_\_\_ \_\_\_\_\_» 2018 года в \_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.014.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, 4), тел. 383-3359801, факс 383-3359754, эл. почта [dissovet@physiol.ru](mailto:dissovet@physiol.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФФМ и на сайте <http://physiol.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
д-р биол. наук

В.Н. Мельников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Шизофрения является хроническим психическим заболеванием, затрагивающим ~ 1% населения во всем мире и характеризующимся нарушением когнитивных и эмоциональных функций. Средний возраст возникновения шизофрении у мужчин - 18-25 лет, и у женщин — 23-30 лет (Tandon et al., 2009). Шизофрению принято считать неизлечимым заболеванием, которое зачастую принимает затяжной характер. Поскольку причины возникновения шизофрении до конца не изучены, основная терапия направлена на купирование существующих симптомов.

Анализ генетической архитектуры шизофрении и механизмов её наследуемости доказал полигенный характер заболевания (Lewis, Levitt, 2002; Howes et al., 2017). В патогенез шизофрении критичный вклад приносят взаимодействия определённых генетических элементов с психопатогенными факторами окружающей среды, что в целом нарушает формирование мозга и способствует в дальнейшем проявлению симптомов шизофрении, которые, как правило, не возникают до юношеского периода жизни (Buka, Fan 1999; Lewis, Levitt, 2002). Патологические механизмы на ранней стадии развития, вовлечённые в долговременные процессы патогенеза шизофрении, до сих пор остаются неизученными. Одной из причин является отсутствие надежных биомаркеров для ранней диагностики шизофрении и трудоемкость проведения долговременных клинических исследований до начала проявления симптомов шизофрении. Только в последние годы стали появляться первые статьи с высококачественной визуализацией головного мозга в процессе нейроразвития - до и после возникновения шизофрении (Zalesky et al., 2015). В качестве превентивной терапии психозов и шизофрении был предложен вальпроат как многофункциональный препарат с более щадящим действием по сравнению с антипсихотиками (Lambert et al., 2016). Отсутствие подходящих экспериментальных моделей шизофрении, которые бы соответствовали гипотезе нейроразвития, также замедляет прогресс в данном направлении. Хотя существует ряд моделей с селективным разрушением определённых участков мозга на ранней стадии развития, которые приводят к проявлению шизофреноподобного поведения после полового созревания (Moore et al., 2006; Tseng, 2007), однако такой подход не моделирует в полной мере этиологию шизофрении, поскольку не учитывается генетический компонент.

Выявляют около 130 генов-кандидатов, связанных с предрасположенностью к шизофрении, из которых только несколько подтверждены независимыми исследованиями (Ross et al., 2006). Так, *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1) ген был картирован на 1й хромосоме при цитогенетическом анализе транслокации между 1 и 11 хромосомами (t1:11) среди членов шотландской семьи больных шизофренией, депрессией и биполярным расстройством (St Clair et al., 1990; Millar et al., 2000). Затем, независимые группы исследователей выявили генетическую ассоциацию поврежденного гена *DISC1* с шизофренией в семьях из Финляндии (Ekelund et al., 2001; 2004), Шотландии (Macgregor et al., 2004), Великобритании (Hamshere et al., 2005). Многочисленные исследования обнаружили ассоциации однонуклеотидных

полиморфизмов гена *DISC1* с шизофренией на различных популяциях (Liu et al., 2006, обзор Bradshaw, Porteous, 2012, Thomson et al., 2013). Была создана генетическая линия мышей с потерей С-конца *DISC1*, моделирующей укороченную изоформу *DISC1* размером ~ 75 кДа при межхромосомной транслокации у людей (Li et al., 2007). Данная линия мышей продемонстрировала шизофреноподобные эндофенотипы вместе с депрессивно-подобным поведением на фоне упрощения дендритных разветвлений нейронов в гиппокампе. Следует отметить, что на начальном этапе, исследования *DISC1* были в основном сосредоточены на функциональной роли С-конца *DISC1*, поскольку место межхромосомной транслокации t1:11 приходится на 9 экзон гена *DISC1*, кодирующий С-конец протеина, в то время как функциональная роль N-конца *DISC1* оставалась неизученной. В основном были получены доказательства, что С-конец *DISC1* играет важную роль в нейроразвитии. Так, *DISC1-S704* полиморфизм, ассоциированный с шизофренией у людей, подавляет нейрональную миграцию в коре головного мозга в процессе нейроразвития (Singh et al., 2011). Кроме того, обнаружен повышенный уровень *DISC1* изоформы размером 75-85 кДа в клеточных ядрах у больных шизофренией (Sawamura et al., 2005). Однако была найдена генетическая ассоциация между шизофренией, шизоаффективным расстройством и дефицитом рабочей памяти для пациентов с гаплотипами, охватывающими 2 экзон *DISC1* (Cannon et al., 2005; Hennah et al., 2005; Maeda et al., 2006). Также было выявлено взаимодействие между С-концом *DISC1* и фосфодиэстеразой 4го типа (PDE4) (Millar et al., 2005). PDE4, а также гликоген синтаз киназа-3 (GSK-3) являются внутриклеточными регуляторами активности дофаминовых рецепторов 2го типа (D2) (Beaulieu et al., 2012), которые лежат в основе дофаминовой теории шизофрении (Snyder, 1976; Howes, Kapur, 2009). Установлено, что *DISC1* активно взаимодействует с другими протеинами, создавая межбелковую сеть из 127 протеинов, включающих 158 взаимодействий (Cattarigo et al., 2007). Учитывая, что шизофрения является полигенным психическим заболеванием и риск развития данного расстройства определяется взаимодействиями между генетической предрасположенностью и средой, а также взаимодействиями на геномном и протеиновом уровнях, одним из новых подходов изучения механизмов шизофрении является выявление вклада нарушенных межбелковых взаимодействий в патогенез шизофрении (Nicolodemus et al., 2010). Для реализации такого подхода целесообразно исследование полиморфизма *DISC1*, нарушающего взаимодействия определённых протеинов с *DISC1* на уровне *in vivo* модели. Однако, на момент инициации данного исследования, экспериментальных *in vivo* моделей для изучения вклада межбелковых взаимодействий N-конца *DISC1* в механизмы шизофрении не существовало. Эти данные послужили основанием для гипотезы, что генетическая модификация 2го экзона гена *DISC1* у мышей, кодирующего N-конец *DISC1*, позволит оценить его вклад в межбелковые взаимодействия и патогенез шизофрении на экспериментальной модели *in vivo*. Более того, 2й экзон *DISC1* является наиболее длинным и, следовательно, представляет собой оптимальную мишень для поиска точечной мутации,

вызванной химическим мутагеном ENU (N-ethyl N-nitrosourea), широко используемого в экспериментальном подходе от «гена к поведению» (Coghill et al., 2002).

В связи с вышеизложенным, **целью** данной работы явилось исследование вклада гена *DISC1* с точечной мутацией во 2м экзоне, модифицирующей N-конец белка, в механизмы шизофрении на экспериментальной *in vivo* модели мышей для выявления новых биомаркеров и терапевтических мишеней.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать генетические линии мышей с измененным геном *DISC1* путем точечных мутаций во 2м экзоне и сравнить линии поведенческими методами для дальнейшего выявления шизофреноподобных характеристик
2. Определить биохимические изменения в головном мозге, вызванные мутацией (*DISC1* Rgsc<sup>1390</sup>), селективно приводящей к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P, включая показатели дофаминергической системы и характеристики взаимодействия *DISC1* с PDE4B, GSK-3 белками и D2 рецепторами;
3. Оценить антипсихотические эффекты ингибиторов PDE4B и GSK-3, а также пептида TAT-D2per, разрывающего межбелковые взаимодействия между *DISC1* и D2 рецепторами;
4. Оценить взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению (100P<sup>+</sup>) и фактором материнской иммунной активации для дальнейшей валидации патогенности *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> мутации, а также оценить вклад интерлейкина-6 в генез данного типа патологического поведения;
5. Исследовать динамику возникновения эндофенотипов шизофреноподобного поведения у мышей линии 100P/100P, превентивную эффективность вальпроата и молекулярную мишень, опосредующую данный эффект.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Генетическая линия мышей 100P/100P с точечной мутацией *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> во 2м экзоне гена *DISC1*, созданная при выполнении данной работы, соответствует основным критериям экспериментальной модели шизофрении, согласно этиологии; сходству симптомов; нейробиологическим изменениям и терапевтическому ответу на антипсихотики.
2. Проявление шизофреноподобного поведения у 100P/100P линии мышей происходит на фоне гиперактивации дофаминергической системы головного мозга, сопровождающейся увеличением: чувствительности к амфетамину, плотности высокочувствительных дофаминовых рецепторов D2 (D2<sup>high</sup>); взаимодействия *DISC1*-L100P с D2 рецепторами.
3. Нарушение взаимодействий между *DISC1*-L100P протеина с GSK-3, PDE4B и D2 рецепторами вовлечено в биохимические механизмы шизофреноподобного поведения. Коррекция повышенной активности GSK-3, PDE4B, а также усиленных взаимодействий между *DISC1*-L100P и D2

- рецепторами, оказывает антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей.
4. Материнская иммунная активация посредством провоспалительного цитокина интерлейкина-6 (ИЛ-6) опосредует шизофреноподобное поведение у гетерозиготных мышей 100P<sup>+</sup>.
  5. Глиатрансмиттер липокалин-2 (Lcn-2) вовлекается в нейроглиальные механизмы шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей на ранней стадии развития и в превентивный эффект вальпроата.

**Научная новизна полученных результатов.** Впервые создана генетическая линия мышей с точечной мутацией во 2м экзоне гена DISC1, приводящей к замене лейцина на пролин в позиции 100 аминокислоты протеина DISC1 (название линии DISC1-L100P; 100P/100P). Установлены следующие маркеры шизофреноподобного поведения у 100P/100P мутантных мышей: гипреактивность, нарушения престаимпульного торможения, латентного торможения и дефицит рабочей памяти. Данные показатели селективно нормализовались антипсихотиком - клозапином, но не антидепрессантом - бупропионом.

Оценка анатомических изменений головного мозга с применением магнитно-резонансной томографии выявила снижение объема мозга на 13%.

Данные биохимического анализа обнаружили пониженное связывание DISC1-L100P протеина с фосфодиэстеразой-4В (PDE4B) и гликоген-синтаз киназой-3 (GSK-3), вместе с повышенным взаимодействием с дофаминовыми рецепторами 2го типа (D2). Сниженное взаимодействие между DISC1-L100P и GSK-3 сопровождалось низким уровнем фосфорилирования GSK-3, свидетельствуя о повышенной ферментативной активности GSK-3. Фармакологическое и генетическое ингибирование GSK-3 нормализовали шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантов. Впервые выявлено синергетическое взаимодействие между фармакологическими ингибиторами PDE4 и GSK-3. С учетом того, что GSK-3 активация зависит от стимуляции D2 рецепторов, было предположено, что DISC1 регулирует функциональность D2 рецепторов и, соответственно, функционирование дофаминовой системы головного мозга. Впервые обнаружено наличие функционального взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами. Показано, что взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами усилены как в стриатуме постмортальных образцов больных шизофренией, так и на генетической модели шизофрении - 100P/100P линии мышей.

Установлены антипсихотические свойства пептида, размыкающего усиленные взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами, корректируя шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей.

Показано взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобию у гетерозиготных 100P<sup>+</sup> мышей и внутриутробной материнской иммунной активацией (МИА), а также вклад провоспалительного цитокина, интерлейкина-6 (ИЛ-6), в патогенез шизофреноподобного поведения на гибридной модели - 100P<sup>+</sup> x МИА, верифицируя патогенность 100P мутации.

На генетической модели 100P/100P установлена отставленная манифестация шизофреноподобного поведения в возрасте 12-16 недель. Хроническое введение вальпроата до начала проявления шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей предотвращало психопатологическое поведение. По данным транскриптомного анализа отделов головного мозга идентифицирован глиатрансмиттер липокалин-2 (Lcn2), вовлечённый в эффекты 100P мутации, вальпроата и их совместном взаимодействии. Установлены достоверные корреляционные сопряжения уровней Lcn2 с количеством астроцитов и сенсорно-моторной фильтрацией информации у 100P/100P генетической линии мышей. Данные корреляционного анализа указывают, что Lcn2 может являться молекулярным индексом ранней диагностики шизофрении, а также терапевтической мишенью для создания превентивной терапии данного заболевания.

**Теоретическая и практическая ценность работы.** Теоретическая и практическая значимость работы определяется доказательством соответствия генетической линии 100P/100P критериям модели шизофрении, возможности её использования для исследований молекулярно-клеточных и нейробиологических механизмов шизофрении, связанных с нарушением нейроразвития, а также дофаминергической системы головного мозга. Использование 100P/100P генетической модели шизофрении также полезно для оценки эффективности терапевтических воздействий как в целях предотвращения развития заболевания, так и его лечения. Выявленные в работе эффекты PDE4, GSK-3 блокаторов и пептида TAT-D2пер демонстрируют терапевтический потенциал данных соединений в качестве будущих антипсихотических препаратов. Разработана гибридная модель шизофреноподобного поведения, сочетающая в себе генетический (100P<sup>+</sup>) и средовой (Материнская Иммунная Активация) факторы и которая также может быть использована в доклинических исследованиях шизофрении. Выявленная взаимосвязь между Lcn2, уровнем астроцитов и проявлением шизофреноподобного поведения на генетической модели 100P/100P указывает на важность нейроглиальных взаимодействий в патогенезе данного заболевания, а Lcn2 может быть предложен в качестве биомаркера для дальнейших исследований в области разработки биомаркеров для ранней диагностики шизофрении и молекулярных мишеней для создания превентивной терапии.

**Апробация результатов.** Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, представлены и обсуждены на: 10й международной конференции по биоинформатике геномной регуляции и структурной\системной биологии (BGRS-2016, Новосибирск, Россия, 2016); XII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Россия, 2016); 14м международном конгрессе по исследованиям шизофрении (Флорида, США, 2013); международной конференции сообщества «Стресс и поведение» (Петербург, Россия, 2013); международной конференции “NeuroDevNet Brain Development” (Торонто, Канада, 2012); международной конференции “Society for Neuroscience” (Вашингтон, США, 2011; Чикаго, США, 2009); международной конференции “DISC1-2010” (Эдинбург, Шотлан-

дия, 2010); международной конференции “Winter Brain Conference” (Солт-Лэйк Сити, США, 2009); международной конференции «Neurons and Brain Disease» (Торонто, Канада, 2007).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 15 статей в лицензируемых журналах, 3 главы в книгах, по теме диссертации издана 1 книга под редакцией автора.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащей 567 источников. Работа изложена на 219 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц, 45 рисунков и 1 приложения.

**Личный вклад автора.** В цикле исследований, составляющих диссертационную работу, автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследований, разработке экспериментальных подходов, в анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования – от постановки задачи и проведения экспериментов, до анализа, обсуждения и оформления всех полученных результатов.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность д.б.н. Амстиславской Т.Г. за поддержку и помощь в написании диссертации. С особой признательностью автор благодарит научных сотрудников Научно-Исследовательского Института им. Люненфельда-Таненбаума и Университета г. Торонто за плодотворную совместную работу: проф. Джона Родера – за поддержку и обсуждение научных результатов; к.б.н. Стивена Клапкота – за инициацию сотрудничества с биоресурсом RIKEN; проф. Майлса Хуслей – за оценку межбелковых взаимодействий DISC1 x PDE4B, используя HEK293 клеточную линию; проф. Альберта Вонга – за помощь в проведении транскриптомного анализа; проф. Фэнг Лью и к.б.н. Шупенга Ли – за оценку межбелковых взаимодействий и создание пептида, размыкающего Disc1xD2 межбелковые взаимодействия; проф. Джеймса Вудгета и к.б.н. Оксану Кайданович-Бейлин – за помощь с анализом Disc1x GSK-3 межбелковых взаимодействий; проф. Ану Мартинез – за предоставление фармакологического GSK-3 блокатора и обсуждение научных результатов; проф. Ину Вейнер – за обсуждение результатов, полученных методом латентного торможения.

### **Объекты и методы исследования**

#### **Экспериментальные животные**

В исследовании были использованы самцы генетических линий DISC1-Q31L (гомозиготные мыши 31L/31L), DISC1-L100P (гомозиготные мыши 100P/100P) и самцы дикого типа (инбредная линия C57BL/6NCrl; wild-type; WT; +/+). Данные генетические линии были получены при выполнении данной



работы в сотрудничестве с лабораторией профессора Д. Родера (г. Торонто, Канада) и центром RIKEN (Япония). 2й экзон гена *DISC1* был скринирован в центре RIKEN (Япония) на выявление точечных мутаций у 1686 животных 1го поколения, полученных от скрещивания самцов линии C57BL/6Jc1, которым был введен химический мутаген N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), с самками линии DBA/2Jc1 без введения ENU химического мутагена (Coghill et al., 2002). Было обнаружено 2 миссенс-мутации: 1я мутация *DISC1* Rgsc<sup>1393</sup> приводила к замене нуклеотида Аденин на нуклеотид Тимин в 127м триplete CAG. В результате такой замены произошла замена аминокислоты Глутамин (Q) на Лейцин (L), кодируемых данными триплетами в позиции 31й аминокислоты *DISC1* протеина (*DISC1*-Q31L). 2я мутация *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> приводила к замене нуклеотида Тимина на нуклеотид Цитозин в 334м триplete CTC. В результате такой замены произошла замена аминокислоты Лейцин (L) на аминокислоту пролин (P), кодируемые данными триплетами в позиции 100 аминокислоты *DISC1* протеина (*DISC1*-L100P). Вторым экзон гена *DISC1* идентичен у C57BL/6Jc1 и DBA/2Jc1 родительских инбредных линий мышей, подтверждая возникновение выявленных 2х точечных мутаций в результате действия ENU мутагена. Гетерозиготные мыши 2го поколения (N2), полученные в результате скрещивания гетерозиготных самцов Q31L<sup>+/-</sup> и 100P<sup>+/-</sup> 1го поколения с самками дикого типа C57BL/6Jc1, подвергались обратному скрещиванию с самками дикого типа C57BL/6Jc1 4 поколения (N3-N6). Затем гетерозиготы с преобладающим генетическим фоном от C57BL/6J (98.4375% у N6 поколения) скрещивались между собой для получения гомозиготных (31L/31L; 100P/100P), гетерозиготных (31L<sup>+/+</sup>; 100P<sup>+/+</sup>) и гибридных (31L/100P) мышей. Гетерозиготные мыши обеих линий в дальнейшем также подвергались обратному скрещиванию до 10-15го поколения для элиминирования дополнительных мутаций. Генотипирование 31L мутации осуществлялось согласно ПЦР протоколу с использованием праймеров: F: 5'-GGC ACC AAC TTT CTT TTG GT-3' и R: 5'-ACA AGG GAG CTC TTG AGA AAA-3'. 100P мутацию генотипировали, используя праймеры: F, 5'-AGA CCA GGC TAC ATG AGA AGC-3' и R: 5'-AAG CTG GAA GTG AAG GTG TCT-3'.

В эксперименте использованы гетерозиготные, гомозиготные мыши двух *DISC1* генетических линий (31L/31L, 100P/100P) и мыши дикого типа (+/+ или C57BL/6Nc1), в возрасте 2.5 - 4 мес., полученные из разведения гетерозиготных пар. Мыши содержались в виварии в стандартных пластиковых клетках по 5 животных. В экспериментальной комнате был установлен регулярный световой режим 12:12 (свет с 9:00 часов: темнота с 21:00 часов) и поддерживалась температура около 23°C. Пищу (гранулы (Purina mouse chow)) и воду животные получали в неограниченном количестве. Все экспериментальные процедуры были одобрены этическим комитетом института, в котором выполнялось исследование.

### **Поведенческие тесты**

Эксперименты проводили с 9 утра до 17 часов вечера. Субъективные тесты (например, тест «Приподнятого крестообразного лабиринта», «социальная мотивация и распознавание», «принудительное плавание») записывали на ви-

део, и затем видео материалы анализировали с помощью программы (Observer 5.0, Noldus Information Technology, Netherland). Протоколы поведенческих методик подробно описаны в статьях (Clapcote, Lipina et al., 2007).

