

На правах рукописи



ЛОПАТКИНА МАРИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

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

1.5.7 – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН
Лебедев Игорь Николаевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор
Иванова Светлана Александровна

Официальные оппоненты:

Демикова Наталия Сергеевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой медицинской генетики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва);

Смирнихина Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, доцент, руководитель лаборатории редактирования генома Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (г. Москва).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «___» _____ 202__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Хитринская И.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Хромосомные болезни, обусловленные нарушением числа или структуры хромосом, представляют собой обширную группу наследственных болезней, характеризующихся врожденными пороками развития и нередко сопровождающихся интеллектуальными нарушениями, расстройствами аутистического спектра, эпилепсией, нарушениями обменных процессов и др. [Бочков Н.П. и др., 2018; Гинтер Е.К. и др., 2022]. Современные полногеномные технологии, разработанные для диагностики генетических дефектов при задержке интеллектуального развития, позволяют выявлять большое число субмикроскопических aberrаций, или вариаций в числе копий участков ДНК (CNV) [Шилова Н.В., Миньженкова М.Е., 2018; Юров И.Ю. и др., 2021].

В случае выявления CNV у пациента, интерпретация клинической значимости и оценка гено-фенотипических корреляций может осложняться наличием неспецифических симптомов, клиническим полиморфизмом заболевания, неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью выявленного хромосомного варианта, наличием протяженной хромосомной перестройки, затрагивающей одновременно широкий спектр генов с различными функциями, а также отсутствием релевантного типа клеток для анализа эффектов CNV. В последнее время широкое применение находят методы получения целевого типа клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с различными хромосомными и геномными мутациями [Лагарькова М.А., 2019].

Настоящее исследование направлено на изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе патологического эффекта реципрокных хромосомных микроделений и микродупликаций в модельной системе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с идиопатическими интеллектуальными нарушениями и CNV, затрагивающими единственный ген – контактин-6 (*CNTN6*), рассматриваемый в качестве кандидатного гена развития нервно-психических заболеваний [Kashevarova A.A. et al., 2014; Zuko A. et al., 2016; Mercati O. et al., 2017].

Степень научной разработанности темы исследования. Благодаря технологиям репрограммирования соматических клеток активно создаются модельные системы на основе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и психическими расстройствами. Работы по изучению механизмов развития хореи Гентингтона, болезни Паркинсона, Штаргардта, синдрома Коэна, бокового амиотрофического склероза и спинальной мышечной атрофии ведутся как в зарубежных, так и отечественных лабораториях [Chechetkina S.A. et al., 2022; Grigor'eva E.V. et al., 2020; Maretina M.A. et al., 2022; Novosadova E.V. et al., 2019; Vigont V.A. et al., 2021; Лебедин М.Ю. и др., 2017]. В последние годы опубликовано несколько работ, посвященных изучению механизмов реализации патологического эффекта хромосомной мутации при проведении транскриптомного анализа в модельных системах нейронов, дифференцированных из ИПСК [Adhya D. et al., 2021; Frega M. et al., 2019; Johnstone M. et al., 2019]. Однако работ, нацеленных на изучение патогенеза микроделеционных и

микродупликационных синдромов, обусловленных микроструктурными абберациями, разнонаправленно изменяющими число копий хромосомных регионов и генов, в них локализованных, в настоящее время не так много [Adamo A. et al., 2015; Gillentine M.A. et al., 2017]. Более того, в настоящий момент отсутствуют данные об особенностях генной экспрессии в нейронах с реципрокными моногенными CNV, представленными разнонаправленными изменениями в числе копий одного и того же хромосомного региона.

Цель исследования:

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна. С использованием технологий клеточного репрограммирования и методов редактирования генома впервые получены пациент-специфичные ИПСК от индивидов с интеллектуальными расстройствами и уникальными реципрокными хромосомными мутациями в субсегменте 3p26.3, ИПСК от условно здорового индивида, являющегося носителем микродупликации *CNTN6*, и линия ИПСК с функциональной нуллисомией по данному гену. Впервые исследованы особенности дифференциальной экспрессии генов в нейронах, полученных из ИПСК с различным числом копий *CNTN6*. Для нейрональных клеток с реципрокными моногенными CNV впервые показаны глобальные транскрипционные изменения по всему геному. Белковые продукты гипоэкспрессирующихся генов участвуют в значимых для развития мозга биологических процессах (нейрогенезе и синаптической передаче). Впервые охарактеризован спектр транскриптомных изменений в нейронах с моногенными реципрокными CNV, который представлен 8 возможными комбинациями изменения экспрессии генов в зависимости от числа копий *CNTN6*. Сравнение списков дифференциально экспрессирующихся генов позволило выявить гены, однонаправленно изменяющие свою экспрессию вне зависимости от типа хромосомной мутации. Впервые установлены особенности

экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК бессимптомного носителя моногенной CNV, затрагивающей *CNTN6*.

