
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 57.088;575

ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ РЕПЕРТУАРОВ ГАММА-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЮВЕНИЛЬНОЙ ФОРМОЙ ШИЗОФРЕНИИ

© 2023 г. М. Ю. Плотникова^{1, 2, *}, А. Д. Патрикеев¹, А. Ю. Левченко⁴, О. Ю. Федоренко⁵,
Т. В. Андреева^{1, 2, 3}, Е. И. Рогаев^{1, 2, 3}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Центр генетики и наук о жизни, Университет “Сириус”, Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁵Научно-исследовательский институт психического здоровья Томского национального
исследовательского медицинского центра, Томск, 634014 Россия

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 09.03.2023 г.

Принята к публикации 10.03.2023 г.

Нарушение функции иммунной системы и нейровоспаление, предполагается, могут играть роль в патогенезе шизофрении. При этом роль адаптивного иммунитета на сегодняшний день мало изучена. Данная работа является пилотным исследованием в выявлении разнообразия репертуаров Т-клеточных рецепторов гамма-цепи при шизофрении. В рамках проведенного исследования была апробирована методология выявления иммунных репертуаров Т-клеточных рецепторов (ТКР) гамма-цепи с использованием глубокого секвенирования, на примере нескольких пациентов с ювенильной формой шизофрении. Были выявлены профили клонотипов, оценено их разнообразие и предполагаемые отличия в структуре CDR3-региона TRG (T Cell Receptor Gamma Locus) функциональных клонов у пациентов с ювенильной формой шизофрении по сравнению с контрольными индивидами. Данный подход представляется перспективным для дальнейшего изучения изменений в адаптивной иммунной системе на репрезентативных когортах больных с различными формами шизофрении.

Ключевые слова: шизофрения, NGS, Т-клеточные рецепторы, иммуногенетические факторы, CDR3 TRG, клонотипы.

DOI: 10.31857/S0016675823070081, **EDN:** QPJHMR

Шизофрения — эндогенное полиморфное психическое расстройство, частота встречаемости которого составляет около 1% во всем мире [1]. Данное заболевание характеризуется когнитивными, поведенческими и эмоциональными нарушениями [2]. Ранее проведенные исследования показывают, что воспаление в центральной нервной системе (ЦНС) и нарушения систем иммунного ответа могут играть важную роль в патогенезе шизофрении. Эта гипотеза подтверждается иммуногенетическими данными последних лет, а также повышенной частотой аутоиммунных заболеваний у пациентов с шизофренией [3–7]. Современные технологии NGS-секвенирования открывают новые возможности для изучения иммуногенетических факторов при развитии шизофрении и других нейропсихических патологий. Особый инте-

рес представляет собой изучение гамма-дельта Т-клеточных рецепторов (ТКР), которые представляют минорную фракцию Т-клеток (5–10%), и на данный момент являются малоизученными. При этом, гамма-дельта Т-клетки могут играть значительную регуляторную роль в адаптивном иммунитете у пациентов с ювенильной формой шизофрении.

В исследовании использовали 17 образцов ДНК, выделенной из периферической крови, включающих девять пациентов с ювенильной формой шизофрении и восемь здоровых индивидов контрольной группы до 20 лет (табл. 1). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (№ 5 от 01.12.2016 г.) и локальным

Таблица 1. Список образцов ДНК, выделенных из периферической крови пациентов с шизофренией и здоровых индивидов контрольной группы

№	Диагноз	Возраст	Возраст манифестации заболевания	Пол	Кол-во прочтений	Разнообразие клонотипов
1	Здоровый	19	—	Ж	227007	7103
2	То же	20	—	М	145520	7380
3	«	20	—	Ж	103268	6615
4	«	18	—	Ж	501141	3902
5	«	18	—	М	220172	3721
6	«	18	—	Ж	247434	3920
7	«	20	—	М	319309	5027
8	«	20	—	М	379338	4358
9	Шизофрения	19	13	Ж	199163	4707
10	То же	19	17	Ж	214393	9287
11	«	17	12	М	205314	20204
12	«	20	17	М	231099	7891
13	«	19	15	М	263702	8061
14	«	18	17	М	179660	12040
15	«	18	15	М	345709	4712
16	«	19	18	Ж	155511	4380
17	«	20	14	Ж	256086	5919

этическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 63/7.2014).