Эмоционально-тревожное поведение оценивали в тестах «Открытое поле», Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). «Поведенческое отчаяние» оценивали в тесте «принудительного плавания». Ангедония-подобные процессы выявляли с помощью теста «Предпочтение сахарозы», где мышам предлагался свободный выбор между бутылочкой с водой и 5% раствором сахарозы.

Анализ социального поведения проводили с помощью теста «Социальная мотивация и социальное распознавание». Вкратце, тестирование состояло из трех сессий, между сессиями мышь возвращалась в домашнюю клетку на 1-2 минуты: 1. *Адаптация*. Мышь помещали в экспериментальную установку на 5 минут. 2. *Сессия 1 («Социальная мотивация»)*. В один из полых цилиндров помещали «партнёра 1» (незнакомая мышь дикого типа, того же пола, возраста и веса, что и тестируемое животное), в другой цилиндр помещали нейтральный предмет без запаха и вкуса). Тестируемая мышь помещалась в центр установки и регистрировали продолжительность и число заходов в каждый отсек установки в течение 10 минут. 3. *Сессия 2 («Социальное распознавание»)*. Затем нейтральный предмет заменяли второй незнакомой мышью («партнёр 2» - мышь дикого типа, того же пола, возраста и веса, что и тестируемое животное). Соответственно, в сессии 2 тестировали реакцию животного в ответ на уже знакомого «партнёра 1» и нового «партнёра 2» в течение 10 минут.

Когнитивное поведение оценивали в таких тестах как 1) Престимульное торможение акустической реакции вздрагивания (PPI); 2) Латентное торможение памяти страха; 3) Т-образный лабиринт и 4) долговременное пространственное обучение и память в водном лабиринте Морриса. Подробное описание методов представлено в публикациях (Clapcote, Lipina et al., 2007; Lipina et al., 2012)

### **Биохимические методы**

Вестерн блоттинг. Мышь декапитировали, выделяли на льду необходимые отделы головного мозга и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейших биохимических исследований. В день эксперимента ткань головного мозга гомогенизировали в RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology) содержащим физиологический раствор забуференный Tris, 1% Nonidet P-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS (додецил сульфат натрия), 0.004% азид натрия, PMSF (фенилметилсульфонилфторид), ортованадат натрия, смесь ингибиторов протеаз (Roche Applied Science) и фосфотаз (Sigma), затем центрифугировали при 10 000 об/мин 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию протеинов определяли в супернатанте по Брэдфорду (Protein Assay, BioRad). Супернатанты хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения вестерн блоттинга. Равное количество протеинов (20-40 мкг) кипятили в буфере Лэммли, затем для разделения денатурированных протеинов проводили электрофорез в 10-15% полиакриламидном геле и осуществляли перенос протеинов на ПВДФ (поливинилидендифторид) мембрану (Life Sciences). Блокирование неспецифических связываний осуществлялось при помещении мембраны в раз-

бавленный раствор бычьего сывороточного альбумина с небольшим содержанием детергента Tween 20. После блокирования на мембрану наносился раствор первичных антител для инкубации в течение 10-12 часов при 4°C. Использовали следующие антитела: anti-phospho-GSK-3a/b Ser21/9 (1:1000, Cell Signaling Technology); anti-GSK-3 $\beta$  (1:1000, Invitrogen), anti-GSK-3a (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-D2R (1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-LCN2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti- $\beta$ -catenin (1:2000, BD Biosciences), anti-GAPDH (1:10,000, Abcam). Детекцию осуществляли с помощью вторичных антител, связанных с пероксидазой хрена и хемилюминесцентного реагента (ThermoScientific) и анализировали с помощью денситометрического метода, используя ImageJ программу. Данные нормализовали к  $\beta$ -catenin или GAPDH.

Коиммунопреципитацию проводили согласно протоколу, описанному ранее (Lipina et al., 2011).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), определение плотности высокочувствительных дофаминовых рецепторов D<sub>2</sub><sup>high</sup>, а также *in vivo* микродиализ выполнялись как описано ранее (Lipina et al., 2010; Niwa et al., 2010).

Определение цитокинов проводилось иммуноферментным анализом ELISA как описано ранее (Lipina et al., 2013).

Анализ экспрессии генов с помощью микрочипов состоял из нескольких этапов: выделение РНК; подготовка мишеней и гибридизация микрочипов; анализ гибридизации микрочипов; и подтверждение результатов гибридизации микрочипов количественной RT-PCR. Подробное описание метода представлено в публикации (Lipina et al., 2012).

Иммуногистохимия. После анестезией пентобарбиталом (120 мг/кг) мышей перфузировали 4% раствором периодата-лизиниа-параформальдегидом при 4°C. Затем делали сагиттальные срезы парафиновых образцов мозга 5 мм толщиной, де-парафинировали срезы при обработке ксиленом и регидрировали этанолом. После блокировки срезов раствором Dako, срезы инкубировали с первичными антителами в течение 15 часов (метка для делящихся клеток - rabbit anti-ki67, Lab Vision, 1:200; метка для нейронов - anti-NeuN, Chemicon, 1:200; метка для глиальных клеток - anti-GFAP, COVANCE, 1:200), затем проводили инкубацию с вторичными антителами (goat anti-rabbit IgG, Vector Labs, 1:200) и третичными антителами (ABC, Vector labs, 1:50). Детекцию DAB окраски (коричневый цвет) регистрировали с помощью микроскопа Aperio ScanScopeXT (Aperio Technologies, USA). Апоптоз оценивали с помощью метки TUNEL (Roche Applied Science), используя инструкцию производителя. Меченные клетки идентифицировали и анализировали с помощью программы Aperio ImageScope.

Конфокальная микроскопия. После анестезии и перфузии, как описано выше, выделяли головной мозг, помещали в 4% параформальдегид (ПФА) на 24 часа и нарезали 100 мкм сагиттальные срезы на вибраторе. Затем срезы мозга помещали в 4% раствор бычьего сывороточного альбумина, 0.1% Тритон-X 100, натрий-фосфатный буфер на 15 минут. Первичные антитела (rabbit anti-

LCN2 polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:100 и mouse anti-GFAP (1:250) инкубировали как свободно плавающие срезы 48 часов при 4°C. Затем срезы промывались 3 раза по 10 минут в растворе блокирующим пермеабиллизацию и инкубировали со вторичными антителами (rabbit LCN2-CY5, 1:200 или mouse GFAP-CY2, 1:200) 2 часа при 20°C. После инкубации срезы промывали (3 x 10 мин), и фиксировали на стекло для приготовления слайда. Все меченые срезы просматривали на конфокальном микроскопе (Zeiss LSM 510), и анализировались, используя программу Nikon EZ-C1 FreeViewer v3.9. Для количественной оценки использовали 3-5 мышей на генотип и 4 среза на мышь.

### **Фармакологические препараты**

Клозапин (3 мг/кг; Tocris), галоперидол (0.4 мг/кг, 0.8 мг/кг; Tocris), TDZD-8 (2.5 мг/кг, 7.5 мг/кг, 15 мг/кг) растворяли в физиологическом растворе, содержащем 0.3% Tween 20 (BioRad). Бупропион (4 мг/кг; Sigma) растворяли в дистиллированной воде. Ролипрам (0.5 мг/кг; Sigma) растворяли в физиологическом растворе, содержащем 10% DMSO. D-амфетамин сульфат (0.5 мг/кг, 1.0 мг/кг, 2.5 мг/кг, подкожно, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada; дозы рассчитывали как соединение соли), вальпроат (200 мг/кг) растворяли в физиологическом растворе. Все препараты приготавливали в день эксперимента и вводили интраперитонеально (за исключением амфетамина, который вводили подкожно) в объеме 10 мл/кг. Используемые препараты вводили за 30 минут до тестирования, за исключением TDZD-8, который вводили за 5 минут до тестирования, и амфетамина, который вводили непосредственно перед тестированием. Доза клозапина была выбрана на основе литературы (Lipina et al 2005). Дозы галоперидола, бупропиона, ролипрама, TDZD-8 и вальпроата были выбраны согласно ранее опубликованных исследований на мышах (David et al., 2003; Egashira et al., 2005; Pouzet et al., 2005; Zhang et al., 2002; Beaulieu et al., 2004; Tremolizzo et al., 2005). При оценке эффектов препаратов в тесте латентного торможения, их вводили перед двумя сессиями – пре-экспозицией и обуславливанием. В тесте «Вынужденного плавания» ролипрам вводили 8 дней и за 30 мин перед тестированием. Вальпроат вводили дважды в день в течение 14 дней (Tremolizzo et al., 2005).

**Введение PolyI:C и антител к интерлейкину-6 (ИЛ-6):** PolyI:C (в форме соли натрия; Sigma-Aldrich) растворяли в буфере PBS (5 мг/кг и 2.5 мг/кг) и вводили в хвостовую вену при слабом физическом ограничении движения в объеме 5 мл/кг. Экспериментальным животным (самки WT и 100P/100P на 9 день беременности) внутривенно вводили 2.5 мг/кг polyI:C, часть животных получала также совместно с polyI:C 100 мкг антител к ИЛ-6 (anti-IL-6; rat IgG1; R&D Systems) свежерастворенных в 200 мкл PBS (Smith et al., 2007). Контрольные животные получали введение 200 мкл PBS.

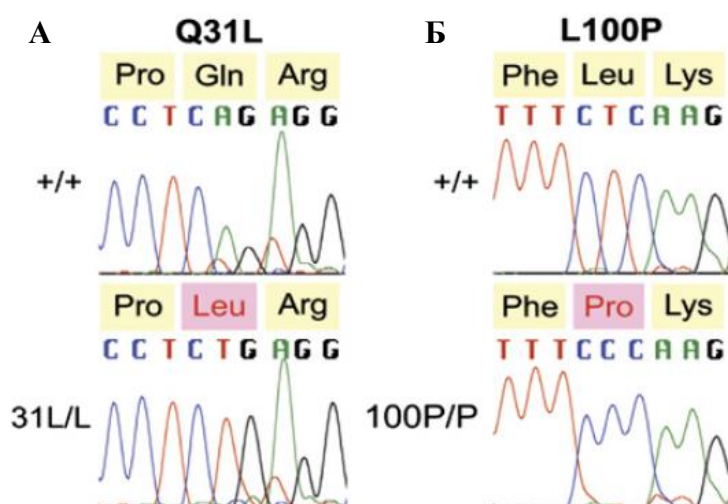
### **Статистика**

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistical10. Поведенческие данные были проанализированы с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA, с повторными измерениями, где необходимо, и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом (LSD критерий Фишера). Морфометрические данные анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**1. Создание двух генетических линий мышей с точечными мутациями во 2м экзоне гена DISC1**

Ген *DISC1* состоит из 13 экзонов, среди которых 2 экзон является самым длинным, он представлен во всех известных изоформах *DISC1* и кодирует основную часть «головного» домена белка *DISC1* (Millar et al., 2005). При сотрудничестве с биоцентром RIKEN был отсканирован 2 экзон гена *DISC1* на мутации у 1681 самцов-потомков 1го поколения, полученного от скрещивания ENU-мутагенизированных C57BL/6Jc1 самцов с DBA/2Jc1 самками, которые не получали введения ENU мутагена. Мутантный транскрипт *DISC1*<sup>Rgsc1393</sup> имел 127A – Т трансверсию (Рис. 1А), что приводило к замене аминокислоты глутамин (Q) на лейцин (L) в позиции 31 аминокислоты протеина *DISC1*. В то время как мутантный транскрипт *DISC1*<sup>Rgsc1390</sup> имел 334Т – С трансверсию (Рис. 1Б), вызывая замену аминокислоты лейцин (L) на пролин (P) в позиции 100 аминокислоты протеина *DISC1*. Последовательность 2 экзона у мышей линии C57BL/6Jc1 и DBA/2Jc1 идентична, предполагая, что обе точечные мутации возникли вследствие введения ENU мутагена. Затем, гетерозигот N2, потомки скрещивания выявленных самцов-мутантов Q31L и L100P с самками дикого типа C57BL/6Jc1, скрещивали с мышами C57BL/6J инбредной линии в течение 4х поколений (N3-N6) для максимального соответствия генома C57BL/6J инбредной линии (геном N6 поколения на 98.4375% соответствует C57BL/6J инбредной линии). Гетерозиготы 6го поколения скрещивали между собой для создания гомозиготных (31L/31L; 100P/100P), гетерозиготных (31L/+; 100P/+) и гибридных (Q31L/L100P) мышей, для дальнейшего фенотипирования. Животные всех исследуемых генотипов жизнеспособны и не различимы от мышей дикого типа по морфо-анатомическим признакам.



**Рис. 1.** Хроматограмма ДНК последовательности, показывающая точечные мутации во 2м экзоне гена *DISC1*. **А.** Трансверсия 127А – Т меняет кодон САG, кодирующий глутамин (Gln) на кодон СТG, кодирующий лейцин (Leu) в позиции 31 а.к. *DISC1* белка. **Б.** Трансверсия 334Т – конвертирует кодон СТC, коди-

рующий лейцин (Leu) на кодон ССС, кодирующий пролин (Pro) в позиции 100 а.к. DISC1 протеина.

## 2. Шизофреноподобное поведение 100P/100P линии мышей

*Гиперактивность в тесте «Открытое поле».* ANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние генотипа [ $F(4,48) = 4.0$ ;  $p < 0.01$ ] и временных интервалов [ $F(5,240) = 6.7$ ;  $p < 0.001$ ] на горизонтальную активность в данном тесте. Горизонтальная двигательная активность была выше у 100P/100P мутантов на протяжении всех 30 минут ( $p < 0.05$  на 10-15, 20-25 и 25-30 минуты по сравнению с мышами дикого типа) (Рис. 2А). Животные всех остальных генотипов не отличались по данному показателю от WT мышей.

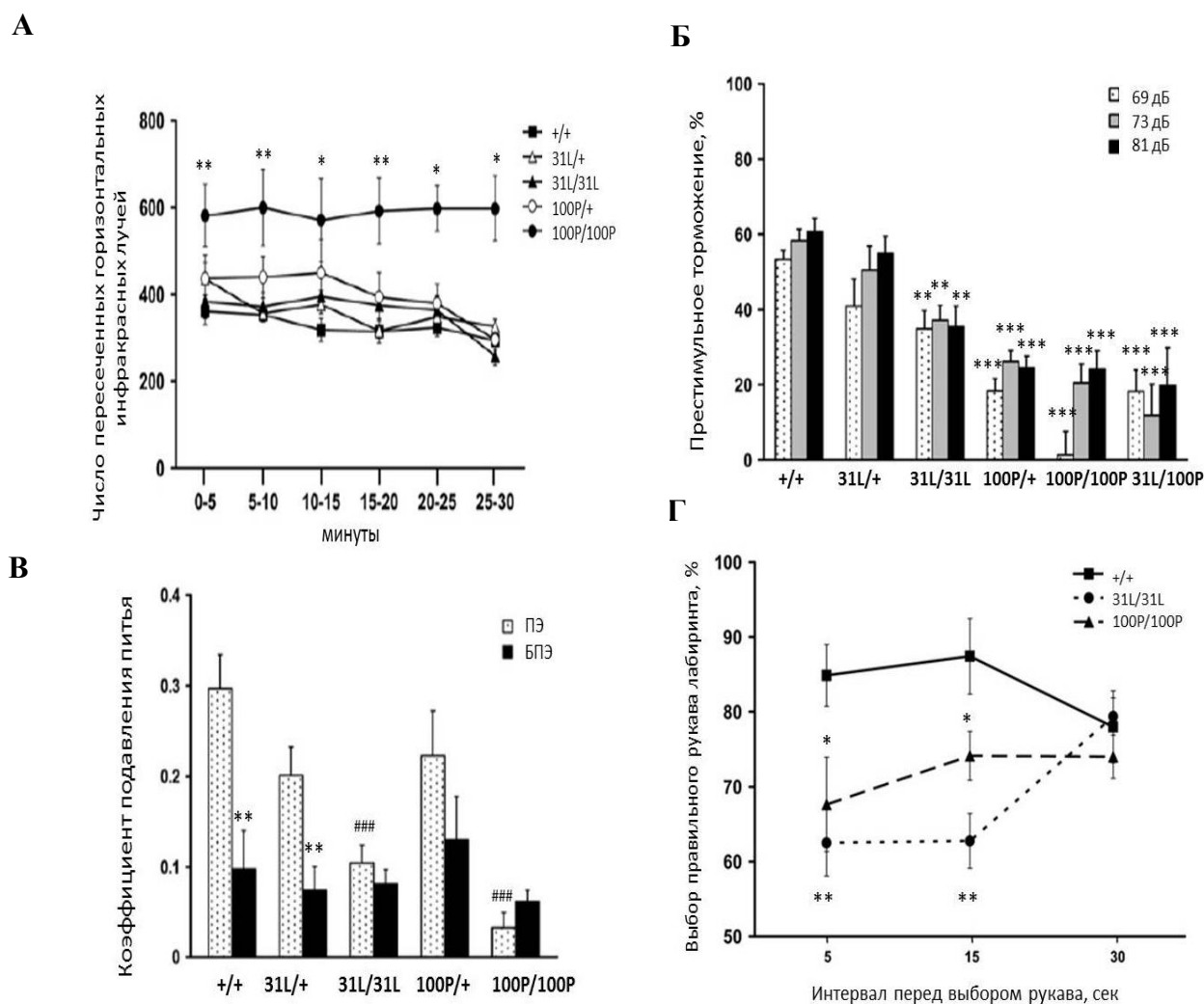
*Дефицит престаимпульного торможения реакции вздрагивания (PPI).* ANOVA с повторными измерениями выявил достоверный эффект престаимулов [ $F(2,240) = 4.9$ ;  $p < 0.01$ ], генотипа [ $F(5,120) = 11.2$ ;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействий [ $F(10,240) = 2.7$ ;  $p < 0.01$ ] на процент престаимпульного торможения реакции вздрагивания. Дефицит престаимпульного торможения наблюдался у мышей 31L/31L, 100P/+, 100P/100P и 31L/100P генотипов по сравнению с контрольными животными дикого типа (Рис. 2Б). ANOVA также обнаружил достоверный эффект генотипа на интенсивность реакции вздрагивания без престаимулов [ $F(5,120) = 4.7$ ;  $p < 0.001$ ], которая была ниже у мышей 100P/+, 100P/100P и 31L/100P генотипов по сравнению с WT мышами. Корреляционный анализ не выявил достоверной зависимости процента престаимпульного торможения реакции вздрагивания от интенсивности вздрагивания ( $r = 0.16$ ;  $p = 0.14$ ). Дефицит престаимпульного торможения у 100P/+ и 100P/100P мышей не связан с нарушением слуха, поскольку порог слуховой реакции ствола головного мозга у 100P/100P мышей ( $40 \pm 2.6$ ) не отличался от мышей дикого типа ( $46 \pm 5.1$ ).

*Дефицит латентного торможения памяти страха.* Мыши изучаемых генотипов не отличались от контрольных животных по питьевому поведению во время сессии приучения животных к питью в оперантной камере, а также по скорости выполнения 25 «слизываний» (50-75) перед подачей обусловленного тона в день тестирования ( $p$ 's  $> 0.05$ ; общее среднее значение «А периода» = 7.35 сек.). MANOVA выявил достоверный эффект фактора пре-экспозиции (ПЭ) к тону [ $F(1,96) = 11.2$ ;  $p < 0.001$ ], а также генотипа [ $F(4,96) = 4.2$ ;  $p < 0.01$ ] на соотношение А/Б (коэффициент подавления питья). Дефицит латентного торможения продемонстрировали 31L/31L, 100P/+ и 100P/100P линии мышей (Рис. 2В), однако память страха (замирание в ответ на обусловленный тон и увеличение времени выполнения 25 «слизываний») проявили экспериментальные мыши без пре-экспозиции (БПЭ) всех генотипов, исключая общие когнитивные нарушения.

*Дефицит рабочей памяти в «Т-образном лабиринте».* ANOVA выявил достоверный эффект генотипа [ $F(2,22) = 7.56$ ;  $p < 0.01$ ] на выбор правильного рукава лабиринта. 100P/100P мутанты требовалось существенно больше времени, чем мышам дикого типа и 31L/31L, чтобы осуществлять правильный выбор в 70% ежедневных тренировок в течение 3х последовательных дней. ANOVA

выявил достоверное влияние генотипа [ $F(2,22) = 9.6$ ;  $p < 0.001$ ] на выбор правильного рукава лабиринта. Мутантные мыши 31L/31L и 100P/100P существенно реже выбирали правильный рукав Т-лабиринта при кратковременных интервалах (5 сек. и 10 сек.) по сравнению с мышами дикого типа (Рис. 2Г), однако не отличались от контрольных животных по данному показателю при 30 сек. интервале.