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

Методология и методы исследования. Научная идея исследования заключается в том, что для нейронов, дифференцированных из ИПСК индивидов-носителей реципрокных моногенных CNV, установлены общие паттерны изменения экспрессии генов, проявляющиеся сходными изменениями фенотипа пациентов с нарушениями нервно-психического развития. Репрограммирование культур фибробластов, полученных от пациентов и их родственников с реципрокными микроделециями и микродупликациями гена *CNTN6*, в ИПСК, а также направленная дифференцировка линий ИПСК в нейроны, проводились в совместных исследованиях с Отделом молекулярных механизмов онтогенеза Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики СО РАН» (заведующий – д.б.н, профессор О.Л. Серов). Оценка распространенности микроделций и микродупликаций гена *CNTN6* в группе пациентов с нервно-психическими заболеваниями была проведена в сотрудничестве с лабораторией молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (заведующая – д.м.н., профессор С.А. Иванова). Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Было получено разрешение комитетов по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ и НИИ психического здоровья Томского НИМЦ.

Для оценки уровня экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделцией, микродупликацией и нокаутом гена *CNTN6*, а также здоровых индивидов, был использован транскриптомный анализ на микрочипах, проведенный на базе ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ с использованием ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Дальнейшая биоинформатическая

обработка данных проводилась на базе Отдела молекулярных механизмов онтогенеза Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики СО РАН» и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Для оценки распространенности микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* использована технология ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и метод матричной сравнительной геномной гибридизации (aCGH).

Положения, выносимые на защиту:

1. Нейроны, дифференцированные из ИПСК пациентов с реципрокными моногенными хромосомными микроделениями и микродупликациями 3p26.3, характеризуются множественными изменениями транскрипционной активности генов, локализованных как в пределах, так и вне региона хромосомной перестройки. Изменение экспрессии затрагивает преимущественно гены, продукты которых вовлечены в нейрогенез и синаптическую передачу.
2. В нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с микроделением и микродупликацией гена *CNTN6*, выявлено 8 категорий транскриптомных эффектов, соответствующих аддитивной, доминантной и U-образной моделям фенотипического проявления реципрокных CNV. Доминирующим эффектом является снижение транскрипции общих дифференциально экспрессирующихся генов как в клетках с микроделением, так и с микродупликацией *CNTN6*, по сравнению с нормальной копийностью гена.
3. Среди дифференциально экспрессирующихся генов в нейронах, полученных из ИПСК индивидов с микродупликацией *CNTN6*, регистрируются различия по представленности гипо- и гиперэкспрессирующихся генов в зависимости от их фенотипических особенностей: в нейронах, полученных из ИПСК пациента с умственной отсталостью, преобладают гены со сниженным уровнем экспрессии (89 % ДЭГ), тогда как для нейронов, полученных из ИПСК его отца без фенотипических проявлений, соотношение гипо- и гиперэкспрессирующихся генов составляет 43 % и 57 %, соответственно.

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

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на Всероссийской итоговой 74 студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова (Томск, 2015); международной научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы медицинской генетики» (Томск, 2016); XXV межрегиональной научно-практической конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2018); Конгрессе молодых ученых

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

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

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

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 233 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список литературы и 4 приложения. Работа иллюстрирована 52 рисунками, 28 таблицами. Библиография включает 336 источников, из них 22 источника отечественной и 308 источников зарубежной литературы, а также 6 интернет-ресурсов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн диссертационного исследования представлен на рисунке 1.

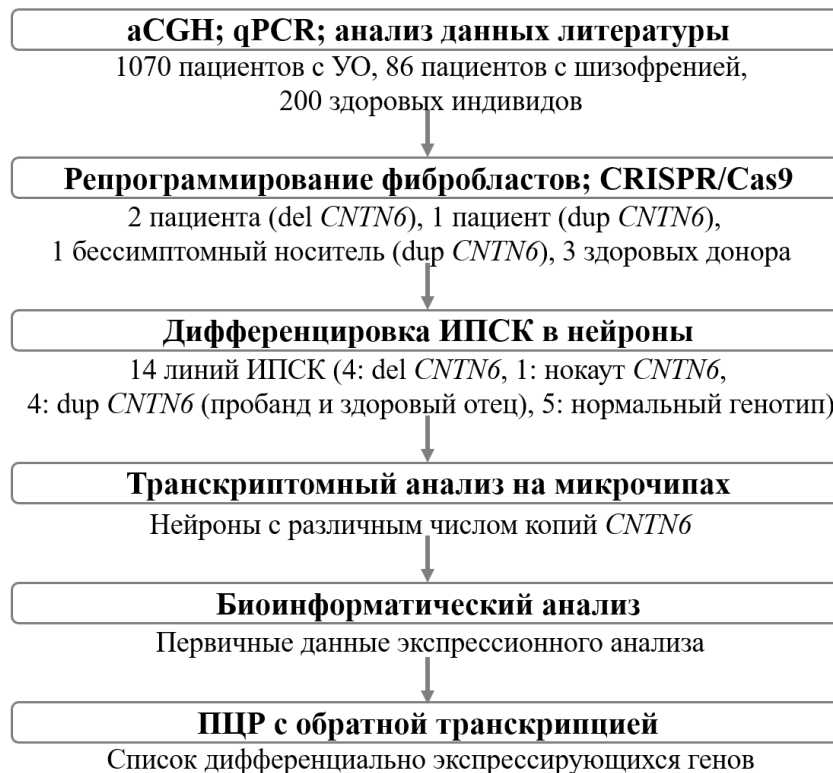


Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования.