Образцы ДНК были выделены из периферической крови набором QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen). Оценка качества и количества выделенной ДНК была проведена с использованием приборов: Nano Drop One C (Thermo Scientific) и Qubit 4.0 (Invitrogen). Мультиплексную ПЦР с олигонуклеотидами на CDR3-регионы TRG (T Cell Receptor Gamma Locus) проводили на готовом наборе реагентов PicoMaxx High Fidelity PCR System (Agilent). Синтез олигонуклеотидов TRG, опубликованных ранее в статьях [8, 9], был произведен компанией «Евроген». Амплификацию проводили по протоколу, опубликованному ранее в статье [9]. Качественно ПЦР-продукты были проверены методом гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Далее была проведена дополнительная очистка ПЦР-продуктов с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Приготовление NGS-библиотек для глубокого секвенирования осуществлялось с помощью набора TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (Illumina). Молярность NGS-библиотек Т-клеточных рецепторов гамма-цепи оценивали методом ПЦР в реальном времени для каждой библиотеки с использованием набора KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems). Оценку качества приготовленных библиотек осуществляли с помощью наборов DNA High Sensitivity Chip (Agilent) и High Sensitivity D5000 (Agilent) на приборах Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) и

TapeStation 4150 (Agilent) соответственно. NGS-библиотеки были просеквенированы на платформе MiSeq Illumina (2 × 250) и проанализированы с использованием программ MiXCR и VDJtools.

Из исходных прочтений в формате FASTQ для каждого образца были получены репертуары Т-клеточных рецепторов. Первым шагом с помощью программы MiXCR [10] исходные данные в формате FASTQ были выровнены на референсные последовательности генов *V*, *D*, *J* и *C*-регионов Т-клеточных рецепторов человека и получены репертуары CDR3 в табличном виде. Для дальнейшей предобработки и первичного анализа был использован пакет программ VDJtools [11].

Полученные репертуары были скорректированы с помощью программы VDJtools Correct для устранения ошибочных клонотипов: были объединены клонотипы, последовательности которых отличались двумя и менее нуклеотидами, и отношение частоты редкого варианта клонотипа к частоте более 0.05. Далее, с помощью программы VDJtools Decontaminate с параметрами по умолчанию, была проведена деконтаминация полученных на предыдущем шаге репертуаров. С помощью программы VDJtools FilterNonFunctional были отфильтрованы нефункциональные клонотипы (клонотипы, в последовательности которых встречаются стоп-кодона или сдвиги рамки считывания).