*Пространственное обучение и память в тесте «Водный лабиринт Морриса».* ANOVA с повторными измерениями не обнаружил достоверного влияния генотипа как на латентный период нахождения платформы во время обучения, так и на процент времени, проведенном в сегменте, где накануне находилась платформа во время тестирования ( $p's > 0.05$ ).



**Рис. 2.** Мыши линии 100P/100P проявляют: **А.** гиперактивность в тесте «открытое поле»; **Б.** дефицит пре-стимульного торможения; **В.** Дефицит латентного торможения памяти страха, которое выражается в разнице коэффициента подавления питья между экспериментальной группой с пре-экспозицией к тону (ПЭ) по сравнению с группой без пре-экспозиции (БПЭ) (\*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с ПЭ внутри генотипа; ### -  $p < 0.001$  – по сравнению с ПЭ мышью дикого типа) и **Г.** дефицит рабочей памяти в Т-образном лабиринте при использовании 5 сек., 10 сек. и 30 сек. интервалов перед выбором рукава лабиринта. 50% выбор является случайным. \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

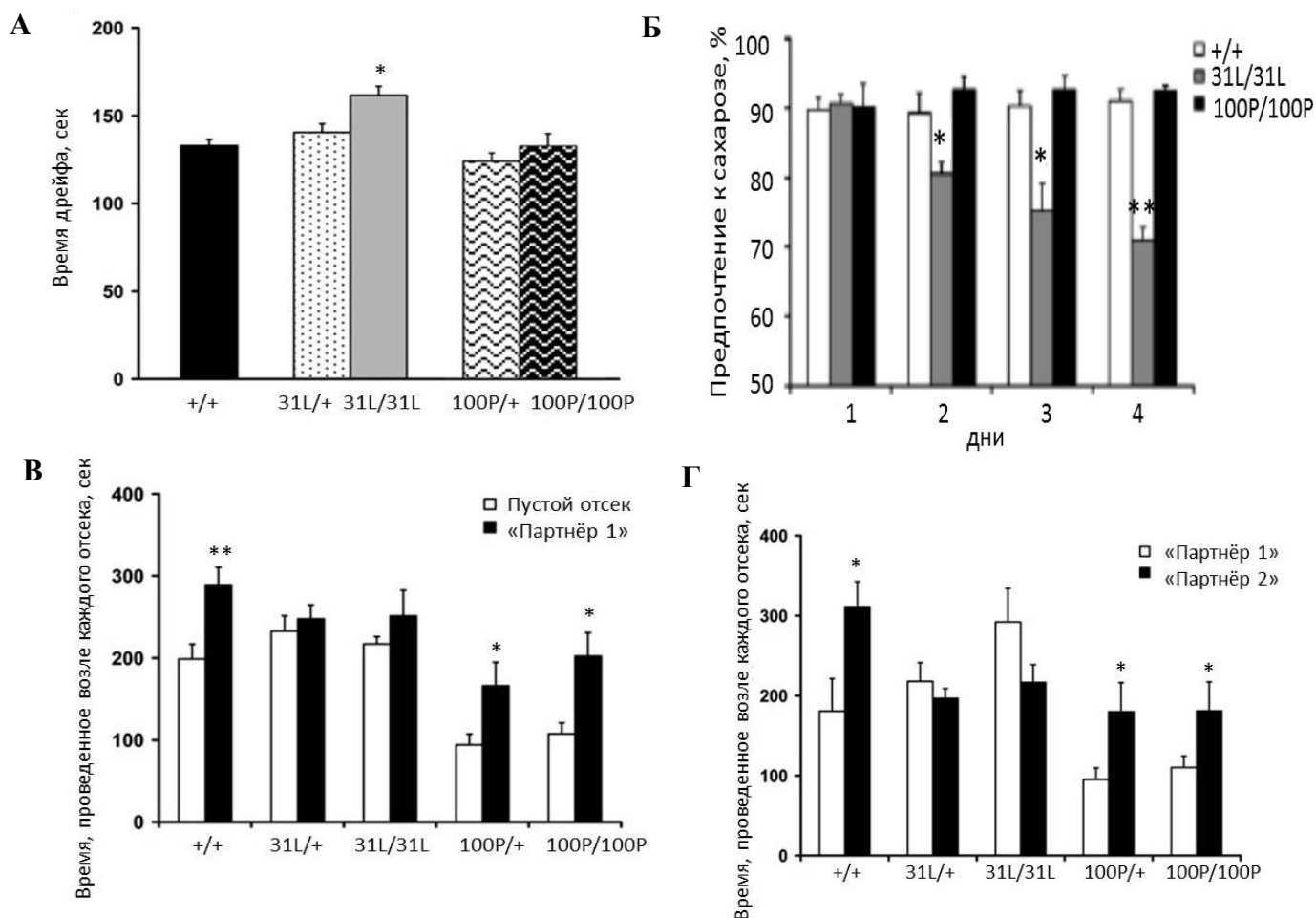


### 3. Депрессивно-подобное поведение 31L/31L линии мышей

*Повышенное «поведенческое отчаяние» в тесте «Принудительного плавания».* ANOVA выявил достоверное влияние генотипа [ $F(4,86) = 3.3$ ;  $p < 0.05$ ]. Продолжительность дрейфа в данном тесте была выше у 31L/31L мышей (Рис. 3А) по сравнению с контрольными животными.

*Дефицит социальной мотивации и социального распознавания.* ANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние генотипа [ $F(4, 28) = 9.6$ ;  $p < 0.001$ ] и присутствие «партнёра 1» [ $F(1,28) = 4.1$ ;  $p < 0.01$ ] на время пребывания возле отсека с «партнёром 1». Мыши 31L/+ и 31L/31L генотипов проводили одинаковое количество времени как возле пустого отсека установки, так и возле отсека с «партнёром 1» (Рис. 3В), в то время как мыши дикого типа и 100P/+ и 100P/100P генотипов продемонстрировали предпочтение «партнёра 1». ANOVA с повторными измерениями обнаружил существенное влияние генотипа [ $F(4,28) = 7.9$ ;  $p < 0.001$ ], присутствие незнакомого «партнёра 2» [ $F(1,28) = 5.9$ ;  $p < 0.05$ ] и также их взаимодействия [ $F(4,28) = 4.8$ ;  $p < 0.01$ ]. Мутантные мыши 31L/+ и 31L/31L генотипов в равной степени проявили интерес к знакомому «партнёру 1» и новому «партнёру 2» (Рис. 3Г), в то время как мыши дикого типа и 100P/+ и 100P/100P генотипов предпочитали больше времени оставаться возле «партнёра 2».

*Дефицит предпочтения 10% сахарозы.* ANOVA обнаружил достоверное влияние генотипа [ $F(2,17) = 28.4$ ;  $p < 0.001$ ], дня тестирования [ $F(3,51) = 5.4$ ;  $p < 0.01$ ] и их взаимодействий [ $F(6,51) = 8.4$ ;  $p < 0.001$ ] на предпочтение сахарозы. 31L/31L мыши существенно меньше потребляли 10% раствор сахарозы, чем мыши дикого типа или 100P/100P, начиная со 2го дня тестирования (Рис. 3Б).



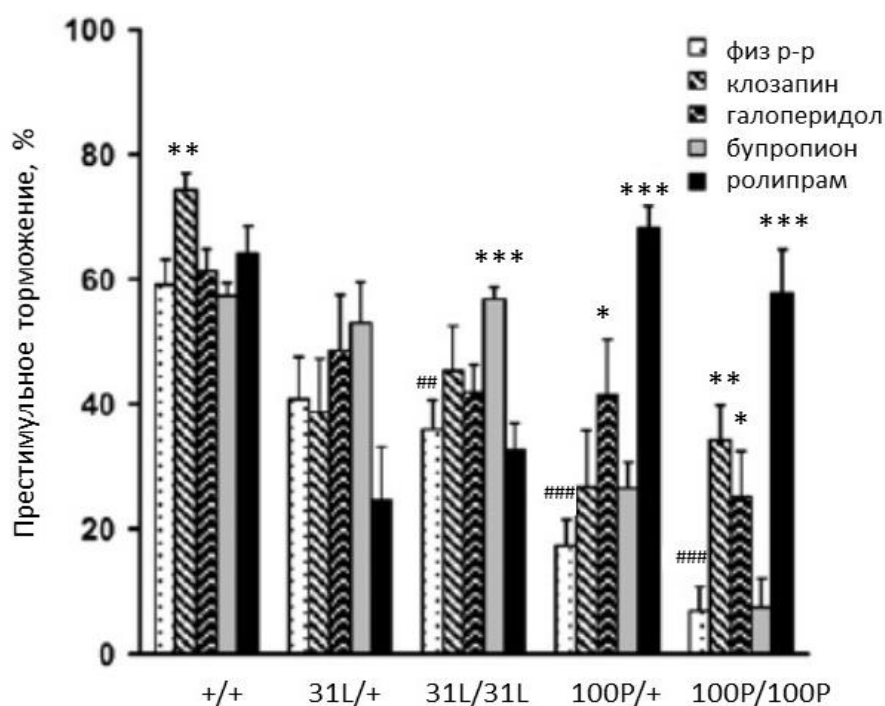


**Рис. 3.** Депрессивно-подобное поведение мышей линии 31L/31L в тестах: **А.** «Принудительного плавания»; **Б.** «Предпочтение к сахарозе», **В.** Социальная мотивация и **Г.)** Социальное распознавание. \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

#### 4. Фармакологические эффекты антидепрессантов и антипсихотиков на поведение 31L/31L и 100P/100P линий мышей

Влияние клозапина (3 мг/кг), галоперидола (0.4 мг/кг), бупропиона (4 мг/кг), ролипрама (0.5 мг/кг) на дефицит престаимпульного торможения у DISC1 мутантных мышей

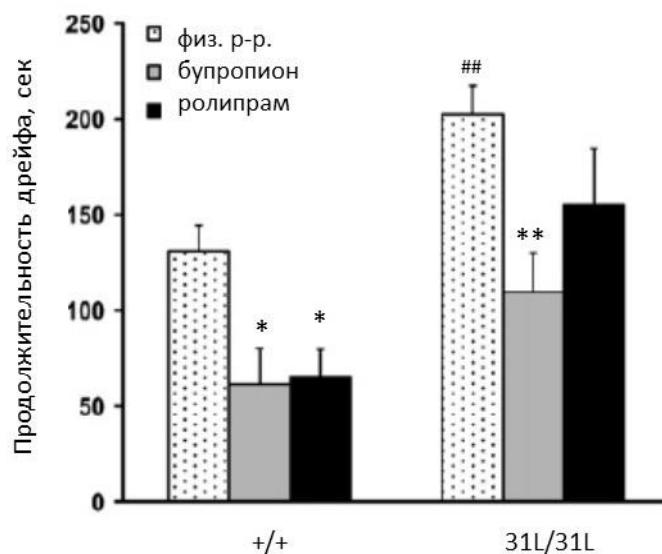
MANOVA идентифицировал влияние генотипа [ $F(4,290) = 23.4$ ;  $p < 0.001$ ], фармакологических препаратов [ $F(4,290) = 6.2$ ;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействий [ $F(16,290) = 5.2$ ;  $p < 0.001$ ] на престаимпульное торможение реакции вздрагивания. Как оказалось, антипсихотики не оказали действия на дефицит престаимпульного торможения у линии 31L/31L, в то время как клозапин и галоперидол существенно улучшали нарушение престаимпульного торможения у линии 100P/100P ( $p < 0.01$  и  $p < 0.001$ , соответственно (Рис. 4). В то время как введение ролипрама 100P/+ и 100P/100P полностью восстановило их дефицит престаимпульного торможения до контрольного уровня.



**Рис. 4.** Фармакологическая эффективность антипсихотиков, антидепрессантов и ролипрама на дефицит престаимпульного торможения реакции вздрагивания у DISC1 мутантных мышей и мышей дикого типа (+/+). Данные представлены в виде среднего значения трех престаимулов для каждой экспериментальной группы +/+ ( $n = 11-16$ ); 31L/+ ( $n = 10-24$ ); 31L/31L ( $n = 10-16$ ); 100P/+ ( $n = 10-22$ ); 100P/100P ( $n = 11-17$ ). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с введением физ. р-ра внутри каждого генотипа; ## -  $p < 0.01$ ; ### -  $p < 0.001$  – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. р-ра.

*Влияние антидепрессанта - бупропион (4 мг\кг) и ролипрама (0.5 мг\кг) на депрессивно-подобное поведение мышей линии 31L/31L*

MANOVA выявил достоверное влияние генотипа [ $F(1,38) = 10.6$ ;  $p < 0.001$ ] и препаратов [ $F(2,38) = 5.1$ ;  $p < 0.01$ ] на продолжительность дрейфа в тесте «Принужденное плавание». 31L/31L мутантные мыши на фоне введения физ. раствора продемонстрировали повышенную продолжительность иммобильности ( $p < 0.01$ ) по сравнению с контрольными животными (Рис. 5). Введение бупропиона достоверно снижало продолжительность дрейфа у мышей линии 31L/31L ( $p < 0.01$ ), в то время как введение бупропиона и ролипрама снижало иммобильность у мышей дикого типа ( $p$ 's  $< 0.05$ ).



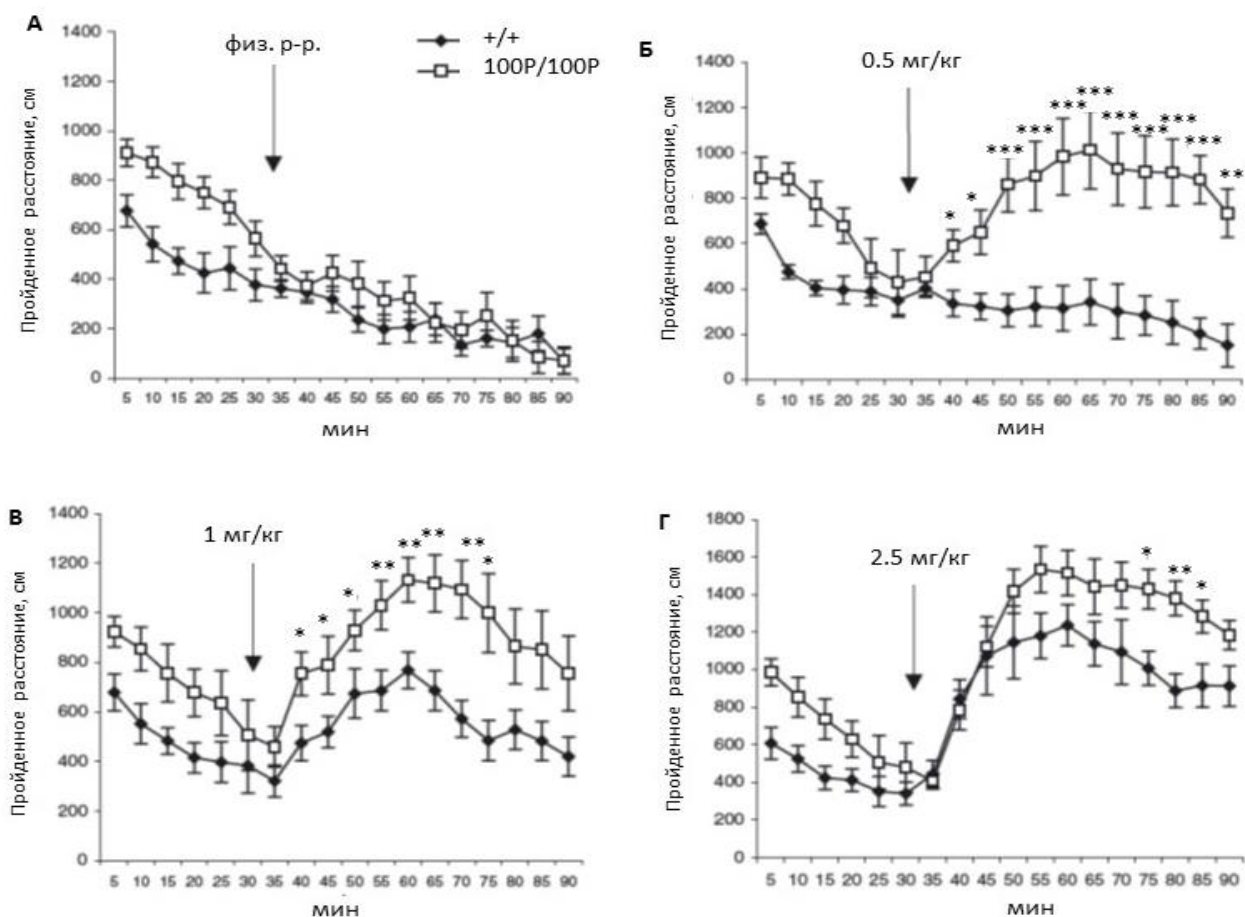
**Рис. 5.** Фармакологический эффект бупропиона (острое введение) и ролипрама (введение в течение 8 дней) на «поведенческое отчаяние» у 31L/31L мутантных мышей и мышей дикого типа (+/+). +/+ мыши на фоне физ. раствора, бупропиона и ролипрама ( $n = 6-8$ ); 31L/31L ( $n = 7-9$ ). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с физ. р-ром внутри каждого генотипа; ## -  $p < 0.01$  – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. р-ра.

Таким образом, фармако-поведенческий анализ выявил шизофреноподобное поведение у мышей линии 100P/100P и депрессивно-подобное поведение у 31L/31L мутантных животных. Следовательно, можно предположить, что действие каждой точечной мутации во 2-м экзоне гена *DISC1*, по-видимому, вызывает специфичные биохимические изменения, приводящие к тому или иному типу психопатологии. Поэтому на следующем этапе исследования представлялось важным исследовать биохимические особенности, приводящие к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P.

## 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ 100P/100P

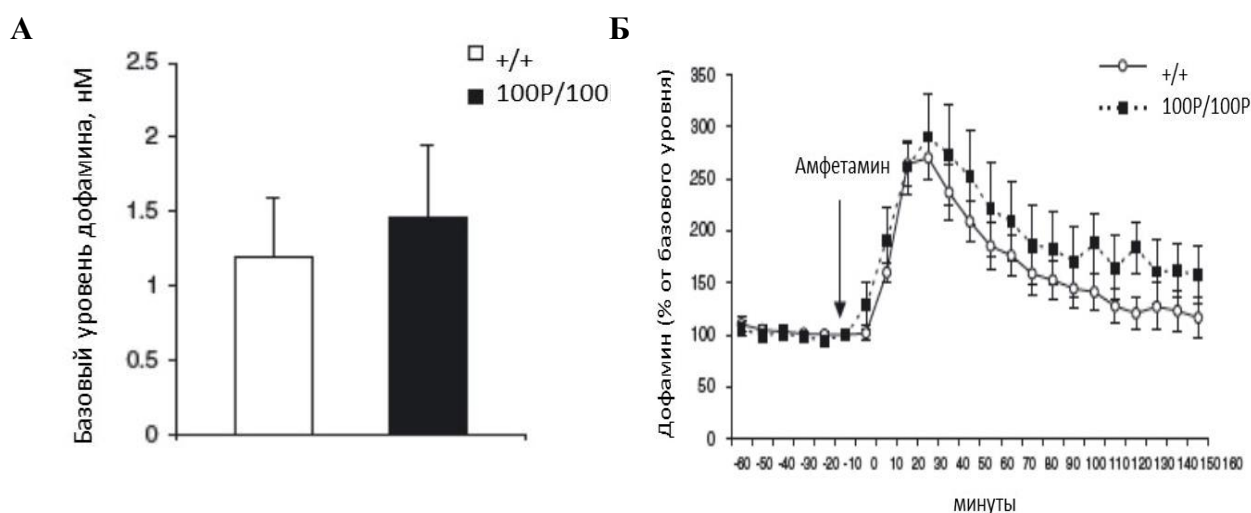
*Повышенная фармакологическая чувствительность 100P/100P мышей в ответ на амфетамин*

MANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние фактора препарата [ $F(3,49) = 18.1$ ;  $p < 0.001$ ], генотипа [ $F(1,49) = 18.8$ ;  $p < 0.001$ ], временного интервала [ $F(11,539) = 10.8$ ;  $p < 0.001$ ], препарат x временной интервал [ $F(33,539) = 3.5$ ;  $p < 0.001$ ], генотип x временной интервал [ $F(11,539) = 3.5$ ;  $p < 0.001$ ] и генотип x препарат x временной интервал [ $F(33,539) = 1.8$ ;  $p < 0.05$ ] взаимодействий на пройденное расстояние в установке «открытого поля». Амфетамин в низкой дозе (0.5 мг/кг) достоверно повышал двигательную активность у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 6Б), не оказывая действия на данный показатель у мышей дикого типа. Амфетамин в дозах 1 мг/кг и 2.5 мг/кг оказывал стимулирующее действие на двигательную активность животных двух исследуемых генотипов (Рис. 6В,Г), хотя выраженность действия психостимулянта в дозе 1 мг/кг на 100P/100P мышей сохранялась более высокой, чем у контрольной линии.