На первом этапе исследования для оценки распространенности микроделечий и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, был проведен скрининг пациентов с нервно-психическими заболеваниями с помощью методов количественной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) (200 пациентов: 142 мальчика, 58 девочек, средний возраст $9,10 \pm 3,89$ лет) и aCGH (870 пациентов, 500 мальчиков, 370 девочек, средний возраст $6,23 \pm 3,67$ лет). Проведена ПЦР-диагностика микроструктурных aberrаций в регионе 3p26.3 для выявления вероятного носительства микроделечий и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке больных шизофренией (86 пациентов, включая 45 мужчин и 41 женщины в возрасте от 18 до 68 лет (средний возраст составил $35,81 \pm 11,04$ лет)). В контрольную группу (популяционная выборка) вошли 97 здоровых мужчин и 103 женщины (всего 200 человек) в возрасте от 23 до 69 лет ($35,12 \pm 7,55$ лет).

На втором этапе исследования путем стандартной процедуры биопсии получено $0,5 \text{ см}^2$ кожи предплечья у пробанда и его сестры с микроделечией *CNTN6* (возраст на момент биопсии фибробластов кожи составил 20 и 18 лет, соответственно), пациента с микродупликацией *CNTN6* (13 лет), бессимптомного носителя хромосомной мутации – отца пациента с микродупликацией *CNTN6* (40 лет), а также трех здоровых доноров мужского пола (31, 32, 39 лет). Получены первичные культуры фибробластов. С помощью aCGH и qPCR подтверждено носительство перестроек в культивируемых клетках. Структура перестройки и точки разрыва в регионе 3p26.3 уточнены с помощью полногеномного секвенирования. Также с помощью полноэкзомного секвенирования исключено наличие в геномах пациентов других патогенетически значимых вариантов.

На третьем этапе исследования применен способ экзогенной экспрессии транскрипционных факторов человека (KLF4, OCT4, SOX2 и c-MYC) с помощью лентивирусных векторов LeGO. Получены 4 линии ИПСК от пациентов с микроделецией (2 линии – от пробанда, 2 – от его сестры), 2 линии ИПСК от пациента с микродупликацией гена *CNTN6*, 2 линии ИПСК от здорового носителя микродупликации гена *CNTN6*, а также 5 линий ИПСК от трех здоровых доноров мужского пола. С помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 получена линия ИПСК с нокаутом гена *CNTN6*. Отсутствие в репрограммированных клетках числовых и крупных хромосомных мутаций подтверждено с помощью стандартного цитогенетического исследования. Матричная сравнительная геномная гибридизация и qPCR исключили присутствие дополнительных несбалансированных хромосомных aberrаций. С целью подтверждения плюрипотентности полученных клеточных линий, колонии ИПСК были иммуноокрашены первичными антителами к белкам Nanog, Oct4, TRA-1-60 и SSEA4. Получены эмбриоидные тельца и проведен тератомный тест с последующим анализом маркеров плюрипотентности.

На четвертом этапе исследования клетки полученных линий ИПСК были дифференцированы в нейрональном направлении по стандартному протоколу [Zhang Y. et al., 2013]. Для получения нейронов использованы 3 лентивирусные конструкции, одна из которых включала в себя последовательность гена, кодирующего транскрипционный фактор нейрогенин-2, *Ngn2*. Для стимулирования образования синапсов дифференцирующиеся клетки культивировали совместно с глиальными клетками мыши. Для подтверждения корректной дифференцировки оценен уровень экспрессии нейрональных маркеров с помощью ОТ-ПЦР (*FOXP2*, *BRN2*, *CUX1*, *CUX2*, *SYN1*, *vGLUT1*, *vGLUT2*, *FEZF2* и *BHLHE22*) и проведено иммуноокрашивание с первичными антителами к *Tubb3*, *NF200*, *MAP2*, *SYP* и *PSD95*.