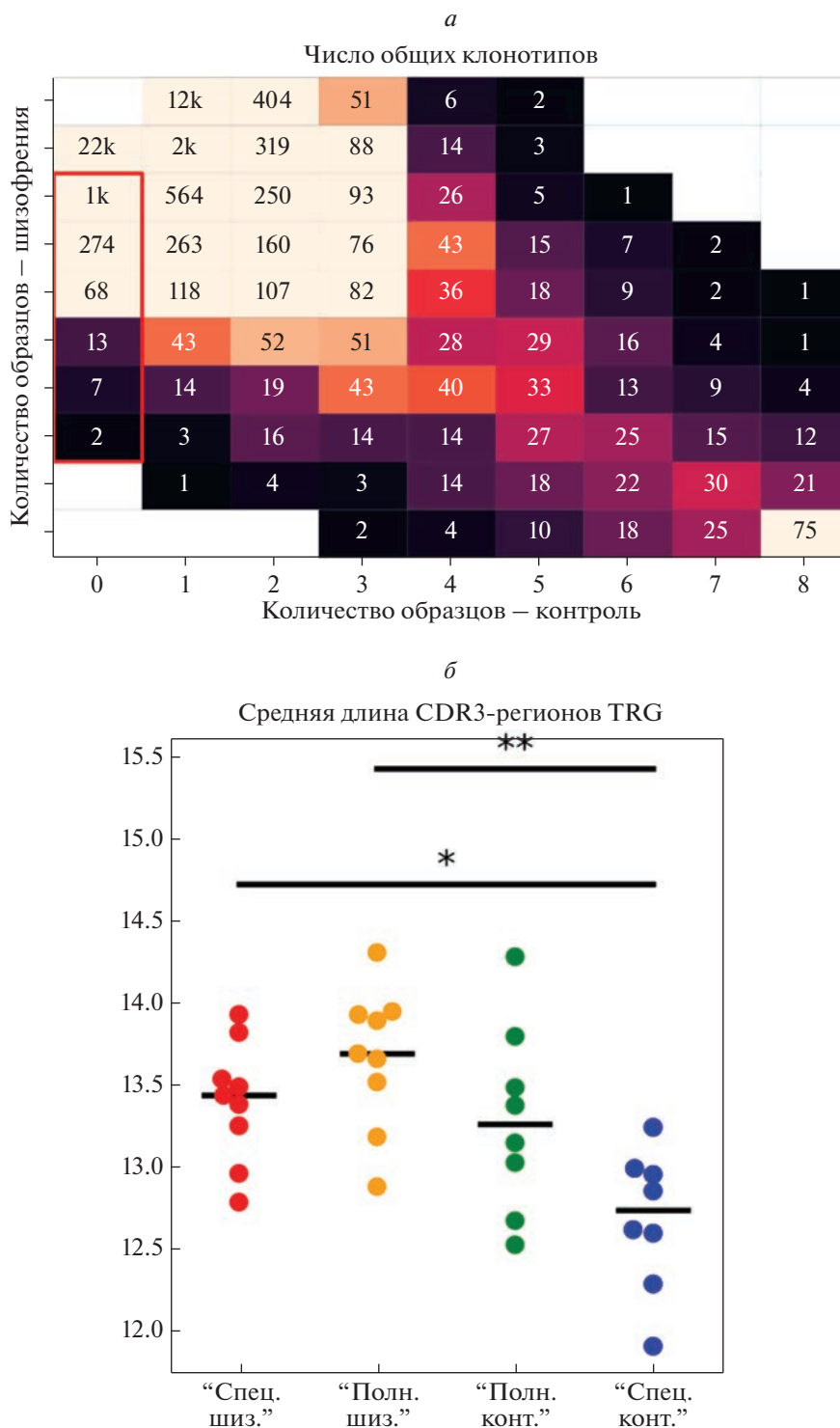


Рис. 1. Результаты сравнительного анализа TRG-репертуаров пациентов с ювенильной шизофренией и контрольной группы здоровых индивидов. *a* — значения в матрице соответствуют числу уникальных клонотипов, общих для образцов из группы больных шизофренией и из контрольной группы (количество образцов указано на соответствующей оси). Были отобраны клонотипы (в красной рамке, “Спец. шиз.”), которые встречаются как минимум у двоих пациентов с шизофренией, но не встречаются в контрольной группе. *б* — сравнительный анализ значений взвешенной средней длины CDR3 (количество аминокислот)-регионов TRG у пациентов с шизофренией и контрольной группой. Для анализа был использован тест Крускала с поправкой Данна. Были отобраны клонотипы “Спец. шиз.”, которые встречаются как минимум у двоих пациентов с шизофренией, но не встречаются в контрольной группе. Аналогичным образом были отобраны клонотипы, специфичные для здоровых индивидов “Спец. конт.”. Свойства полных репертуаров обозначены как “Полн. шиз.”, “Полн. конт.”; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

При расчете базовых статистик (таких как средняя частота клонотипов, средняя длина последовательности CDR3 и других), а также метрик разнообразия репертуаров (индекс Шеннона–Винера, нормализованный на размер репертуара, D50 и других) из исходных репертуаров последовательно выбирались случайные подмножества из 103268 прочтений (это число было выбрано как наименьшее из числа прочтений среди всех репертуаров, а именно для образца № 3).