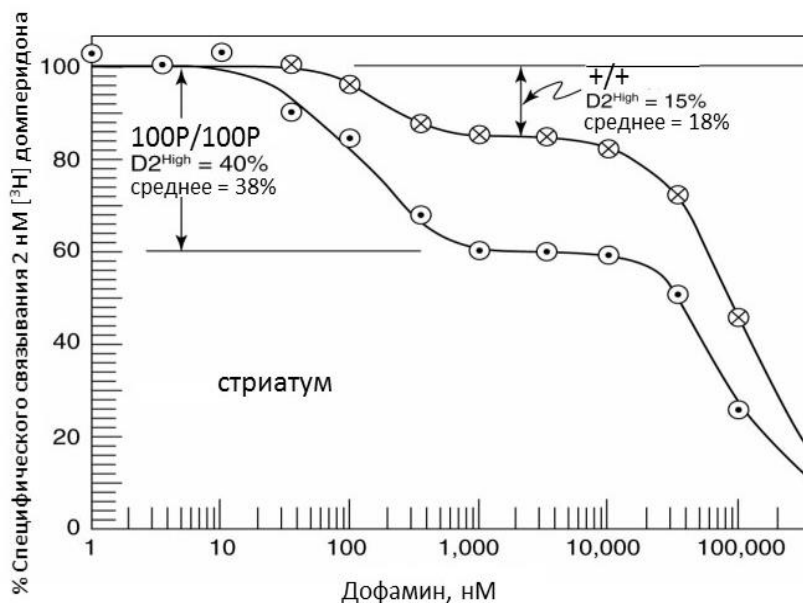
**Рис. 6.** Эффекты острого введения амфетамина (0.5 мг/кг; 1 мг/кг; 2.5 мг/кг) на двигательную активность мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантов в тесте «Открытое поле». Амфетамин повышал моторную активность в дозо-зависимой мере у мышей дикого типа (+/+;  $n = 7-10$ ) и 100P/100P ( $n = 7-9$ ) (А-Г), но только амфетамин в низкой дозе (0.5 мг/кг) вызывал гиперактивность у мутантных мышей 100P/100P (Б). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

Уровень межклеточного дофамина в стриатуме в ответ на введение амфетамина в низкой дозе (0.5 мг/кг). Рисунок 7А-Б иллюстрирует эффекты низкой дозы амфетамина на выброс дофамина в межсинаптическую щель в нейронах стриатума у мышей дикого типа и 100P/100P мутантов. Базовый уровень дофамина не отличался у экспериментальных животных двух генотипов (Рис 7А;  $p > 0.05$ ). ANOVA выявил достоверное влияние временных интервалов [ $F(16, 160) = 12.61$ ;  $p < 0.001$ ], но не генотипа [ $F(1,10) = 1.3$ ;  $p > 0.05$ ] или их взаимодействий [ $F(16,160) = 0.25$ ;  $p > 0.05$ ]. После 30 минут уровень внеклеточного дофамина составляло  $270.1 \pm 20.5\%$  у мышей дикого типа и  $290.2 \pm 40.6\%$  у 100P/100P линии у мышей (Рис. 7Б).



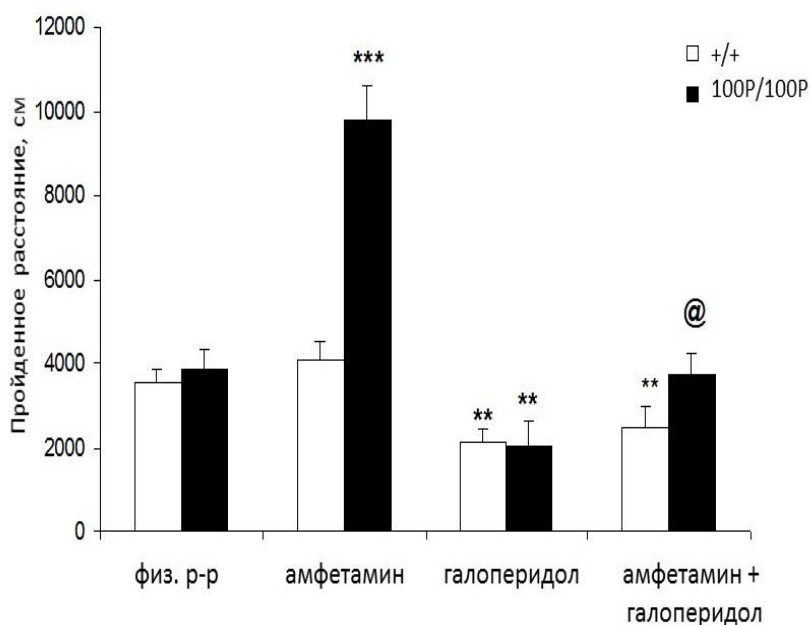
**Рис. 7.** Содержание внеклеточного дофамина как на базовом уровне (А), так и после введения амфетамина (0.5 мг/кг) (Б) у мышей дикого типа (+/+) и мутантов 100P/100P.

Плотность высокочувствительных дофаминовых рецепторов  $D2^{high}$  в стриатуме. Для дальнейшего исследования дофаминовой системы у 100P/100P линии мышей была оценена плотность высокочувствительных дофаминовых рецепторов  $D2^{high}$  в гомогенате стриатума. На Рис. 8 показано конкурентное связывание дофамина и [ $^3H$ ]-домперидона к  $D2$  рецепторам в гомогенате стриатума мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей. Неспецифическое связывание определялось в присутствии 10  $\mu M$  сульпирида. Пропорция  $D2$  рецепторов в высокочувствительном состоянии  $D2^{high}$  составила в среднем  $18 \pm 1.4\%$  в гомогенате стриатума +/+ мышей, в то время как данный показатель составил  $38 \pm 1.2\%$  у 100P/100P мышей ( $t$ -критерий = - 10.95,  $p < 0.001$ ). Плотность дофаминовых рецепторов  $D2^{high}$  повысилась на 113% у мутантных мышей. Общее число замещаемого связывания, т.е. специфическое связывание, определяемое содержанием 10  $\mu M$  сульпирида, 2 нм [ $^3H$ ]-домперидона было  $874 \pm 62$  (дезинтеграция за минуту/на фильтр) в лизате контрольных мышей, что было принято за 100% специфического связывания. Данный показатель у мутантных мышей составил  $753 \pm 85$  (дезинтеграция за минуту/на фильтр) ( $p > 0.05$ ), что достоверно не отличалось от данного параметра у контрольных мышей.



**Рис. 8.** Конкурентное связывание к D2 рецепторам между дофамином и  $[^3\text{H}]$ -домперидоном в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+) и мутантов 100P/100P. Пропорция D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии ( $\text{D2}^{\text{high}}$ ) в среднем являлась  $18 \pm 1.4\%$  в гомогенате стриатума +/+ мышей, в то время как данный показатель составил  $38 \pm 1.2\%$  у 100P/100P мышей ( $p < 0.001$ ).

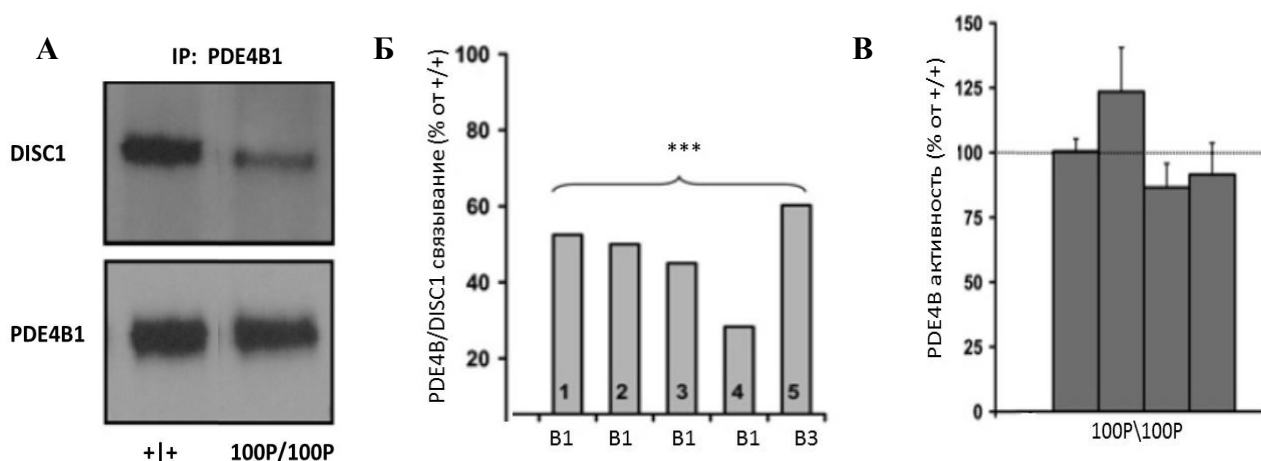
*Эффекты галоперидола (0.8 мг/кг) на гиперактивность, вызванной амфетамином.* Для оценки вклада D2 рецепторов в гиперактивность, вызванной психостимулятором, был проведен данный фармакологический эксперимент. MANOVA обнаружила достоверный эффект генотипа [ $F(1,61) = 25.7$ ;  $p < 0.01$ ], фармакологических препаратов [ $F(3, 61) = 56.1$ ;  $p < 0.001$ ], временного интервала [ $F(11, 671) = 12.6$ ;  $p < 0.001$ ], взаимодействий препарат  $\times$  временной интервал [ $F(33,671) = 5.8$ ;  $p < 0.01$ ] и генотип  $\times$  препарат  $\times$  временной интервал [ $F(33, 671) = 14.7$ ;  $p < 0.01$ ]. Введение амфетамина (0.5 мг/кг) вызывало гиперактивность у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 9), не оказывая действия на мышей дикого типа. Галоперидол эффективно блокировал эффекты амфетамина, нормализуя двигательную активность 100P/100P мутантов.



**Рис. 9.** Галоперидол (0.8 мг/кг) блокировал гиперактивность у мышей DISC1-L100P (100P/100P), вызванную амфетамином (0.5 мг/кг) ( $n = 7-10$ ). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с физ. раствором внутри каждого генотипа; @ -  $p < 0.01$  – по сравнению с 100P/100P мутантными мышами на фоне введения амфетамина.

*Межбелковые взаимодействия Disc1-L100P с PDE4B, GSK-3 и D2R*

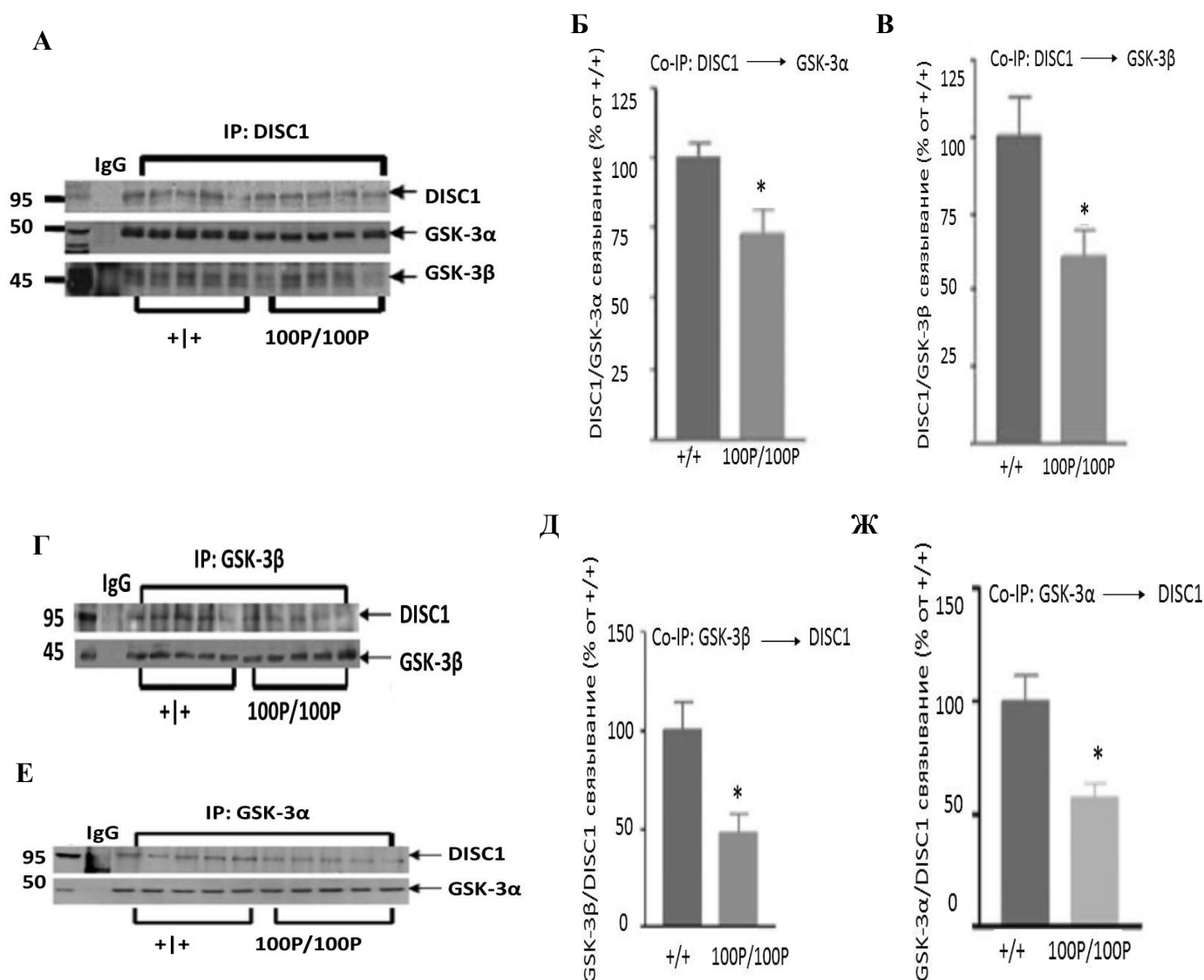
N-конец DISC1 белка связывается с UCR2 доменом PDE4B в цАМФ-зависимой манере (Millar et al., 2005). Именно, DISC1 связывает нефосфорилированный фермент PDE4B с пониженной активностью, который высвобождается в ответ на повышение уровня цАМФ и фосфорилируется с помощью PKA. Следовательно, взаимодействия между DISC1 и PDE4B модулируются внутриклеточным уровнем цАМФ. Оценка ферментативной активности PDE4B в лизатах головного мозга экспериментальных мышей не выявила изменений у 100P/100P линии (Рис. 10). В то время как взаимодействия между DISC1 и PDE4B достоверно ослаблены у 100P/100P мышей.



**Рис. 10.** Ослабленное взаимодействие между DISC1-L100P и PDE4B. **А.** Вестерн блоттинг PDE4B1 иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и PDE4B (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 100 кДа и полоса PDE4B - 80 кДа. **Б.** Ассоциация между экзогенно экспрессирующимися PDE4B изоформами и мутантным DISC1 белком. Была проведена пятикратная оценка межбелковых связываний, используя антитела к PDE4B1 (B1) и PDE4B3 (B3). Числа в каждом столбике обозначают число независимых экспериментов. Связывание PDE4B изоформ к DISC1-L100P мутантной форме протеина достоверно снижена ( $p$ 's < 0.001) по отношению к контрольному DISC1 +/+. **В.** Ферментативная активность PDE4B достоверно не отличалась между 100P/100P и +/+ в лизатах головного мозга мышей ( $n = 4$  и  $n = 4$ , соответственно). Активность представлена в виде среднего трёх независимых экспериментов. \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

Поскольку N-конец DISC1 протеина (участок между 1 и 220 а.к.) также напрямую взаимодействует с GSK-3 $\beta$ , подавляя ее активность и нарушая регуляцию Wnt/ $\beta$ -катенинового пути и пролиферацию нейрональных предшественников (Maо et al., 2009), на следующем этапе представлялось актуальным оценить эффект DISC1-L100P мутации на взаимодействие с GSK-3. Применяв метод коиммуноперцепитации, было обнаружено, что DISC1-L100P достоверно слабее взаимодействует с GSK-3 $\alpha$  и GSK-3 $\beta$  в лизатах стриатума ( $p$ 's < 0.05), снижая связывание с GSK-3 $\alpha$ , $\beta$  на ~ 30% и 40%, соответственно (Рис. 11А-В).

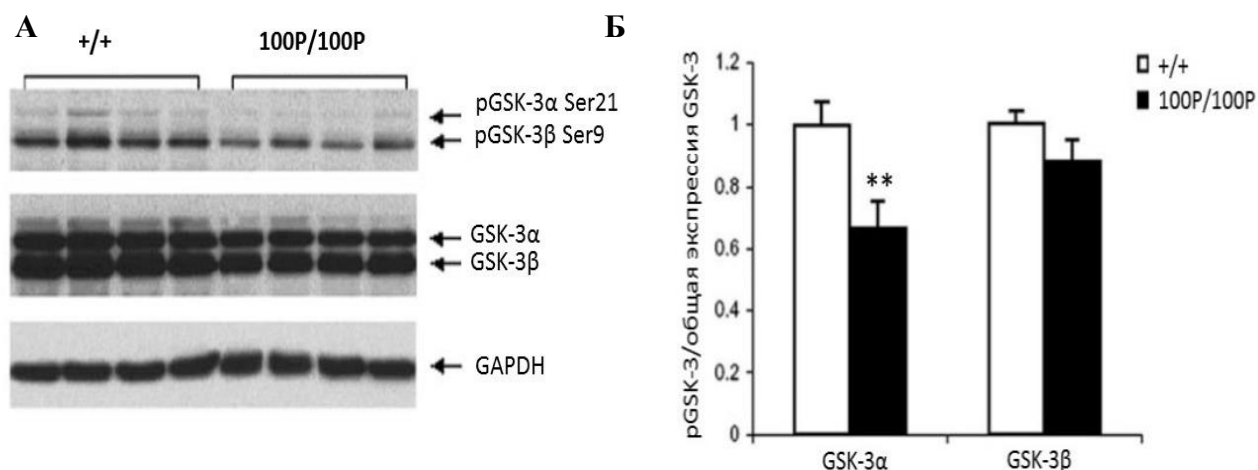
Реципрокный анализ выявил, что обе изоформы GSK-3 $\alpha$ , $\beta$  также достоверно слабее взаимодействуют с DISC1-L100P ( $p$ 's < 0.05), снижая связывание с DISC1-L100P на ~ 50% в обоих случаях (Рис 11Г-Ж).



**Рис. 10.** Ослабленное взаимодействие между DISC1-L100P с GSK-3 $\alpha$  и GSK-3 $\beta$  в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+;  $n = 5$ ) и DISC1-L100P (100P/100P;  $n = 5$ ). **А.** Вестерн блоттинг DISC1 иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 $\alpha$  и GSK-3 $\beta$  (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 95 кДа, полоса GSK-3 $\alpha$  - 50 кДа, GSK-3 $\beta$  - 45 кДа. **Б-В.** Денситометрический анализ коиммуноперсипитации DISC1 с GSK-3 $\alpha$  (**Б**) и GSK-3 $\beta$  (**В**). Связывание DISC1-L100P с GSK-3 изоформами достоверно снижено ( $p$ 's < 0.05) по сравнению с +/+ мышами. **Г.** Вестерн блоттинг GSK-3 $\beta$  иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 $\beta$  (нижняя панель) антителами. **Д.** Денситометрический анализ коиммуноперсипитации GSK-3 $\beta$  с DISC1. **Е.** Вестерн блоттинг GSK-3 $\alpha$  иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 $\alpha$  (нижняя панель) антителами. **Ж.** Денситометрический анализ коиммуноперсипитации GSK-3 $\alpha$  с DISC1. \* -  $p < 0.05$  - по сравнению с +/+ мышами.