На пятом этапе исследования проведен транскриптомный анализ для образцов тотальной РНК, выделенной из нейрональных культур и мышечных глиальных клеток, на поверхности которых проходила дифференцировка. Полученные результаты использованы в биоинформатическом анализе с использованием пакета *limma* [Ritchie M. et al., 2015], уровнем значимости $P_{FDR} < 0,05$ и значением параметров модели *robust* = true, *trend* = true. Из дальнейшего анализа исключены гены, экспрессирующиеся в глии. Для выявления функциональных групп генов проведен анализ обогащения генов с помощью ресурса Webgestalt (WEB-based GENE Set Analysis Toolkit). Выборочная верификация результатов анализа экспрессии на микрочипах проведена для генов *CNTN6*, *CBLN2*, *OXR1*, *PEG3*, *CHL1* и *NOTCH1* с помощью ОТ-ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

При проведении скрининга мутаций в регионе 3p26.3 в выборке пациентов с нервно-психическими заболеваниями и группе контроля нами не было выявлено ни

одного нового индивида с измененным числом копий гена *CNTN6*. С учетом описанных нами ранее пациентов и данных литературы оценена суммарная частота микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в группе пациентов с нарушением нервно-психического развития и группе здоровых индивидов, которая составила 1 : 711 (0,14 %) и 1 : 917 (0,11 %), соответственно.

Соотношение случаев микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* среди пациентов с нарушением нервно-психического развития составило 1 : 1,13, аналогичный показатель в группе здоровых составил 1 : 4,67. Таким образом, в группе здоровых индивидов в сравнении с группой пациентов с нарушением нервно-психического развития отмечено статистически значимое преобладание микродупликаций гена *CNTN6* ($p = 0,0372$). Следовательно, отсутствие фенотипических проявлений перестройки у индивида более вероятно в случае наличия у него микродупликации *CNTN6*. Недостаток микроделений среди всех выявленных CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, в группе здоровых индивидов, вероятно, может указывать, с одной стороны, на их более тяжелое клиническое проявление, а с другой – на неполную пенетрантность микродупликаций *CNTN6*.

Для 100 описанных в литературе случаев микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* данные о наследовании хромосомной перестройки были получены в 46 случаях (25 мутаций материнского, 18 – отцовского происхождения, 1 *de novo* мутация, 2 мутации унаследованы, но не известно, от кого из родителей). Соотношение частоты перестроек материнского и отцовского происхождения у пациентов с делециями и дупликациями *CNTN6* составило 1,2 : 1 и 1,6 : 1, соответственно. Статистически значимых различий в частотах CNV, унаследованных от матери или от отца, в зависимости от типа перестройки (микроделеция или микродупликация) установлено не было ($p = 0,43$).

Получение линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*

В процессе выполнения работы были созданы и охарактеризованы в соответствии с международными стандартами линии ИПСК с гетерозиготной микродупликацией, микроделением и нокаутом гена *CNTN6* (Рис. 2, 3; Табл. 1).

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

Для получения и последующего анализа списков дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с нарушением нервно-психического развития и несущих разное число копий гена *CNTN6*, было проведено сравнение уровней экспрессии генов в следующих шести группах (Табл. 2).

1) Анализ обогащения 1141 ДЭГ в группе сравнения «Гетерозиготная делеция *CNTN6* (пробанд) – норма» выявил 17 обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$), в частности: ответ на действие интерферона-альфа, клеточный ответ на алкалоиды, организация цитоскелета, процессы гестации,

Таблица 1 – Характеристика линий ИПСК с различным числом копий гена *CNTN6*

Идентификатор линии ИПСК	Результат aCGH (ISCN (2020))	Основные фенотипические особенности доноров фибробластов кожи ⁽¹⁾	Пол	Возраст на момент биопсии
iTAF3del17 ⁽⁴⁾ iTAF3del21	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (1155939_1451037)×1	Задержка развития, УО, микроцефалия, абсансная эпилепсия, дизартрия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа и пальцев рук, гипоплазия щитовидной железы	М	20 лет ⁽²⁾
iTAF3del17C98 ⁽⁵⁾	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (1155939_1451037)×1	—	—	—
iTAF13del26 ⁽⁴⁾ iTAF13del27 ⁽⁴⁾	46,XX.arr[hg38] 3p26.3 (1155939_1451037)×1	Задержка развития, УО, микроцефалия, дислексия, дисграфия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа и пальцев рук, гипоплазия щитовидной железы	Ж	18 лет ⁽³⁾
iTAF4dup14 ⁽⁶⁾ iTAF4dup22 ⁽⁶⁾	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (684961_1451037)×3 pat	Задержка развития, умеренная степень УО, микроцефалия, гиперкинезы, дизартрия, СДВГ, лицевые дисморфии, аномалии черепа	М	13 лет
iTAF14dup8(hc) ⁽⁷⁾ iTAF14dup10(hc) ⁽⁷⁾	46,XY.arr[hg38] 3p26.3 (591766_1516880)×3 mat	Бессимптомный носитель дупликации <i>CNTN6</i>	М	40 лет
iTAF1nor25 iTAF1nor36	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	31 год
iTAF2nor5 iTAF2nor24	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	39 лет
iNAF1nor6	arr(X,Y)×1,(1–22)×2	Здоровый донор	М	32 года