Последующее сравнение свойств репертуаров (включая анализ их физико-химических свойств) в группе больных и здоровых, а также регрессионный анализ свойств репертуаров относительно возраста и длительности заболевания был проведен с помощью разработанных нами скриптов Python 3. При сравнении свойств репертуаров между группами больных и здоровых использовался *U*-критерий Манна–Уитни.

Для анализа физико-химических свойств репертуаров и сравнения в группах больных и здоровых использовался подход аналогичный тому, что изложен в статье [9]. Так как сравнение полных репертуаров не показало значимых отличий между группами, то мы предположили, что отличия могут быть в субрепертуарах (подмножествах клонотипов), которые специфичны для группы больных или для группы здоровых. Для этого были отобраны только аминокислотные последовательности CDR3, которые встречаются хотя бы в двух образцах из группы больных шизофренией, но не встречаются в контрольной группе (рис. 1,а). Цель данного подхода — выявить наборы клонотипов, специфичных для одной из групп (группа больных шизофренией). В основе выбранного подхода реализованы следующие идеи: 1) клонотипы, сходные по ряду физико-химических свойств, могут определять их специфичность к сходным антигенам; 2) свойства таких “кластеров” клонотипов с общими физико-химическими свойствами будут наиболее выражены в субрепертуарах, характерных только для одной из групп в сравнении (“Спец.”): для этого из полных репертуаров образцов каждой группы были выделены только те клонотипы, которые не встречаются во второй группе и при этом общие хотя бы для двух образцов из первой группы. Таким образом, для свойств, значимо отличающихся между группами больных и здоровых, можно определить пороговое значение (например, среднее для группы “Спец. шиз.”), которое можно использовать как один из маркеров болезни.

Таким образом, получены репертуары CDR3-регионов Т-клеточных рецепторов гамма-цепи 17 индивидов, из которых девять являются больными шизофренией. Количество прочтений для функциональных клонотипов в полученных репертуарах составило $246\,696 \pm 96\,098$, при этом репертуары содержат 7013 ± 4081 клонотипов (среднее $\pm$ стандартное отклонение). Данные по коли-

честву прочтений и клонотипов по каждому индивиду приведены в табл. 1. Всего полученные репертуары содержат 73355 уникальных клонотипов, из которых 9789 являются публичными (встречаются как минимум у двух образцов). Доминирующим сегментом во всех образцах для Топ-100 клонотипов в полученных репертуарах является сегмент TRGV9, доля которого составляет от 56 до 92%, что согласуется с литературными данными [12].

Статистически значимая разница наблюдается в увеличении средней длины CDR3-регионов функциональных TRG в группах шизофрения-специфичных клонотипов по сравнению с контрольной группой (рис. 1,б). Для валидации полученных результатов и поиска новых иммуногенетических изменений в репертуарах Т-клеточных рецепторов пациентов с шизофренией и другими нейropsychическими патологиями необходимо проведение дополнительных исследований на расширенных выборках. Дальнейшие исследования в этой области могут пролить свет на изменение адаптивного иммунитета у пациентов с шизофренией.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер гранта 19-75-30039). Авторы выражают благодарность Светлане Александровне Ивановой за предоставление коллекции образцов периферической крови пациентов с шизофренией и контрольной группы здоровых индивидов.