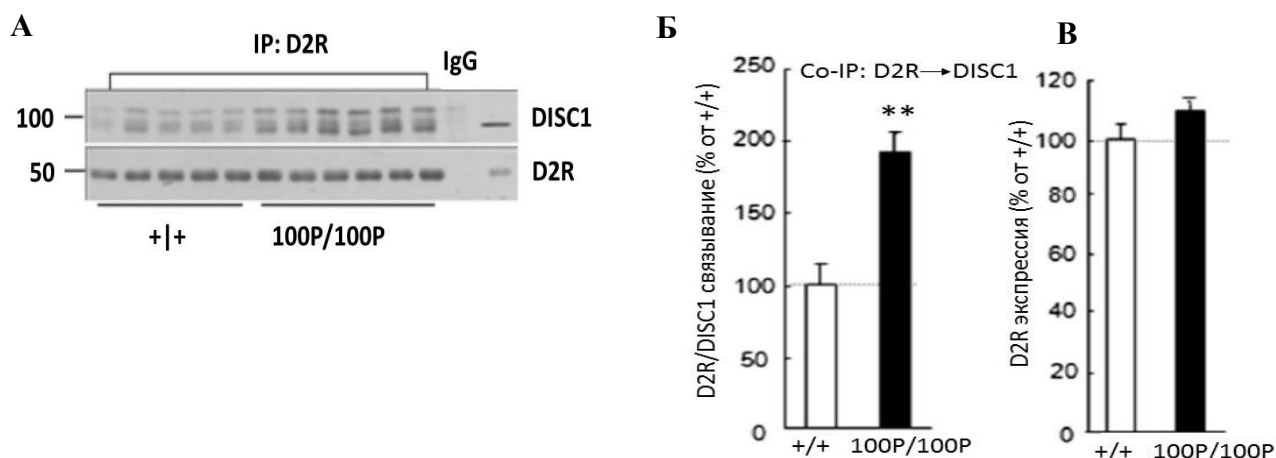
Для оценки ферментативной активности GSK-3 оценивали уровень фосфорилирования GSK-3 $\alpha$  и GSK-3 $\beta$  также в лизатах стриатума экспериментальных животных. Оказалось, что количество фосфорилированной формы GSK-3 $\alpha$  в позиции Серин-21 достоверно снижено у 100P/100P мутантов по сравнению с мышами дикого типа ( $p < 0.01$ ; Рис. 24А-Б), в то время как фосфорилирование GSK-3 $\beta$  достоверно не отличалось между генотипами. Также не было найдено межгенетических отличий по уровню общей экспрессии GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  (Рис. 24А-Б).



**Рис. 11.** Функциональная активность GSK-3 в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+;  $n = 7$ ) и 100P/100P ( $n = 15$ ). **А.** Репрезентативный вестерн блоттинг иммуноперципитации с антителами к pGSK-3 $\alpha$ / $\beta$  по Серину-21/9, общей экспрессии GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  протеина, а также GAPDH в качестве контроля загрузки образцов. **Б.** Денситометрический анализ иммуноперципитации с используемыми антителами. \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с +/+ мышами.

Учитывая, нарушения взаимодействия между DISC1 и GSK-3, вызванные DISC1-L100P мутацией на фоне проявления шизофреноподобного поведения у мышей линии 100P/100P и их чувствительности к антипсихотикам, а также тот факт, что активация D2 рецепторов (D2R), являющихся основной терапевтической мишенью антипсихотиков, стимулирует GSK-3 внутриклеточный сигнальный путь, следующим этапом исследования была оценка взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами. Коиммунопреципитационный анализ выявил достоверное усиление взаимодействий между D2 рецепторами и DISC1 (Рис. 12А-Б;  $p < 0.01$ ) без изменений уровня экспрессии D2 рецепторов у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 12Б).





**Рис. 12.** Усиление взаимодействий между DISC1-L100P протеином и D2 рецепторами в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+; n = 5) и DISC1-L100P (100P/100P; n = 6). **А.** Вестерн блоттинг D2R иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и D2R (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 100 кДа, полоса D2R - 50 кДа. **Б-В.** Денситометрический анализ коиммуноперсипитации D2R с DISC1 (**Б**) и уровня экспрессии D2R (**В**). \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с +/+ мышами.

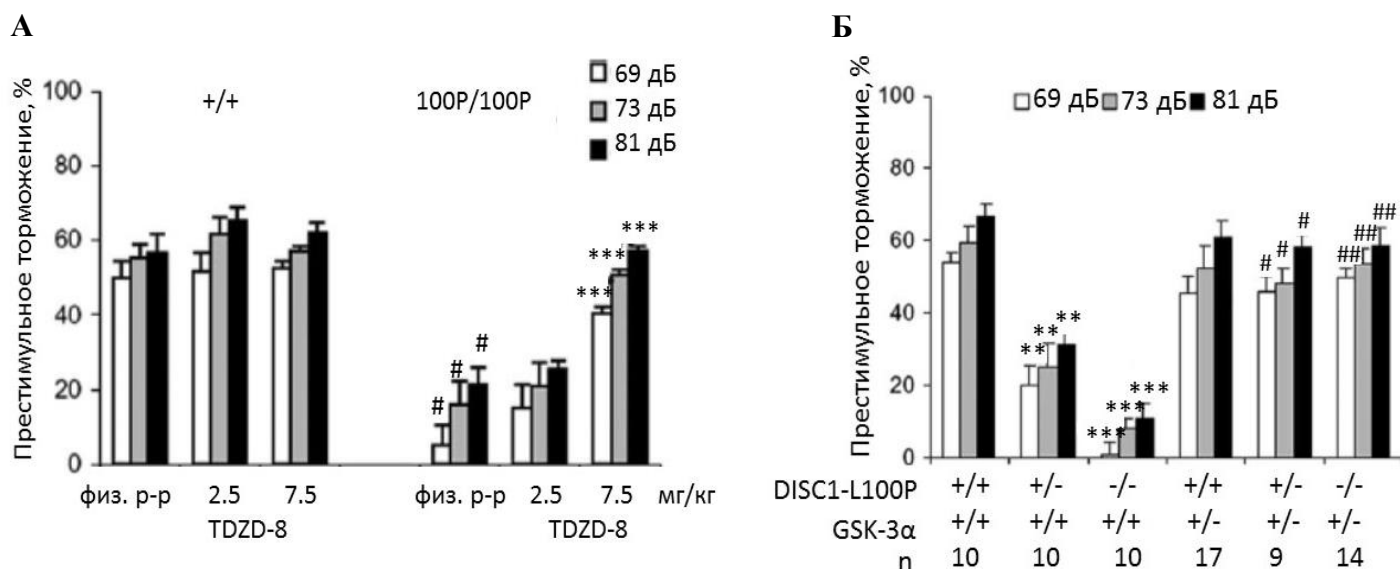
*Эффекты фармакологического и генетического ингибирования GSK-3 на дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P линии мышей.*

Принимая во внимание повышенную ферментативную активность GSK-3 (Рис. 11А-Б) у мышей линии 100P/100P, представлялось актуальным оценить эффективность блокатора GSK-3 в коррекции шизофреноподобного поведения у мышей данной линии. Для достижения данной цели использовали фармакологический ингибитор GSK-3 – TDZD-8, а также нокаутных мышей по гену GSK-3 $\alpha$ .

Введение TDZD-8 (фармакологический блокатор GSK-3) в дозе 7.5 мг/кг скорректировало нарушения когнитивных функций у экспериментальных животных. Так, MANOVA выявил достоверное влияние престаимулов [F (2,90) = 33.2;  $p < 0.01$ ], генотипа [F (1, 45) = 64.2;  $p < 0.001$ ], препарата [F (2,45) = 41.5;  $p < 0.001$ ], а также взаимодействий генотип x препарат [F (1,45) = 31.8;  $p < 0.001$ ] на пре-стимульное торможение. TDZD-8 достоверно корректировал дефицит пре-стимульного торможения у 100P/100P мышей (Рис. 13А), не оказывая действия на акустическую реакцию вздрагивания.

Параллельно с фармакологическим ингибированием активности GSK-3, также оценивался эффект генетической инактивации GSK-3 $\alpha$  у мышей, несущих аллели дикого (+/+) или мутантного (100P/100P) типа при создании двойных мутантов (100P/100P x GSK3 $\alpha$ -KO). MANOVA выявил достоверное влияние престаимулов [F (2,134) = 24.2;  $p < 0.001$ ] и генотипа [F (5,67) = 27.5;  $p < 0.001$ ] на престаимпульное торможение реакции вздрагивания. Дефицит сенсорно-моторной фильтрации у 100P/+ и 100P/100P мышей восстанавливался при генетическом снижении экспрессии GSK-3 $\alpha$  аллеля на 50% (Рис. 13Б). Также был обнаружен достоверный эффект генотипа [F (5,67) = 19.4;  $p < 0.001$ ]

на амплитуду реакции вздрагивания, но подобно эксперименту с TDZD-8, отсутствие аллеля GSK-3 $\alpha$  не изменило реакцию вздрагивания у гетерозиготных и гомозиготных DISC1-L100P мышей.

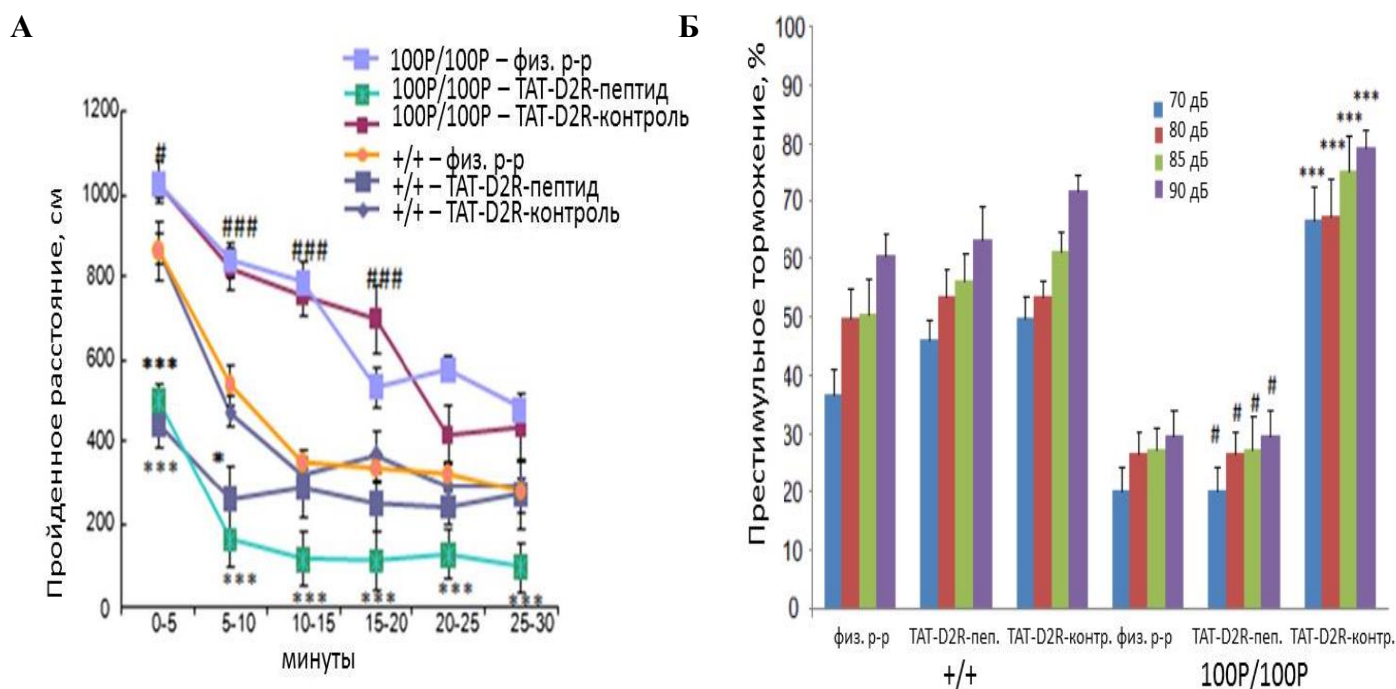


**Рис. 13.** Эффекты фармакологического (А) и генетического (Б) ингибирования GSK-3 на дефицит престаимульного торможения у 100P/100P линии мышей. А. TDZD-8 в дозе 7.5 мг/кг корректировал дефицит сенсорно-моторной фильтрации у 100P/100P мышей (N = 7-12 мышей). # -  $p < 0.001$  – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. раствора; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения физ. р-ра. Б. Эффекты генетической инактивации GSK-3 $\alpha$  на дефицит сенсорно-моторной фильтрации информации у 100P/+ и 100P/100P мышей. Процент престаимульного торможения реакции вздрагивания у генетических кроссов между 100P/100P и GSK-3 $\alpha$  гетерозиготными мышами. # -  $p < 0.01$ , ## -  $p < 0.001$  – по сравнению с DISC1-L100P мышами; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с +/+ мышами.

*Эффекты коррекции усиленных взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами с помощью TAT-D2R пептида на шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей.*

На основе выявленного усиления взаимодействий между DISC1-L100P и D2 рецепторов в дальнейшем рядом биохимических экспериментов было картировано место взаимодействия D2 рецептора с DISC1 протеином (район третьей внутриклеточной петли D2 рецептора [K211-T225]). В свою очередь, N-конец DISC1, но не С-конец, взаимодействует с D2 рецепторами (Su et al., 2014). Следовательно, был синтезирован пептид, разрывающий взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами (TAT-D2R) для коррекции DISC1 x D2R межбелкового комплекса и связанного с ним GSK-3 фосфорилирования, оказывая антипсихотическое действие на экспериментальных животных. Для проверки данного предположения оценивали эффективность TAT-D2R пептида (3 нмоль/г) введенного внутривентриально за 30 минут до тестирования. MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [ $F(1,49) = 6.35$ ;  $p < 0.05$ ], пептида [ $F$

(1,49) = 18.9;  $p < 0.001$ ], временного интервала [ $F(5, 245) = 63.1$ ;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействий ( $p$ 's  $< 0.05-0.001$ ) на двигательную активность. 100P/100P мыши на фоне введения контрольных соединений проявили гиперактивность по сравнению с мышами дикого типа (Рис. 14А), однако введение ТАТ-D2R пептида корректировало их гиперактивность, не оказывая седативного действия на мышей дикого типа. Аналогичное действие ТАТ-D2R пептида наблюдалось на дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мутантных мышей. MANOVA обнаружил существенное влияние генотипа [ $F(1,42) = 21.9$ ;  $p < 0.001$ ], пептида [ $F(1,42) = 40.3$ ;  $p < 0.001$ ], пре-стимулов [ $F(3,126) = 24.6$ ;  $p < 0.001$ ] и генотип  $\times$  пептид взаимодействий [ $F(2,42) = 22.3$ ;  $p < 0.001$ ] на престаимпульное торможение реакции вздрагивания. 100P/100P мутанты продемонстрировали дефицит пре-стимульного торможения при введении физиологического раствора и контрольного соединения, но введение ТАТ-D2R пептида нормализовало их дефицит сенсорно-моторной фильтрации (Рис. 14Б), не оказывая действия на амплитуду вздрагивания мышей.



**Рис. 14.** Эффект ТАТ-D2R-пептида на пройденное расстояние за 30 минут (А), а также на престаимпульное торможение (Б) реакции вздрагивания у мышей дикого типа (+/+;  $n = 8-8$  и  $n = 8-8$ ) и 100P/100P ( $n = 9-16$  и  $n = 8-8$ ). # -  $p < 0.05$ ; ## -  $p < 0.001$  – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физиологического раствора и ТАТ-D2R-контрольного соединения; \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с физиологическим раствором и ТАТ-D2R-контрольным соединением внутри каждого генотипа.

Таким образом, исследование биохимических особенностей головного мозга 100P/100P мутантных мышей идентифицировало повышенную функциональность дофаминергической системы, вызванной, во-первых, нарушением взаимодействий между DISC1-L100P и D2 рецепторами, а также PDE4B и GSK-3, что в свою очередь также повышало ферментативную активность GSK-3. Во-

вторых, обнаружено повышенное количество D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии в стриатуме 100P/100P мутантов, отражающее, по-видимому, последствия нарушения работы DISC1 интерактома, и являющейся одной из причин повышенной фармакологической чувствительности к амфетамину у мышей данной генетической линии. Примечательно, что существенных изменений уровня дофамина и его метаболитов как на базовом уровне, так и под воздействием психостимулянта, не выявлено. В-третьих, обнаружено, что блокаторы PDE4B и GSK-3, а также TAT-D2R-пептид оказывают антипсихотические эффекты, корректируя шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей. Показан синергистический эффект *in vivo* между фармакологическими блокаторами PDE4B и GSK-3 на 100P/100P мутантах, демонстрируя их совместную внутриклеточную функциональность в ассоциации с DISC1.

#### **6. Патогенное взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению (100P<sup>+</sup>) и материнской иммунной активацией (МИА): гибридная (ген x среда) модель шизофрении**

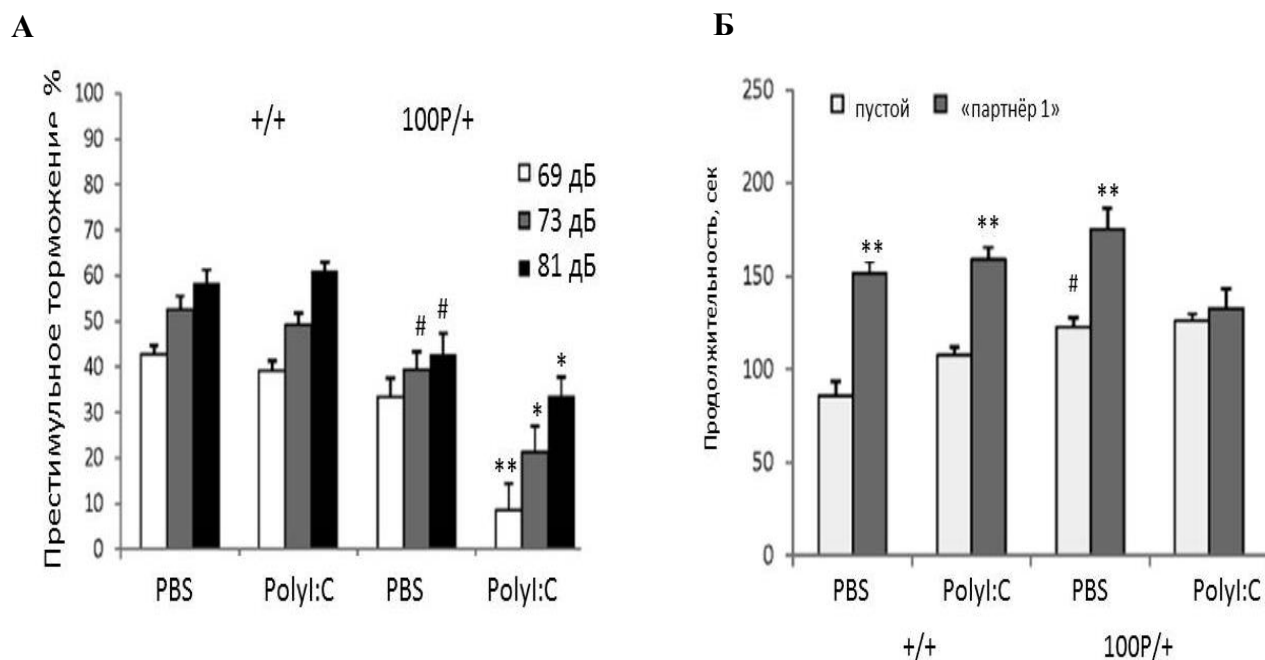
Шизофрения является болезнью нейроразвития, где DISC1 и его интерактом выполняют важную роль, оказывая влияние на пролиферацию клеток-предшественников, их миграцию, и дифференцировку (Chubb et al., 2008; Brandon and Sawa, 2011). Следовательно, было предположено, что поскольку 100P/100P мутация вызывает шизофреноподобное поведение у мышей, то воздействие материнской иммунной активацией (МИА) в эмбриогенезе на мышей с предрасположенностью к шизофрении, т.е. на 100P<sup>+</sup> гетерозиготных мышей, нарушит их нейроразвитие и спровоцирует шизофреноподобное поведение.