Примечание: 1 – Описание фенотипа пациентов с микроделецией и микродупликацией *CNTN6* опубликовано в статье Kashevarova A.A. et al. (2014); 2, 3 – Задержка психомоторного развития выявлена возрасте 6 и 4 лет, соответственно; 4 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Shnaider T.A. et al. (2019); 5 – Линия ИПСК с нокаутом гена *CNTN6* получена из клеток линии с микроделецией 3p26.3 (iTAF3del17) при внесении мутации сдвига рамки считывания в интактный аллель *CNTN6*; 6 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Gridina M.M. et al. (2018); 7 – Описание линий ИПСК опубликовано в статье Gridina M.M. et al. (2019); «hc» (healthy carrier) – здоровый носитель дупликации *CNTN6*; СДВГ – синдром дефицита внимания и гиперактивности; УО – умственная отсталость; Ж, М – женский и мужской пол, соответственно.

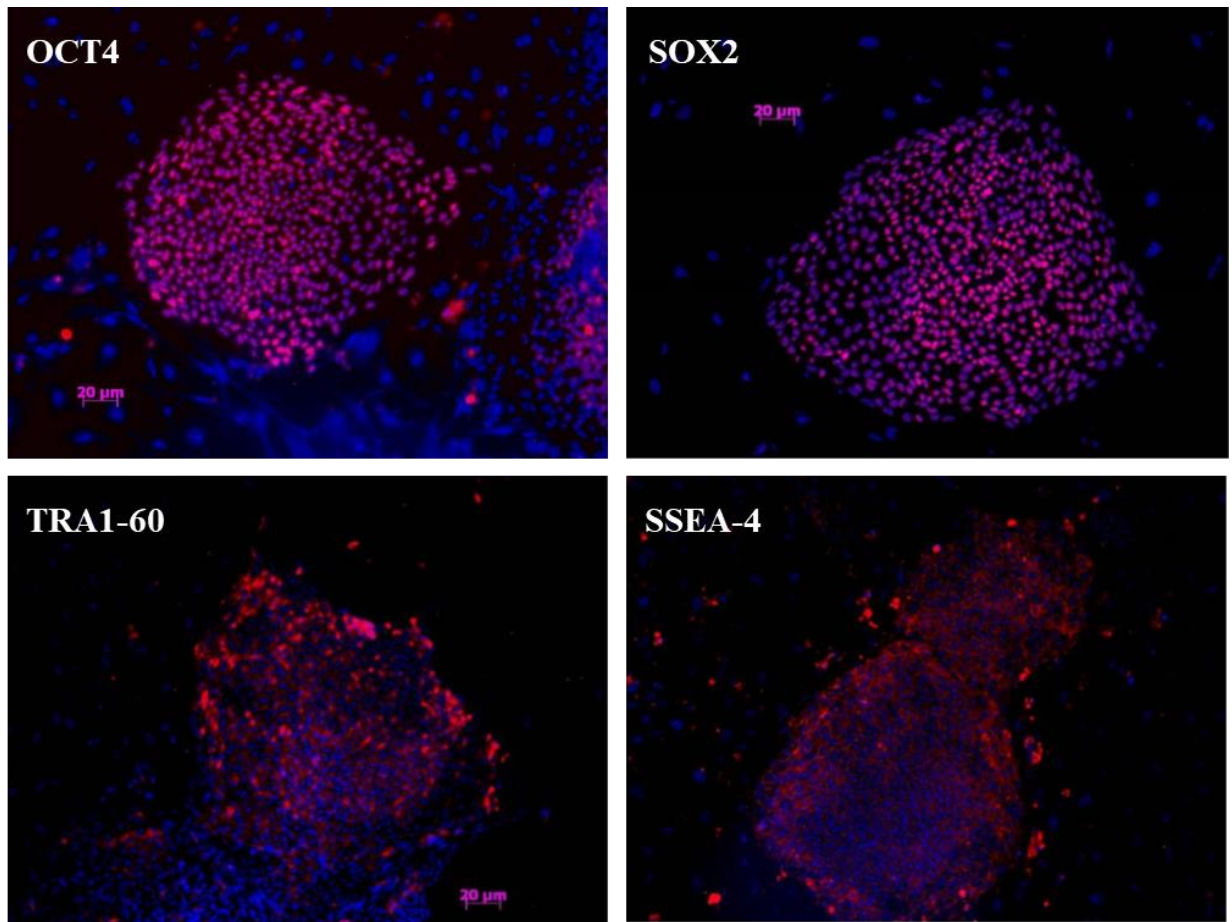


Рисунок 2 – Иммунофлуоресцентный анализ транскрипционных факторов OCT4 и SOX2 и поверхностных антигенов TRA1-60 и SSEA-4 в клетках линии iTAF3del37. Позитивные клетки по данным маркерам окрашиваются в красный цвет. Ядра клеток дополнительно окрашены DAPI (синий цвет).