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

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Perälä J., Suvisaari J., Saarni S.I. et al.* Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population // *Arch. Gen. Psychiatry*. 2007. V. 64. № 1. P. 19–28.
<https://doi.org/10.1001/ARCHPSYC.64.1.19>
2. *Vallée A.* Neuroinflammation in Schizophrenia: The key role of the WNT/ β -catenin pathway // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 5.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23052810>
3. *Ushakov V.L., Malashenkova I.K., Kostyuk G.P. et al.* The relationship between inflammation, cognitive disorders and neuroimaging data in schizophrenia // *Zh. Nevrol. i Psih. im. S.S. Korsakova*. 2020. V. 120. № 11. P. 70–78.
<https://doi.org/10.17116/JNEURO202012011170>

4. Mikocziova I., Greiff V., Sollid L.M. Immunoglobulin germline gene variation and its impact on human disease // *Genes Immun.* 2021. V. 22. № 4. P. 205–217. <https://doi.org/10.1038/S41435-021-00145-5>
5. Upthegrove R., Manzanares-Teson N., Barnes N.M. Cytokine function in medication-naïve first episode psychosis: A systematic review and meta-analysis // *Schizophr. Res. Elsevier.* 2014. V. 155. № 1–3. P. 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2014.03.005>
6. Fernandes B.S., Steiner J., Bernstein H.G. et al. C-reactive protein is increased in schizophrenia but is not altered by antipsychotics: Meta-analysis and implications // *Mol. Psychiatry.* 2015. V. 21. № 4. P. 554–564. <https://doi.org/10.1038/MP.2015.87>
7. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Spuch C. et al. Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship // *Schizophr. Res. Elsevier.* 2018. V. 197. P. 19–33. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2017.11.023>
8. Langerak A.W., Groenen P.J.T.A., Brüggemann M. et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations // *Leukemia.* 2012. V. 26. № 10. P. 2159–2171. <https://doi.org/10.1038/LEU.2012.246>
9. Aliseychik M., Patrikeev A., Gusev F. et al. Dissection of the human T-cell receptor γ gene repertoire in the brain and peripheral blood identifies age- and Alzheimer's disease-associated clonotype profiles // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00012/PDF>
10. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I. et al. MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 5. P. 380–381. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3364>
11. Shugay M., Bagaev D., Turchaninova M.A. et al. VDJtools: Unifying post-analysis of T-cell receptor repertoires // *PLoS Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 11. P. e1004503. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004503>
12. Ravens S., Schultze-Florey C., Raha S. et al. Human $\gamma\delta$ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection // *Nat. Immunol.* 2017. V. 18. № 4. P. 393–401. <https://doi.org/10.1038/NI.3686>

Pilot Study to Detect the Repertoires of T-Cell Receptor Gamma Chains in Patients with Juvenile Schizophrenia

M. Yu. Plotnikova^{a, b, *}, A. D. Patrikeev^a, A. Yu. Levchenko^d, O. Yu. Fedorenko^e,
T. V. Andreeva^{a, b, c}, and E. I. Rogaev^{a, b, c}

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

^bCenter for Genetics and Life Sciences, “Sirius” University, Krasnodarskiy kray, p. Sirius, 354340 Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^dInstitute of Translational Biomedicine, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^eMental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634014 Russia

*e-mail: plotnikova.m.u.1996@gmail.com

Disfunction of immune system and neuroinflammation may play a role in pathogenesis of schizophrenia. The role of adaptive immune system has to be elucidated. We present a pilot study to test the methodology of profiling of immune repertoires of the TCR gamma chain by deep sequencing using several patients with juvenile schizophrenia and unaffected control subjects. The clonotype profiles were revealed and their diversity and presumable differences in structure of CDR3 TRG region of functional clones in juvenile schizophrenia and controls were estimated. This approach is perspective for further comprehensive study of changes in adaptive immune system in representative cohorts of patients with different forms of schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, NGS, T-cell receptors, immunogenetic factors, CDR3 TRG, clonotypes.