На первом этапе данного исследования оценивали эффект МИА, вызванной PolyI:C в дозе 5 мг/кг согласно литературе (Meyer et al., 2005) на поведение +/-, 100P<sup>+</sup> и 31L<sup>+</sup> мышей. MANOVA выявил достоверный эффект МИА [F (1,24) = 36; p < 0.001], генотипа [F (2,24) = 21; p < 0.001] и их взаимодействий [F (2,24) = 21; p < 0.001] на число помётов, а также на число потомков: эффект МИА [F (1,24) = 27.9; p < 0.001], генотипа [F (2,24) = 19.9; p < 0.001], эффект генотип x МИА взаимодействий [F (2, 24) = 19,7; p < 0.001]. Самки 100P/+ под воздействием МИА в дозе 5 мг/кг не имели потомства, хотя данные показатели не отличались у остальных экспериментальных групп, включая 31L\+ линию. Следовательно, в последующих экспериментах использовали PolyI:C в дозе 2.5 мг/кг.

*Пре-стимульное торможение:* MANOVA обнаружил существенное влияние МИА [F (1,48) = 5.3; p < 0.05], пре-стимула [F (2,96) = 86.4; p < 0.001], генотип x МИА [F (1,48) = 4.7; p < 0.05] и МИА x пре-стимул [F (2,96) = 5.4; p < 0.01] взаимодействий на пре-стимульное торможение. PolyI:C не влиял на пре-стимульное торможение у мышей дикого типа (Рис. 15А), в то время как вызывал дефицит престимульного торможения у 100P/+ мышей. MANOVA также выявил эффект генотипа [F (1,48) = 10.7; p < 0.01] на амплитуду вздрагивания, но не МИА и их взаимодействий.

*Социальная мотивация и распознавание:* MANOVA обнаружил достоверный эффект МИА [F (1,44) = 8.2; p < 0.01], «партнёра 1» [F (1,44) = 142.9; p < 0.001], МИА x «партнёр 1» взаимодействий [F (1,44) = 10.6; p < 0.01] на соци-

альную мотивацию. Мыши двух генотипов под влиянием контрольного растворителя (PBS) демонстрировали интерес к «партнёру 1», проводя дольше времени возле «социального» отсека, чем у нейтрального (Рис. 15Б). МИА не оказывала влияния на социальную мотивацию у мышей дикого типа, но нарушала социальное поведение у гетерозиготных  $100P/+$  животных ( $p > 0.05$ ), которые проводили равное количество времени возле отсеков двух типов.



**Рис. 15.** Эффекты МИА, вызванной введением polyI:C (2.5 мг/кг) на престаимпульное торможение (А) у мышей дикого типа (+/+) и  $100P/+$  гетерозиготных мышей.  $N = 7 - 16$ ; \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с PBS- $100P/+$  мышами. # -  $p \leq 0.05$  – по сравнению с PBS-+/+ мышами. Б) Эффекты МИА на социальную мотивацию у мышей дикого типа (+/+) и  $100P/+$  гетерозиготных мышей.  $N = 8-12$ ; \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению со временем, проведенном возле пустого отсека внутри каждой группы. # -  $p < 0.01$  – по сравнению с PBS-+/+ мышами.

#### Уровень интерлейкина-6 в головном мозге эмбрионов $100P/+$ x МИА мышей

Поскольку одним из ключевых цитокинов, вовлечённых в этиологию шизофреноподобного поведения у мышей, вызванной polyI:C, является интерлейкин-6 (ИЛ-6) (Smith et al., 2007), то на следующем этапе данного исследования оценивали концентрацию ИЛ-6 в головном мозге эмбрионов мышей экспериментальных групп. MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [ $F(1, 39) = 113.5$ ;  $p < 0.001$ ], МИА [ $F(2, 39) = 357.0$ ;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействия [ $F(2.39) = 95.5$ ;  $p < 0.001$ ] на уровень ИЛ-6. Оказалось, что polyI:C повышал уровень ИЛ-6 в дозо-зависимой манере у мышей всех генотипов. Однако, эмбрионы  $100P/+$  оказались более чувствительны к МИА в низкой дозе, чем эмбрионы +/+ ( $p$ 's  $< 0.001$ ) (Табл. 1).

**Таблица 1.** Эффект МИА, вызванной polyI:C в двух дозах на уровень ИЛ-6 в головном мозге эмбрионов мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей.

Экспериментальная группа	PBS, пг/мкг протеина	PolyI:C-2.5 мг/кг, пг/мкг протеина	PolyI:C-5.0 мг/кг, пг/мкг протеина
+/+	22.5 ± 11.5	86.8 ± 25.4 *	168.6 ± 17.7 ***
100P/+	20.5 ± 6.8	315.7 ± 31.5 ***	923.5 ± 30.6 ***

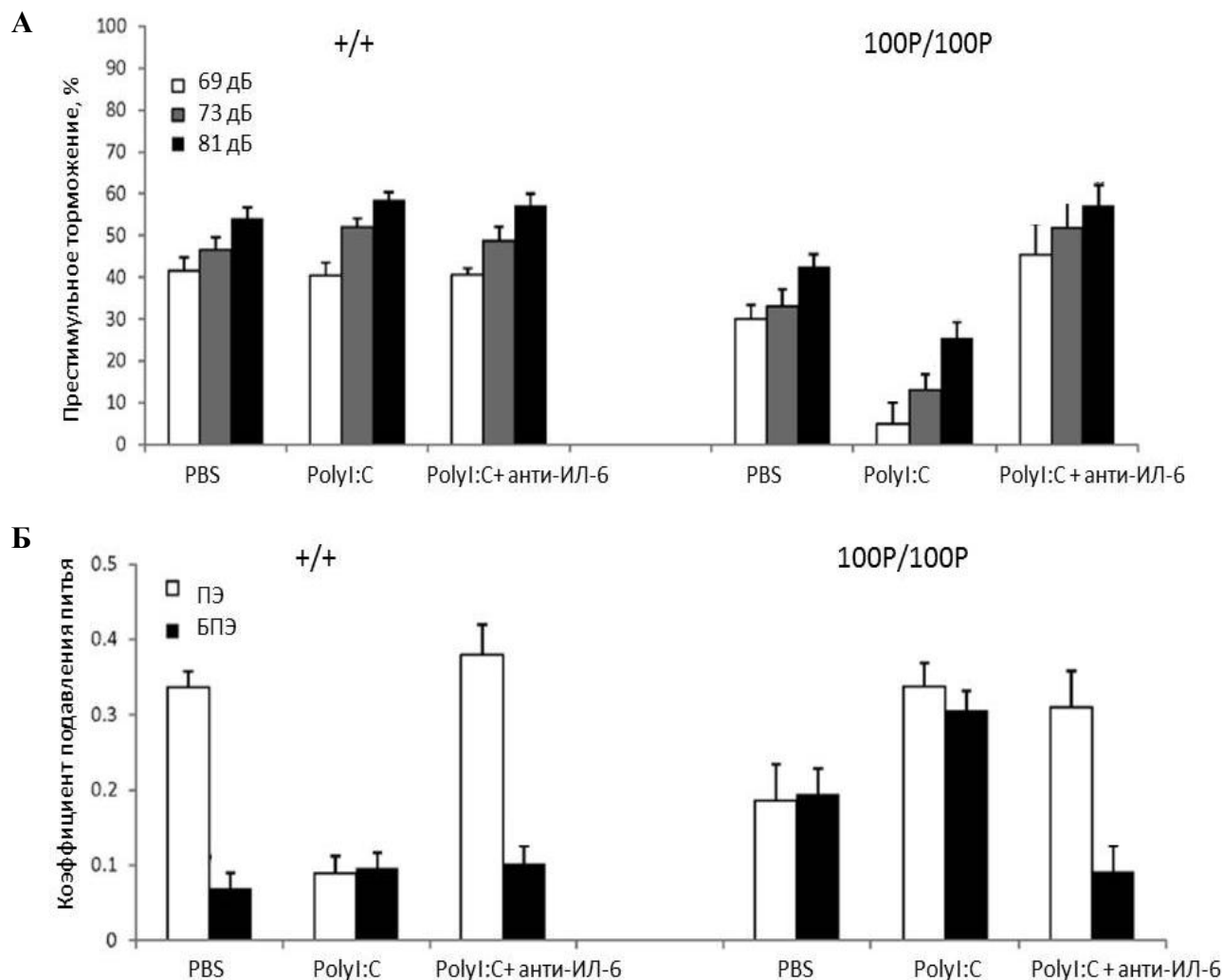
\* $p < 0.05$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с PBS эмбрионами внутри каждого генотипа. N = 8 /на группу

*Превентивный эффект антител к интерлейкину-6 на проявление шизофреноподобных эндофенотипов у 100P/+ х МИА мышей*

Повышенный уровень ИЛ-6 у 100P/+ эмбрионов в ответ на МИА предполагает, что, возможно, данный цитокин вовлечен в патогенез шизофреноподобного поведения у гибридов 100P/+ х МИА. Для проверки данного предположения оценивали эффективность антител к ИЛ-6 предотвратить дефицит престаимпульного торможения у 100P/+ мышей, вызванное МИА.

*Престимульное торможение:* MANOVA определил существенный эффект престаимулов [F (2,78) = 18.4;  $p < 0.001$ ], генотипа [F (1,39) = 15.0;  $p < 0.001$ ], МИА + антитела к ИЛ-6 [F (2,39) = 4.3;  $p < 0.05$ ] и генотипа х МИА + антитела к ИЛ-6 [F (2,39) = 5.5;  $p < 0.01$ ]. Потомки, рожденные от 100P/+ самок после введения им polyI:C, продемонстрировали дефицит престаимпульного торможения в ответ на три престаимула по сравнению с контрольной группой ( $p$ 's  $< 0.01$  при 69 дБ и 73 дБ и  $p < 0.05$  при 81 дБ) (Рис. 16А). Совместное введение polyI:C с антителами к ИЛ-6 предотвратило развитие дефицита престаимпульного торможения у 100P/+ мышей (Рис. 16А). MANOVA обнаружил достоверный эффект генотипа [F (1,39) = 4.5;  $p < 0.01$ ] и генотип х МИА взаимодействий [F (2,39) = 5.9;  $p < 0.01$ ] на амплитуду вздрагивания. Введение совместно polyI:C с антителами к ИЛ-6 повысило интенсивность вздрагивания, хоть и не достоверно ( $p = 0.08$ ).

*Латентное торможение:* Мыши всех экспериментальных групп не отличались по периоду А ( $p$ 's  $> 0.05$ ; среднее значение периода А = 8.1 сек.). MANOVA обнаружил достоверное влияние пре-экспозиции [F (1,86) = 30.3;  $p < 0.001$ ], генотипа [F (1,86) = 13.1;  $p < 0.001$ ], генотип х МИА+антитела к ИЛ-6 [F (2,86) = 10.1;  $p < 0.001$ ], пре-экспозиция х МИА + антитела к ИЛ-6 [F (2,86) = 8.2;  $p < 0.001$ ] взаимодействия на латентное торможение. Мыши +/+ от PBS-самок продемонстрировали латентное торможение ( $p < 0.001$ ), в то время как у PolyI:C-100P/+ мышей наблюдалось нарушение латентного торможения ( $p > 0.05$ ), однако введение антител к ИЛ-6 совместно с PolyI:C не вызывало нарушения данного типа поведения (Рис. 16Б).



**Рис. 17.** Совместное введение антител к ИЛ-6 (анти-ИЛ-6) с PolyI:C (2.5 мг/кг) предотвращало дефицит престимульного торможения (А) и латентного торможения (Б) у 100P/+ гетерозиготных мышей. А. 100P/+ мыши, рожденные от матерей имевших иммунную активацию, вызванную PolyI:C, продемонстрировали дефицит престимульного торможения. Введение анти-ИЛ-6 совместно с PolyI:C нормализовало дефицит престимульного торможения и амплитуду вздрагивания. N = 8-9, \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с PBS группой внутри 100P/+; # -  $p < 0.05$ ; ## -  $p < 0.01$ ; ### -  $p < 0.001$  – по сравнению с PBS группой внутри +/+ группы. Б. Коэффициент подавления питья у экспериментальных животных с пре-экспозицией к тону (ПЭ) и без пре-экспозиции к тону (БПЭ) при обучении с 2 парами тон-шок и 40 пре-экспозициям к тону. N = 6-9; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с ПЭ группой внутри каждой экспериментальной группы.

Данное исследование, во-первых, продемонстрировало специфичность и

патогенность точечной мутации DISC1-L100P, имеющей отношение к психопатологическим процессам шизофреноподобного состояния. Действительно, введение PolyI:C в дозе 5 мг/кг оказывало сходный эффект на мышей дикого типа +/+ и на 31L/+ линию мышей, в то время как материнская иммунная активация, вызванная пониженной дозой PolyI:C, провоцировала шизофреноподобное поведение только у 100P/+ гетерозиготных животных, не оказывая действия на мышей дикого типа (Lipina et al., 2013). Гетерозиготные животные с 100P/+ мутацией проявили предрасположенность к шизофреноподобному поведению, поскольку материнская иммунная активация (МИА) спровоцировала у них развитие данного типа психопатологии. Во-вторых, полученные данные доказали роль DISC1-L100P в процессах нейроразвития, учитывая воздействие МИА на ранней стадии эмбриогенеза. В-третьих, показано, что МИА посредством провоспалительного цитокина ИЛ-6 опосредует шизофреноподобное поведение у 100P/+ гетерозиготных мышей. Наконец, комбинация 100P/+ с МИА у мышей представляет собой новую гибридную модель шизофрении, сочетая два этиологических фактора данного заболевания, и в большей степени соответствуя ситуации в человеческой популяции, поскольку генетические, этиологические и нейробиологические исследования доказали, что шизофрения является результатом совместного действия патогенной генетической мутации(й) с факторами окружающей среды (O'Tuathaigh et al., 2015; van Os et al., 2010). Следовательно, последующие исследования на данной гибридной модели откроют новые нейробиологические механизмы, особенно, касающиеся нейроглиальных взаимодействий в процессе нейроразвития шизофреноподобного поведения.

## **7. Поиск и валидация новых мишеней для создания превентивной терапии: молекулярно-клеточный анализ эффектов вальпроата на шизофреноподобные эндофенотипы 100P/100P мышей**

Шизофрения является болезнью нейроразвития (Lewis and Lewitt, 2002), где первые симптомы заболевания отмечают в подростковый период. В настоящее время особо актуальным является исследование молекулярно-клеточных механизмов развития патологических процессов шизофрении с целью ее ранней диагностики и превенции. Предыдущее исследование, используя 100P/+ x МИА модель, косвенно продемонстрировало вовлечение DISC1-L100P в процессы нейроразвития, а также многочисленные независимые результаты доказали непосредственный вклад DISC1 в процессы пролиферации, миграции, интеграции нейронов (Mao et al., 2009; Singh et al., 2010; Kamiya et al., 2005; Kubo et al., 2010; Young-Pearse et al., 2010). Следовательно, на следующем этапе исследования представлялось актуальным оценить 1) проявление шизофреноподобного поведения у 100P/100P мутантных мышей в процессе нейроразвития; 2) возможность предотвращения данной психопатологии многофункциональным препаратом, вальпроатом, 3) выявить новую молекулярную мишень, вовлеченную в процессы формирования шизофреноподобного поведения с чувствительностью к превентивной терапии.

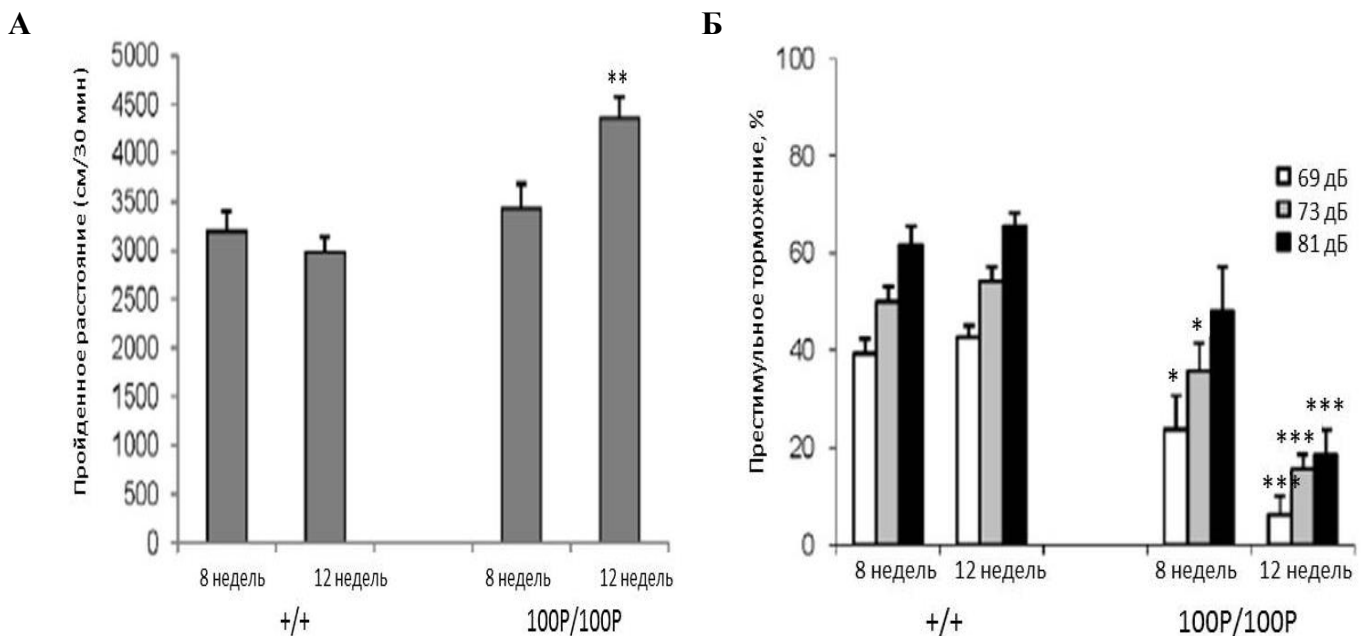


*Проявление шизофреноподобных эндотипов у 100P/100P мышей в возрасте 16 недель, но не 8 недель*

Поведение 100P/100P мутантных мышей оценивали в подростковый период, в возрасте 8 недель, когда уже созревает функциональность отделов головного мозга, регулирующих процессы престаимпульного торможения и латентного торможения (Willott et al., 2003; Zheng et al., 1999; Zuckerman et al., 2003), а также во взрослом состоянии, в возрасте 12 недель.

*Двигательная активность:* MANOVA выявил эффект генотипа [ $F(1,22) = 4.5$ ;  $p < 0.05$ ], возраста [ $F(1,22) = 17.1$ ;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействия [ $F(1,22) = 9.4$ ;  $p < 0.01$ ] на пройденное расстояние. 100P/100P мутанты проявляли гиперактивность в возрасте 12 недель, но не 8 недель (Рис. 18А).

*Престаимпульное торможение акустической реакции вздрагивания:* MANOVA обнаружил достоверное влияние престаимулов [ $F(2,98) = 150.2$ ;  $p < 0.001$ ], генотипа [ $F(1,49) = 58.8$ ;  $p < 0.001$ ], возраста [ $F(1,49) = 4.97$ ;  $p \leq 0.05$ ], и генотип  $\times$  возраст взаимодействий [ $F(1,49) = 9.3$ ;  $p < 0.01$ ] на престаимпульное торможение. Дефицит престаимпульного торможения был существенно выражен у 100P/100P мышей в возрасте 12 недель по сравнению с 8-недельным возрастом (Рис. 18Б). MANOVA обнаружил достоверный эффект генотипа [ $F(1,49) = 19.9$ ;  $p < 0.001$ ], и генотип  $\times$  возраст взаимодействий [ $F(1,49) = 8.6$ ;  $p < 0.01$ ] на амплитуда акустической реакции вздрагивания. Интенсивность реакции вздрагивания у 100P/100P мутантов в возрасте 8 недель не отличалась от данного показателя у +/+ мышей, но достоверно снижалась у 12-недельных мышей ( $p < 0.001$ ).