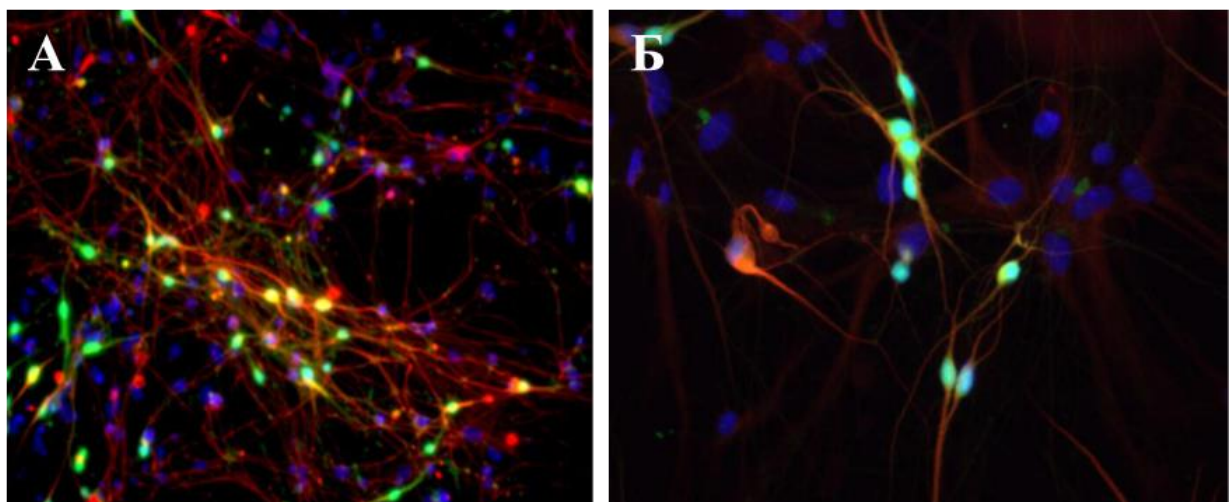


Рисунок 3 – Маркеры зрелых нейронов NF-H и MAP2 в нейронах, полученных после 25 дней дифференцировки ИПСК iTAF4dup22 и iTAF4dup14 с дупликацией гена *CNTN6*. (А) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против нейрофиламента (NF-H), дифференцировка в нейроны линии iTAF4dup22; (Б) Окрашивание клеток (красный цвет) с использованием антител против MAP2, дифференцировка в нейроны линии iTAF4dup14; синий цвет – ядра клеток, окрашенные DAPI; зеленый цвет – флуоресценция зеленого белка указывает на экспрессию гена *EGFP* в трансдуцированных клетках

Таблица 2 – Группы сравнения для идентификации ДЭГ

Группа сравнения	Повышение экспрессии	Снижение экспрессии	Общее число ДЭГ
Гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i> (пробанд) – норма	338 (30 %)	803 (70 %)	1141
Гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i> (сестра пробанда) – норма	1832 (57 %)	1386 (43 %)	3218
Нокаут <i>CNTN6</i> ^{del/mut} – норма	49 (23 %)	168 (77 %)	217
Нокаут <i>CNTN6</i> ^{del/mut} – гетерозиготная делеция <i>CNTN6</i>	98 (26 %)	285 (74 %)	383
Гетерозиготная дупликация <i>CNTN6</i> (пробанд) – норма	384 (11 %)	3138 (89 %)	3522
Гетерозиготная дупликация <i>CNTN6</i> (отец пробанда) – норма	1835 (57 %)	1393 (43 %)	3228

Примечание: «норма» – нейроны, дифференцированные из ИПСК пациентов с нормальным числом копий гена *CNTN6*. В скобках указан процент от общего числа ДЭГ.

локализация белка на периферии клетки, движение клетки или субклеточного компонента, положительная регуляция каталитической активности, регуляция жизненного цикла вируса и репликации вирусного генома.

2) Анализ обогащения, проведенный для 3218 ДЭГ в группе сравнения «Гетерозиготная делеция *CNTN6* (сестра пробанда) – норма», показал вовлеченность продуктов данных генов в такие биологические процессы, как долгосрочная память, развитие сердечного клапана, позитивная регуляция синаптической передачи, репликация ДНК, развитие мезенхимы и костной ткани, миграция клеток.

3) Общее число выявленных ДЭГ в группе сравнения «Нокаут *CNTN6*^{del/mut} – норма» составило 217 и являлось наименьшим среди всех групп сравнения. Паттерн экспрессии генов в нейронах с функциональной нуллисомией по гену *CNTN6* был близок к паттерну клеток с нормальным кариотипом. Анализ обогащения, проведенный для 217 ДЭГ, не показал статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов, что могло явиться следствием небольшого числа анализируемых ДЭГ. Результаты анализа показали, что продукты ДЭГ связаны с такими биологическими процессами, как биосинтез цГМФ, локализация белка на плазматической мембране, транспорт катионов, негативная регуляция межклеточной коммуникации, регуляция процессов модификации белка, нейрогенез и системные процессы ($P_{FDR} > 0,05$).

4) Анализ обогащения 383 ДЭГ группы сравнения «Нокаут *CNTN6*^{del/mut} – гетерозиготная делеция *CNTN6*» не выявил статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов, вероятно, из-за небольшого объема выборки ДЭГ. Продукты данных генов участвуют в сигнальном пути ионотропного рецептора глутамата, ответе на действие цитокинов, регуляции активности сигнальных рецепторов, отрицательной регуляции транскрипции РНК-полимеразой II, организации синапсов, клеточной адгезии, миграции клеток, развитию центральной нервной системы (ЦНС) и мышечной ткани, дифференцировке эпителиальных клеток и иммунном ответе ($P_{FDR} > 0,05$).

5) Общее число выявленных ДЭГ в группе сравнения «Гетерозиготная дупликация *CNTN6* (пробанд) – норма» составило 3522 и являлось максимальным среди всех групп сравнения. Статистически значимо обогащенные категории генных онтологий ($P_{FDR} < 0,05$) включали в себя регуляцию катаболизма белка-предшественника амилоида, организацию везикул, сборку и локализацию белковых комплексов, организацию митохондрий, процессинг РНК, сборку и локализацию органелл, модификацию протеинов путем конъюгации или удаления малых белковых молекул, внутриклеточный транспорт, организацию хромосомы, клеточный цикл и ответ клетки на стресс.

6) Шестая группа сравнения уровней экспрессии «Гетерозиготная дупликация *CNTN6* (отец пробанда) – норма» также характеризовалась большим числом выявленных ДЭГ (3228). Статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов, за исключением клеточной миграции ($P_{FDR} = 0,027$), выявлено не было. Продукты ДЭГ вовлечены в процессы долгосрочной памяти, катаболизм пиримидиновых рибонуклеозидов, метаболизм ДНК, морфогенез клапанов сердца, развитие мезенхимы, развитие костной системы, регуляцию репликации вирусного генома, фосфорилирования белка, сигнального пути рецептора глутамата, ERK каскада и клеточного цикла, положительную регуляцию синаптической передачи и молекулярных функций ($P_{FDR} > 0,05$).

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

Одной из основных задач данного исследования являлось сравнение особенностей изменения экспрессии генов в нейронах, несущих реципрокные CNV в регионе 3p26.3, относительно клеток с нормальным кариотипом. Для нейронов с микроделецией и микродупликацией *CNTN6* «общими» – т.е. изменившими свою экспрессию в клетках с обоими типами мутаций – оказались 485 ДЭГ, большая часть которых снижала свою экспрессию. Помимо генов, изменивших свою экспрессию в клетках с различным числом копий гена *CNTN6*, были выявлены «уникальные» ДЭГ, изменение экспрессии которых было отмечено только для клеточных линий с определенным типом хромосомной мутации. При этом экспрессия в нейронах с другой хромосомной абберацией и в клетках контрольных линий не изменялась.

По характеру изменений экспрессии общих ДЭГ в клетках с гетерозиготной микроделецией и микродупликацией *CNTN6* относительно клеток с нормальным кариотипом, мы идентифицировали 8 категорий транскриптомных эффектов реципрокных моногенных CNV, затрагивающих ген *CNTN6*, соответствующих аддитивной, U-образной и доминантной моделям проявления фенотипических эффектов реципрокных CNV [Deshpande A., Weiss A., 2018] (Рис. 4, Табл. 3).

Анализ обогащения генных онтологий для биологических процессов, проведенный для 485 общих ДЭГ (Табл. 3, пункты 1–4), продемонстрировал вовлеченность продуктов генов в следующие процессы ($P_{FDR} < 0,05$): опосредованная