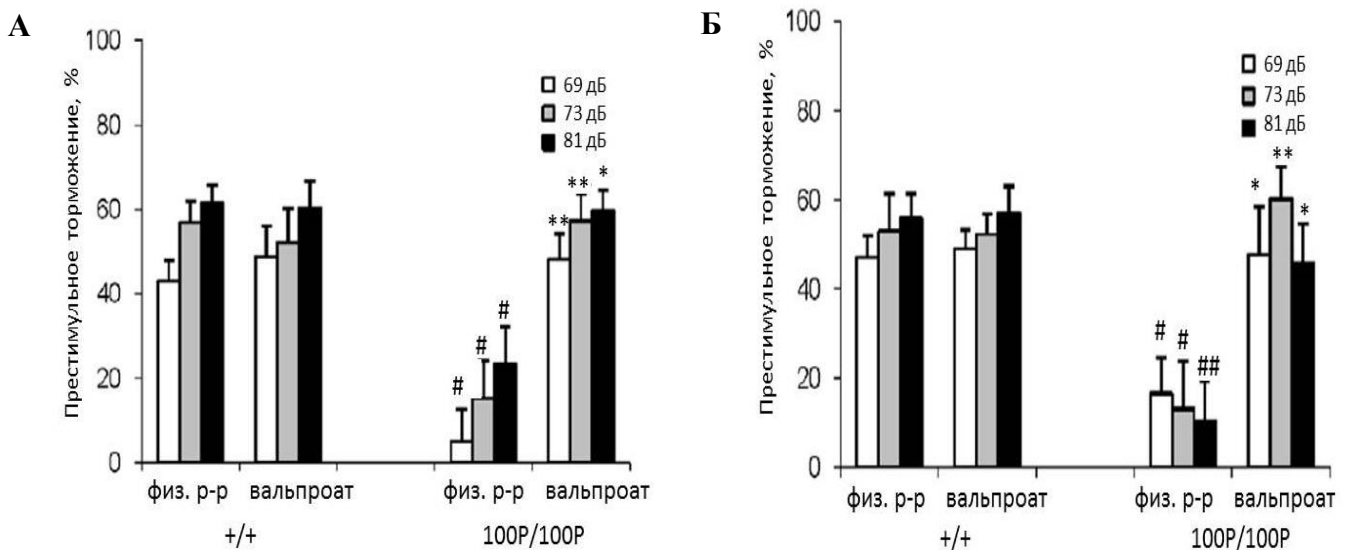


**Рис. 18.** 100P/100P мутантные мыши проявляют шизофреноподобное поведение в возрасте 12 недель, но не в 8 недель. **А.** 12-недельные 100P/100P мыши продемонстрировали гиперактивность по сравнению с мышами дикого типа (+/+) (N = 7-19); **Б.** 12-недельные 100P/100P мутанты проявили дефицит престаимпульного торможения (N = 7-10); \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$  – по сравнению с мышами дикого типа внутри каждой возрастной группы.

### Превентивная эффективность вальпроата на шизофреноподобные эндофенотипы у 100P/100P мышей

Следующим этапом исследования была оценка превентивной эффективности хронического введения вальпроата (200 мг/кг) экспериментальным животным в возрасте с 10 по 12 неделю с последующей оценкой шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей в возрасте 12 и 15 недель. В качестве превентивного средства вальпроат был выбран по нескольким причинам. Во-первых, использование антипсихотиков в качестве превентивной медицины является ограниченным (Marshall and Rathbone, 2011). Во-вторых, вальпроат уже одобрен для применения подростками для превенции психоза (Lambert et al., 2016). В-третьих, поскольку шизофрению вызывают множественные факторы, то подходящим превентивным соединением окажется такое средство, которое воздействует на несколько механизмов действия (Buchanan et al., 2009), каким является вальпроат (Phiel et al., 2001; Williams et al., 2002; Kim et al., 2007; Monti et al., 2009; Chateauvieux et al., 2010).

Оказалось, что 2х-недельное введение вальпроата корректировало гиперактивность и дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мышей в возрасте 12 недель (Рис. 19А). Примечательно, что эффект вальпроата на оцениваемое поведение сохранялся спустя 3 недели после отмены введения препарата, т.е. в возрасте 15 недель (Рис. 19Б). MANOVA обнаружил влияние престаимулов [ $F(2,82) = 4.4$ ;  $p < 0.05$ ], генотипа [ $F(1,41) = 7.6$ ;  $p < 0.01$ ], препарата [ $F(1,41) = 5.5$ ;  $p < 0.05$ ], и генотип x препарат взаимодействия [ $F(1,82) = 9.6$ ;  $p < 0.01$ ] на престаимпульное торможение. Вальпроат оказывал терапевтическое действие на дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 19А).

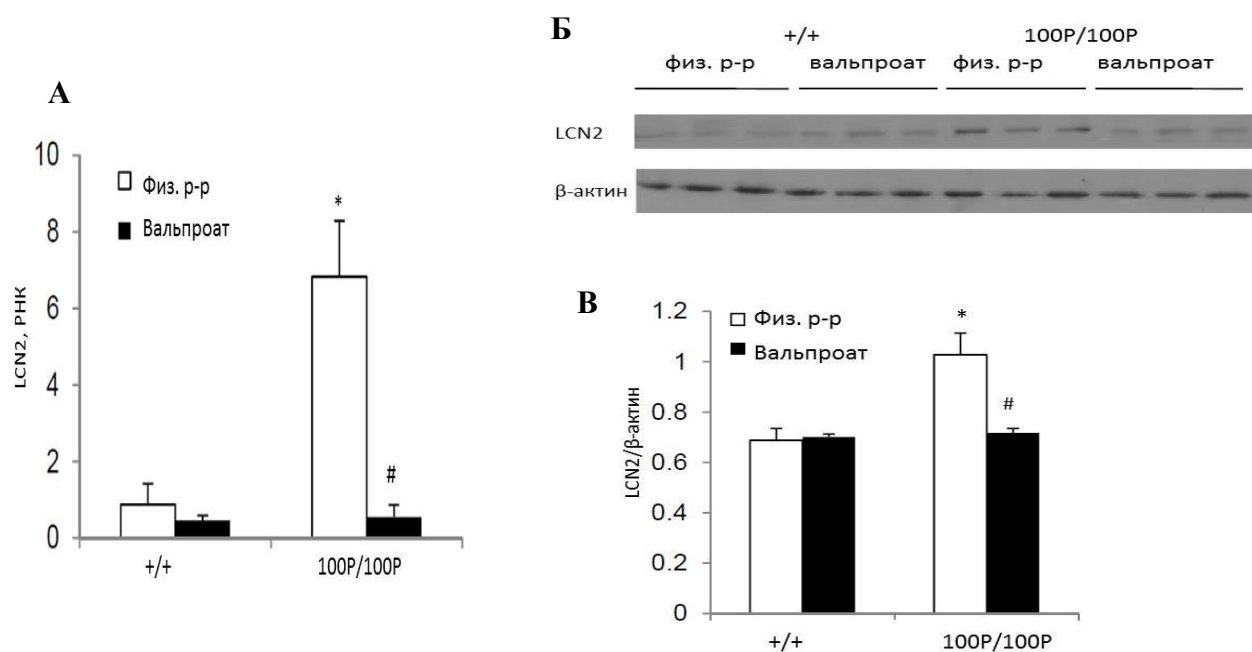


**Рис. 19.** Хроническое введение вальпроата экспериментальным мышам в возрасте 10-12 недель предотвращало дефицит престаимпульного торможения (А) у 100P/100P мышей и данный эффект сохранялся спустя 3 недели после прекращения его введения (Б). (N = 16-19), # -  $p < 0.05$ ; ## -  $p < 0.01$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+) на фоне введения физиологического раствора; \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с 100P/100P на фоне введения физиологического раствора.

### Идентификация липокалина-2 (*Lcn2*) как гена-кандидата для ранней диагностики и создания превентивной терапии

Транскриптомный анализ выявил, что *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> мутация имела наиболее выраженный эффект на экспрессию генов в гиппокампе (61 ген), 13 генов изменили экспрессию в стволе головного мозга и не было обнаружено изменений генетической экспрессии в стриатуме и коре головного мозга. Аннотация функций генов гиппокампа выявила, что большинство из них вовлечены в пролиферацию клеток (23%) и цитоскелет/форму клетки (15%). Вальпроат значительно изменял экспрессию 3 генов в гиппокампе (*Hist1h1c*, *Hist1h2be*, *Cln2*) и 2 генов в стриатуме (*Egr2*, *Fosb*). Среди 61 генов, изменивших свою экспрессию под влиянием *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> мутации, вальпроат скорректировал экспрессию 13 генов (21.3%) в гиппокампе и *Lcn2* в стволе головного мозга. Экспрессия 14 генов изменилась только у 100P/100P на фоне действия вальпроата.

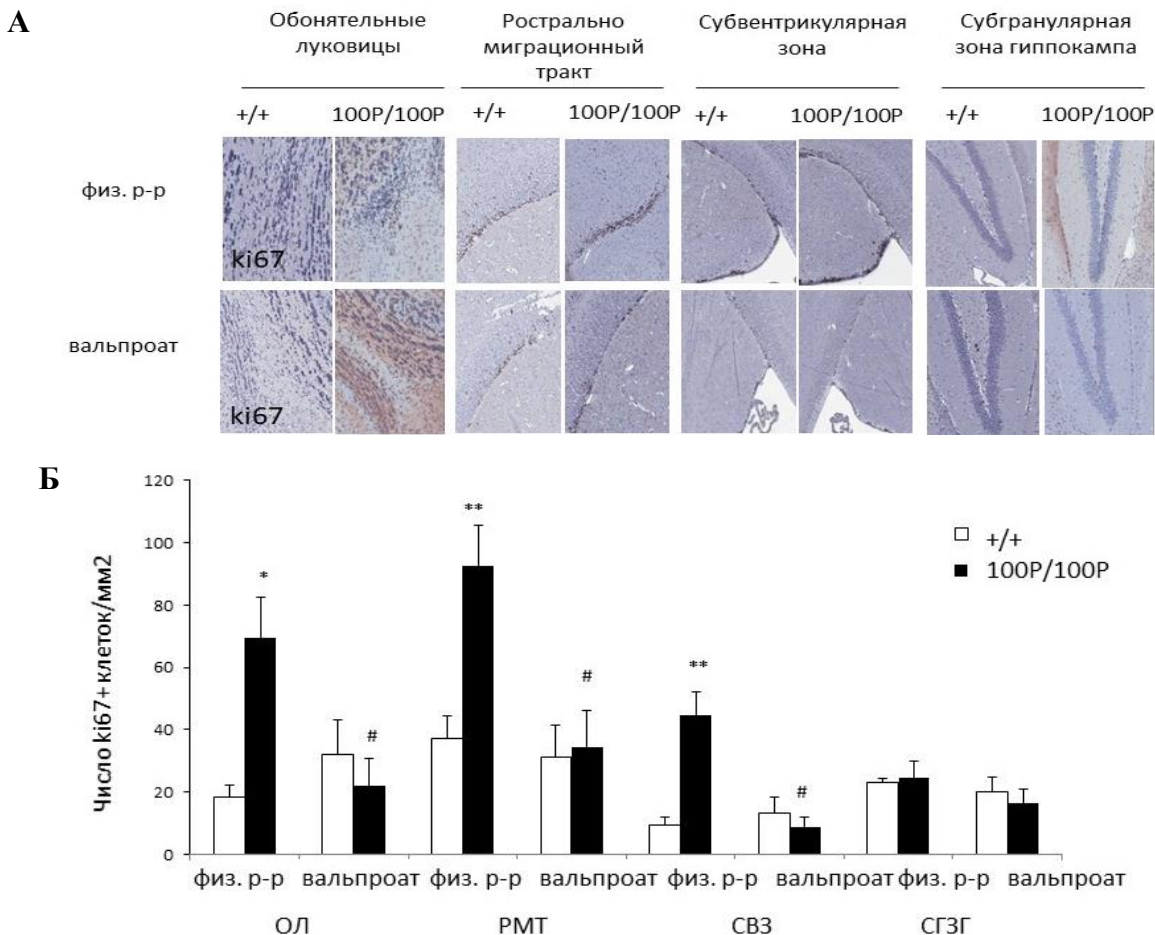
Выявленные изменения уровня мРНК для генов, которые меняли свою экспрессию под влиянием: 1) *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> мутации и вальпроата (ген x препарат взаимодействия) (*Arc*, *Purb*, *Egr2*, *Dusp1*, *Slc40a1*, *Mrpl39*, *Igf1*); 2) только 100P/100P мутации (*Slc6a12*, *Adar*, *Lcn2*, *Ei4ebp2*); 3) генотип x препарат взаимодействия (*Cyr61*), подтверждали с помощью детекции ПЦР продукта в режиме реального времени (qRT-PCR). Корреляционный анализ данных, полученных транскриптомным анализом (микроэрей) и qRT-PCR подтвердил достоверное изменение экспрессии 7 генов из 12 исследуемых – *Lcn2*, *Egr2*, *Slc40a1*, *Arc*, *Dusp1*, *Cyr61*, *Slc6a12*, где коэффициент корреляции составил  $r = 0.6$ ;  $p = 0.037$ . На основе транскриптомного анализа и первичной валидации с помощью qRT-PCR наилучшим геном-кандидатом оказался ген *Lcn2* (Рис. 20А). Вторичная валидация *Lcn2* подтвердила изменения его экспрессии на уровне протеина, соответствующие изменениям на уровне гена (Рис. 20Б-В). В частности, наблюдался повышенный уровень *Lcn2* в стволе головного мозга у 100P/100P мутантов, существенно корректируемая вальпроатом.



**Рис. 20. А.** Уровень *Lcn2* мРНК, оцениваемый с помощью qRT-PCR (N = 5-6) при нормализации на *Gapdh* и  $\beta$ -актин. MANOVA выявил эффект генотипа [F (1,15) = 18.4,  $p < 0.001$ ], препарата [F (1,15) = 20.6;  $p < 0.001$ ], и генотип x препарат взаимодействий [F (1,15) = 18.2;  $p < 0.001$ ] на уровень экспрессии *Lcn2* мРНК. **Б.** Экспрессия *Lcn2* протеина, оцениваемая с помощью вестерн блоттинга, используя антитела к *Lcn2* и  $\beta$ -актин (контроль) в лизатах ствола головного мозга у экспериментальных животных (N = 6-7). **В.** Денситметрический анализ количественной оценки интенсивности *Lcn2* иммунореактивных полос по отношению к  $\beta$ -актину. MANOVA обнаружил эффект генотипа [F (1,20) = 31.4;  $p < 0.001$ ], препарата [F (1,20) = 21.9;  $p < 0.001$ ] и их взаимодействий [F (1,20) = 25.9;  $p < 0.001$ ] на уровень *Lcn2* протеина. \* -  $p < 0.05$  – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. раствора; # -  $p < 0.05$  – по сравнению с 100P/100P мутантами на фоне введения физ. раствора.

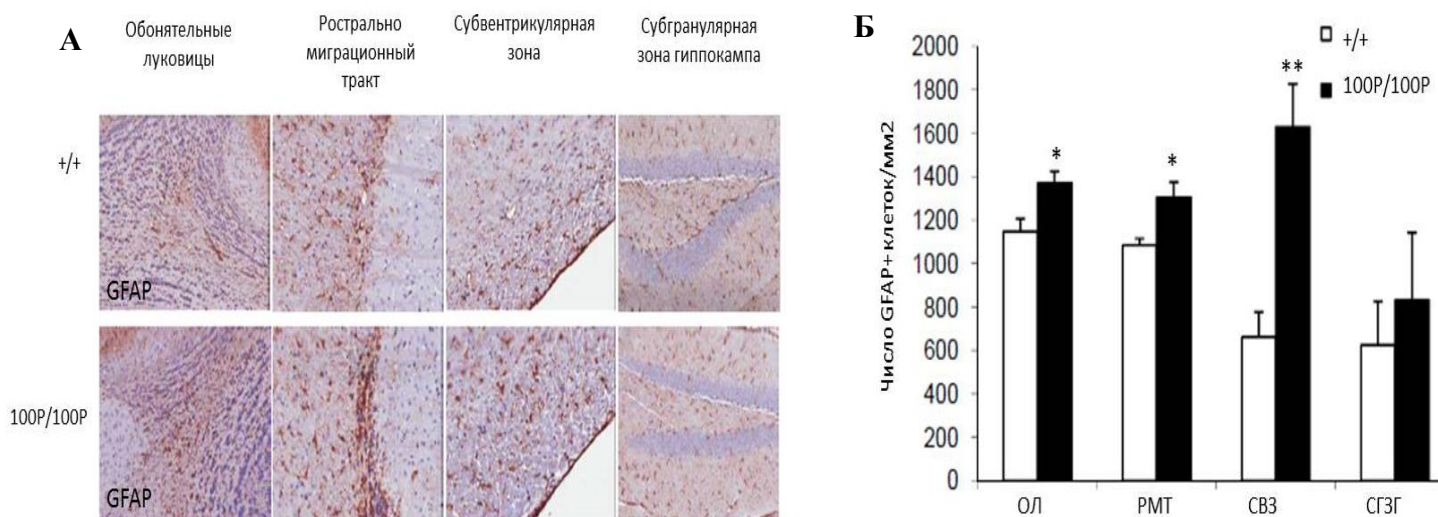
*Взаимосвязь между экспрессией Lcn2, количеством глиальных клеток в области рострального миграционного тракта и проявлением шизофреноподобных эндотипов у 100P/100P мышей*

Учитывая, что DISC1 (Enomoto et al., 2009; Mao et al., 2009; Kim et al., 2009) и *Lcn2* (Rodvold et al., 2012) вовлечены в клеточную пролиферацию и поскольку наибольшую часть генов с изменённой экспрессией составляли гены, также вовлечённые в пролиферацию (23%), на следующем этапе исследовали клеточную пролиферацию у экспериментальных животных, используя маркер *ki67*.



**Рис. 21. А.** Иллюстративные срезы обонятельных луковиц, росто мигриационного тракта, субвентрикулярной зоной, субгранулярной зоны гиппокампа у мышей дикого типа (+/+) и мутантов (100P/100P) на фоне введения физиологического раствора (верхняя панель) и вальпроата (нижняя панель) иммуноокрашенных с меткой ki67 (тёмно-коричневый цвет). Все изображения получены при увеличении  $\times 10$ . **Б.** Количественный анализ числа ki67+ клеток в обонятельных луковицах (ОЛ), росто мигриационном тракте (PMT), субвентрикулярной зоне (СВЗ), субгранулярной зоне гиппокампа (СГЗГ) у животных всех экспериментальных групп. **ОЛ:** [F (1,62) = 18.23;  $p < 0.01$ ] – генотип; [F (1,62) = 18.9;  $p < 0.01$ ] – препарат; [F (1,62) = 19.4;  $p < 0.01$ ] – генотип х препарат взаимодействия. **PMT:** [F (1,62) = 17.38;  $p < 0.01$ ] – генотип; [F (1,62) = 28.47;  $p < 0.01$ ] – препарат; [F (1,62) = 15.71;  $p < 0.05$ ] – препарат х генотип. **СВЗ:** [F (1,62) = 28.54;  $p < 0.01$ ] – генотип; [F (1,62) = 16.28;  $p < 0.05$ ] – препарат, [F (1,62) = 16.54;  $p < 0.01$ ] – генотип х препарат. **СГЗГ:** MANOVA не выявил достоверных влияний генотипа, препарата и их взаимодействий на число ki67+ клеток ( $p$ 's  $> 0.05$ ). Число ki67+ клеток выражается как число клеток на 1 мм<sup>2</sup> используя программу Aperio Image Score. \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с мышами дикого типа (+/+) на фоне введения физ. раствора; # -  $p < 0.01$  – по сравнению с 100P/100P мутантами на фоне введения физ. раствора. N = 4 среза на 1 мыш; 4-6 мышей на группу.

Для идентификации типов пролиферирующих клеток были использованы селективные маркеры для нейронов – антитела для NeuN (neuronal nuclear protein) и глиальных клеток (астроцитов) – антитела для GFAP (glial fibrillary acidic protein). Как видно (Рис. 22 А-Б), в области обонятельных луковиц, росто мигриационного тракта, субвентрикулярной зоны головного мозга, но не в гиппокампе, у 100P/100P наблюдалось повышенное количество GFAP+ клеток по сравнению с мышами дикого типа. В то время как не было обнаружено межгенетических отличий по количеству NeuN+ нейрональных клеток во всех исследованных областях мозга.

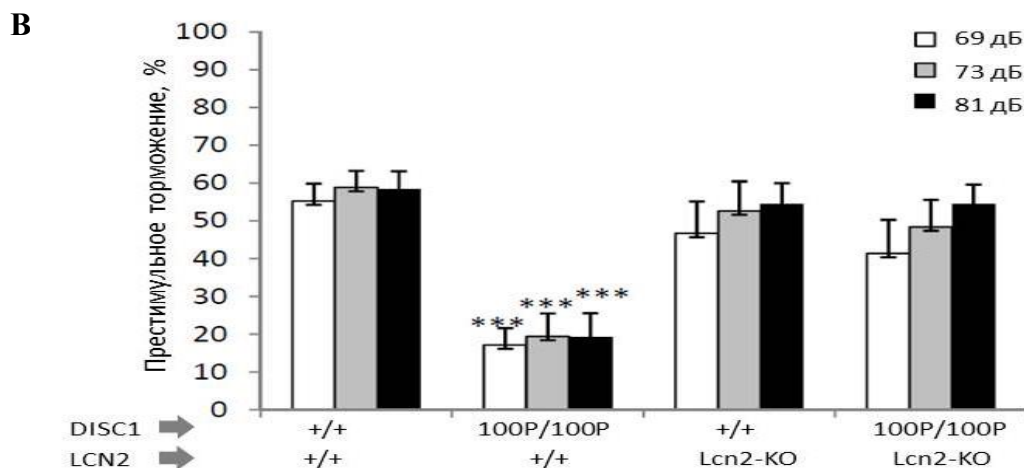
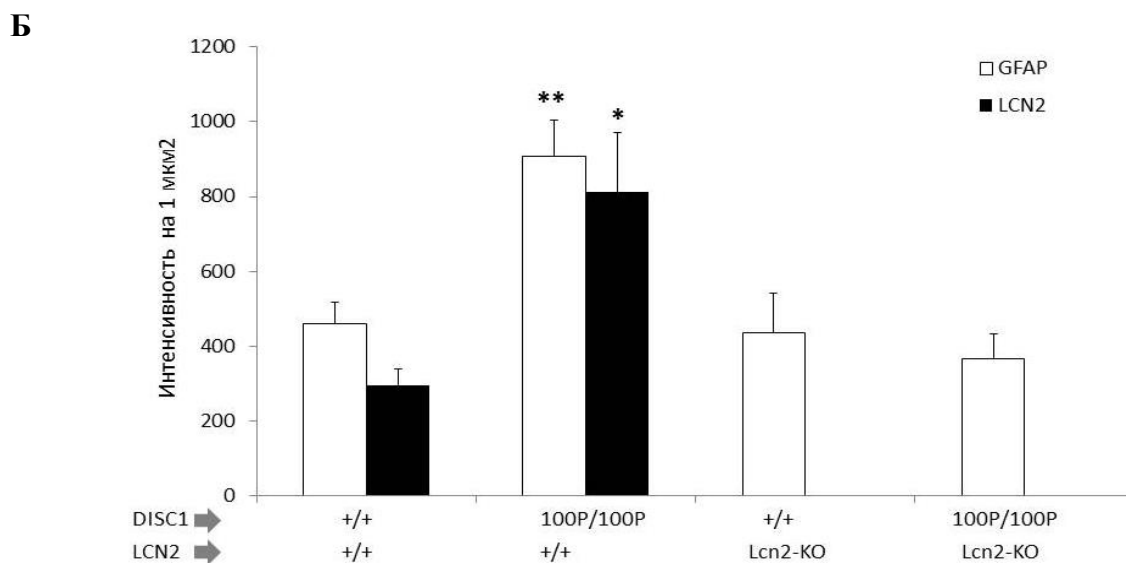
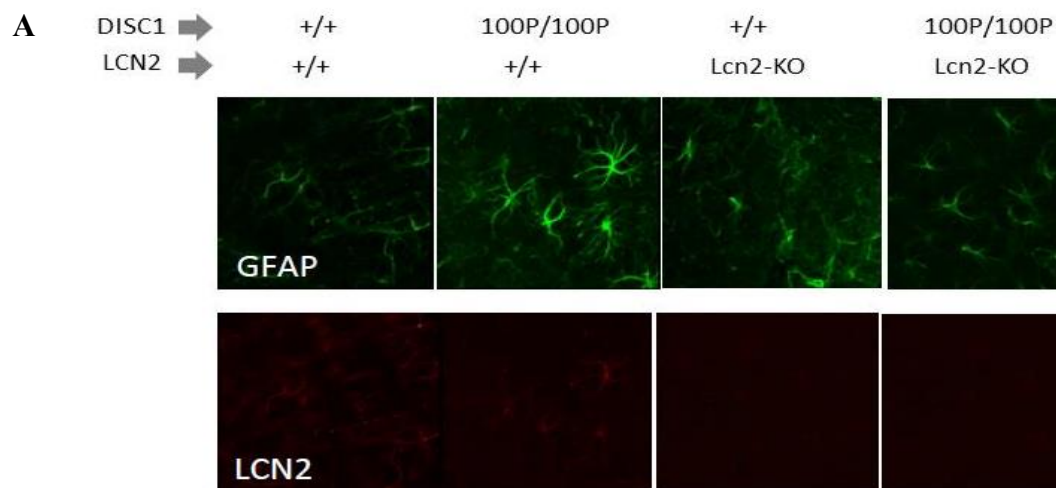


**Рис. 22.** Уровень GFAP<sup>+</sup> клеток в отделах головного мозга у мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P.



Генетическая делеция *Lcn2* корректирует повышенное количество GFAP+ клеток и нормализует шизофреноподобное поведение у 100P/100P мутантных мышей.

Для выяснения вклада *Lcn2* гена в опосредование повышенного числа глиальных клеток и ассоциацию с шизофреноподобным поведением 100P/100P мышей, данная генетическая линия мышей была скрещена с *Lcn2* нокаутной линией (*Lcn2*-KO) (Berger et al., 2006).



**Рис. 23. А.** Генетическая инактивация *Lcn2* корректировала повышенное число GFAP<sup>+</sup> клеток в субвентрикулярной зоне (СВЗ) у 100P/100P мутантных мышей. Конфокальная нейровизуализация срезов СВЗ с иммуноокрашиванием, используя антитела к *Lcn2* и GFAP у мышей 4х генотипов: дикий тип (+/+ - +/+); 100P/100P - +/+; +/+ - *Lcn2*-КО; 100P/100P - *Lcn2*-КО (N = 4 среза на 1 мышшь; 3-5 мышей на генотип, увеличение x20. **Б.** Количественный анализ уровня экспрессии *Lcn2* и GFAP в СВЗ у мышей 4х генотипов. \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$  – по сравнению с +/+ мышями, непарный t-тест. **В.** Дефицит престаимульного торможения у 100P/100P корректировала генетическое отсутствие *Lcn2*. \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.01$ ; \*\*\* -  $p < 0.001$ - по сравнению с +/+ мышями.

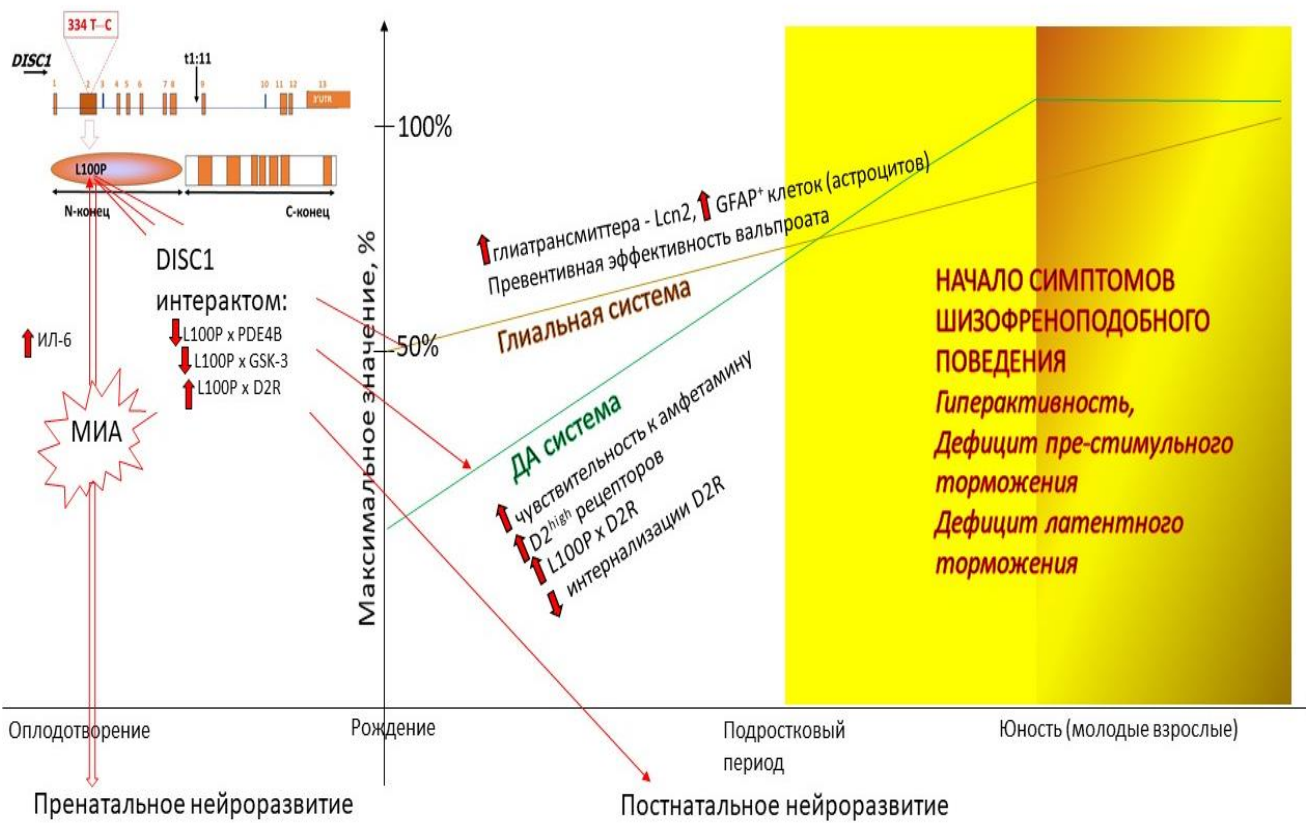
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное комплексное исследование доказало вклад 2го экзона гена *DISC1* в патогенез шизофреноподобного состояния на впервые созданной генетической линии мышей *DISC1-L100P* (100P/100P). В результате точечной мутации во 2м экзоне (L100P) нарушаются функциональные взаимодействия *DISC1* с PDE4B, GSK-3 и D2 рецепторами, что в результате приводит к повышенной чувствительности дофаминергической системы головного мозга. В частности, пониженное взаимодействие между *DISC1-L100P*, PDE4B и GSK-3 повышает ферментативную активность GSK-3, что нарушает формирование комплекса *DISC1* с D2рецепторами, клатрином, AP2,  $\beta$ -арестином, Akt1, и усиливает взаимодействия D2 рецепторов с *DISC1*, в результате чего снижается интернализация D2 рецепторов, приводящая к повышенной чувствительности ДА системы мозга и патологическому поведению у 100P/100P мышей. Селективное размыкание усиленных взаимодействий между *DISC1* и D2 рецепторов с помощью синтезированного пептида (TAT-D2per), оказывало антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей. Дополнительно, фармакологические блокаторы GSK-3 и PDE4B также оказывали антипсихотическое действие на 100P/100P модель шизофрении. Следовательно, исследования *DISC1* и его интерактома представляют перспективное направление как с целью фундаментального понимания молекулярных механизмов шизофрении, так и для создания новых биомаркеров шизофрении и антипсихотиков, что в дальнейшем может быть транслировано в область клинических исследований.

Поиск надежных биомаркеров шизофрении для ранней диагностики и разработка превентивной терапии данного заболевания является актуальной задачей в области психофармакологии. Проявлению шизофреноподобного поведения у взрослых 100P/100P мышей предшествуют молекулярно-клеточные изменения на более ранних этапах нейроразвития. Прогресс симптомов заболевания с возрастом у 100P/100P происходит на фоне повышенной генетической экспрессии *Lcn2* в головном мозге, сопровождающийся активацией пролиферации астроцитов в области росто-миграторного тракта и обонятельных луковец, негативно коррелирующих с сенсорно-моторной фильтрацией - классическим эндофенотипом шизофрении. Превентивное введение вальпроата до манифестации шизофреноподобного поведения подавляло экспрессию *Lcn2*, ко-

личество глиальных клеток и как следствие, нормализовало шизофреноподобное поведение у 100P/100P мышей, свидетельствуя о пластичности нервной системы. Наконец, создание гибридной модели шизофрении, сочетая патогенный фактор окружающей среды – МИА, и генетическую предрасположенность – 100P/+<sup>+</sup>, позволило доказать вклад ИЛ-6 в патологические механизмы шизофрении.

Таким образом, комплексное исследование на 100P/100P генетической линии мышей позволяет заключить, что данная линия мышей является перспективной моделью шизофрении, исследования на которой позволят выявить новые молекулярно-клеточные и нейробиологические механизмы данного заболевания, что приведет к идентификации новых биомаркеров шизофрении, а также мишеней для превентивных и терапевтических воздействий.



**Рис. 24.** Схема, иллюстрирующая основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.



## ВЫВОДЫ

1. Генетическая линия мышей 100P/100P с точечной мутацией во 2м экзоне гена *DISC1*, соответствует основным критериям экспериментальной модели шизофрении: этиологии, сходству симптомов; нейробиологическим изменениям и специфическому терапевтическому ответу на антипсихотические препараты.
2. Точечная мутация *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> нарушает межбелковые взаимодействия DISC1-L100P с дофаминовыми D2 рецепторами, что приводит к гиперактивации дофаминергической системы головного мозга, проявляющейся в повышенной фармакологической чувствительности к амфетамину, увеличении количества высокочувствительных дофаминовых D2 рецепторов, что приводит к манифестации шизофреноподобного поведения у 100P/100P линии мышей.
3. В основе биохимических механизмов шизофреноподобного поведения лежит нарушение межбелковых взаимодействий DISC1-L100P протеина с GSK-3, PDE4B и D2 рецепторами. Коррекция повышенной активности GSK-3, PDE4B, а также усиленных межбелковых взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами, оказывает антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей.
4. Патогенный фактор окружающей среды, материнская иммунная активация, взаимодействует с генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению, провоцируя данный тип психопатологии у гетерозиготных 100P/+ мышей, что подтверждает патогенность *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> мутации. Материнская иммунная активация посредством провоспалительного цитокина интерлейкина-6 вызывает шизофреноподобное поведение у 100P/+ гетерозиготных мышей.
5. Глиатрансмиттер липокалин-2 вовлечён в нейроглиальные механизмы шизофреноподобного поведения на стадии раннего развития и в превентивный эффект вальпроата.
6. Точечная мутация *DISC1* Rgsc<sup>1390</sup> нарушает функциональные свойства N-конца DISC1 протеина и DISC1 интерактома, что приводит к дисбалансу дофаминергической системы, патогенному нейроразвитию и манифестации шизофреноподобного поведения у мышей, свидетельствуя о вкладе DISC1 в дофаминергическую теорию шизофрении и теорию нейроразвития.
7. Биохимические и фармакологические исследования на основе нарушений DISC1-L100P интерактома предлагают межбелковые взаимодействия DISC1 с D2 рецепторами, GSK-3 и PDE4 как перспективные мишени для диагностики и создания антипсихотиков нового поколения.

**Основные положения диссертационной работы изложены  
в следующих публикациях:**

**Книга**

1. Drug Discovery on Schizophrenia. Eds: TV Lipina & JC Roder, RSC Publishing. 2015. P. 289. DOI:10.1039/9781782622499

**Главы в книгах**

1. Lipina T.V., Roder J.C. Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1) interactome and schizophrenia. - Drug Discovery on Schizophrenia. Eds: T.V. Lipina & J.C. Roder, RSC Publishing, 2015. P.141-172
2. Lipina T and Roder JC. The Genetic Component of Latent Inhibition: Studies of Inbred and Mutant Mice. - Latent Inhibition: Data, Theories, and Applications to Schizophrenia, Eds R.E. Lubow & Ina Weiner, Cambridge University Press, 2010. P. 225-251
3. Lipina TV, Clapcote SJ, Millar K, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC. Impaired function of phosphodiesterase 4B in mutated Disc1 mice leads to development of pronounced depression-like behavior with mild expression of schizophrenia-like phenotype. -Behavioral models in Stress Research, Ed: A.V. Kalueff, Nova Science Publishers, Inc., 2007, P. 165-189

**Статьи в журналах**

1. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar KJ, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. //Neuron. 2007. V. 54. № 3. P. 387-402.
2. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Keizo T, Eed M, Satoko H, Laliberté C, Khan M, Okamoto K, Chambers JW, Fletcher PJ, MacAulay K, Doble B, Henkelman M, Miyakawa T, Roder JC, Woodgett JR. Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 mutant mice. //Molecular Brain. 2009, V.2. P.35.
3. Lipina TV, Niwa M, Jaaro-Peled H, Fletcher PJ, Seeman P, Sawa A, Roder JC. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: Implications for schizophrenia //Genes, Brain and Behavior. 2010, V.9. № 7. P. 777-789.
4. Lipina TV, Roder J. A New model of the disrupted Latent Inhibition in C57BL/6J mice after treatment with bupropion. //Psychopharmacology, 2010, V. 208. № 3. P. 487-498.
5. Lipina TV, Rasquinha R, Roder J. Parametric and pharmacological modulations of latent inhibition in mouse inbred strains. //Pharmacology, Biochemistry and Behaviour, 2011. V. 100. № 2. P. 244-252.
6. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder JC, Woodgett JR. Assessment of social interactions behaviors. //J Vis Exp. 2011. V.48. P. 2473.
7. Lipina TV, Kaidanovich-Beilin, O, Patel, S, Wang, M, Clapcote, SJ, Liu, F, Woodgett, JR, and Roder, JC. The interaction of DISC1 and GSK-3 is impaired in the Disc1-L100P mutant mice. //Synapse. 2011. V.65. № 3. P. 234-248.
8. Lipina TV, Roder J. Synergistic interactions between PDE4B and GSK-3: pharmacological evidences on DISC1 mutant mice. //Neuropharmacology, special issue on Schizophrenia. 2012. V.62. № 3. P. 1252-1256.

9. Haque FN, Lipina TV, Roder JC, Wong AH. Social defeat interacts with *Disc1* mutations in the mouse to affect behavior. //Behav Brain Res. 2012. V.233. № 2. P. 337-344.
10. Lipina TV, Haque FN, McGirr A, Boutros P, Thorsten Berger, Tak W Mak, Roder JC. Wong AHC. Prophylactic valproic acid treatment prevents schizophrenia-related behaviour in *Disc1*-L100P mutant mice. //PLoS One. 2012. V. 7. № 12. P. e51562
11. Lipina TV, Martinez A, Roder JC. Dual inhibitor of PDE7 and GSK-3 – VP1.15 acts as antipsychotic and cognitive enhancer in C57BL/6J mice. //Neuropharmacology, special issue on Cognitive Enhancers. 2013. V. 64. №1. P. 205-214
12. Lipina TV, Zai C, Hlousek D, Roder JC, Wong AHC. Maternal immune activation during gestation interacts with *Disc1* point mutation to exacerbate schizophrenia-related behaviors in mice. //The Journal of Neuroscience. 2013. V.33. № 18. P. 7654-7666.
13. Su P, Li S, Chen S, Lipina TV, Wang M, Lai TK, Lee FH, Zhang H, Zhai D, Ferguson SS, Nobrega JN, Wong AH, Roder JC, Fletcher PJ, Liu F. A dopamine D2 receptor-DISC1 protein complex may contribute to antipsychotic-like effects. Neuron. 2014. V. 84. № 6. P.1302-1316.
14. Lipina TV, Roder JC. Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1) interactome and mental disorders: impact of mouse models. //Neuroscience and BioBehavioral Reviews. 2014. V.45. P.271-294
15. Lipina TV, Jekielek M, Beregovoy NA, Starostina MV, Palomo V, Perez DI, Martinez A, Roder JC. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 prevents synaptic long-term depression and facilitates cognition in C57BL/6J mice. //Opera Medica & Physiologica. 2016. V.2. P. 10-25.