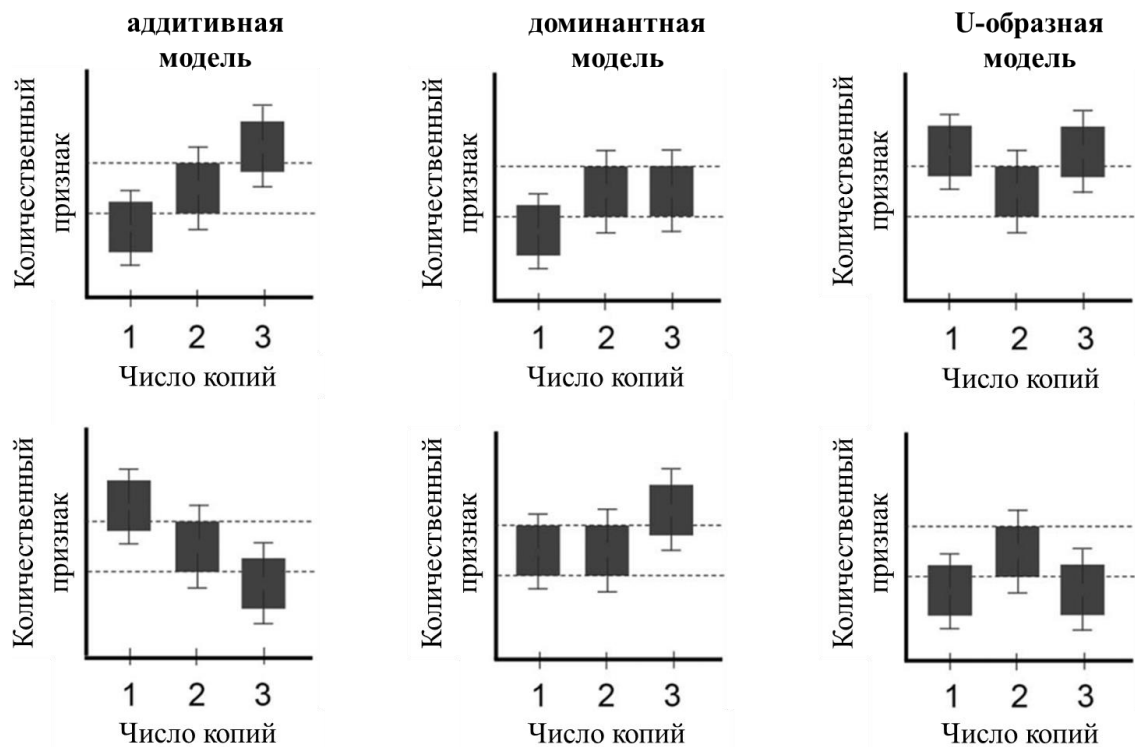


Рисунок 4 – Схематичное представление аддитивной, доминантной и U-образной моделей реализации фенотипических эффектов реципрокных CNV (по Deshpande A., Weiss A., 2018).

Таблица 3 – Категории транскриптомных эффектов реципрокных моногенных CNV, затрагивающих ген *CNTN6*

№	Транскриптомный эффект CNV в нейронах	Общее число ДЭГ	Теоретическая модель (по Deshpande A., Weiss A., 2018)
1	дупликация ↑ и делеция ↑	25 (5 %)	U-образная модель
2	дупликация ↓ и делеция ↓	402 (83 %)	U-образная модель
3	дупликация ↓ и делеция ↑	51 (11 %)	Аддитивная модель
4	дупликация ↑ и делеция ↓	7 (1 %)	Аддитивная модель
5	дупликация ↑	352 (12 %)	Доминантная модель
6	дупликация ↓	2685 (88 %)	Доминантная модель
7	делеция ↑	262 (40 %)	Доминантная модель
8	делеция ↓	394 (60 %)	Доминантная модель

Примечание: ↑ – повышение экспрессии генов; ↓ – снижение экспрессии генов. В скобках указан процент от числа общих (пункты 1–4) и уникальных ДЭГ (пункты 5–6 и 7–8).

интегрином регуляция клеточной адгезии, регуляция системных процессов, образования синапсов, транспорта веществ и мембранного потенциала, развитие клетки, локализация белковых комплексов, поведение и нейрогенез. Обогащенными категориями для клеточных компартментов являлись: синапс, нейрон (сома, аксон и дендриты), цитоскелет, эндосомы, секреторные пузырьки, клеточные контакты, цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл. Наиболее обогащенной (коэффициент обогащения равен 3,8) оказалась категория «синапс» (64 гена из нашего набора ДЭГ отнесены к данной категории). Подавляющее большинство генов, принадлежащих данной категории, характеризовалось сниженной относительно нормы экспрессией (64 из 65 генов).

Примечательно, что продукты 402 общих гипозэкспрессирующихся ДЭГ в нейронах как с микроделецией, так и микродупликацией *CNTN6*, были вовлечены в следующие биологические процессы: синаптическая передача сигналов, регуляция образования синапсов, генерация, развитие и дифференцировка нейронов, регуляция цикла синаптических везикул, организация проекции клеток, связанных с плазматической мембраной, локализация рецепторов в синапсах и везикулярный транспорт. Идентификация общих ДЭГ (преимущественно со сниженной регуляцией) и обогащенных категорий биологических процессов может указывать на общность затронутых перестройкой молекулярных путей, что в свою очередь, может объяснять схожесть фенотипических проявлений реципрокных CNV в регионе 3p26.3, в частности интеллектуальных нарушений, расстройств аутистического спектра и др.

Особенности экспрессии генов в нейронах с микродупликацией 3p26.3, полученных от пробанда с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового отца

В процессе работы нами были получены данные об изменении экспрессии генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пробанда с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового отца, и обозначены 8 групп транскриптомных эффектов микродупликации 3p26.3, затрагивающей ген *CNTN6* (Табл. 4).

Таблица 4 – Транскриптомные эффекты микродупликации 3p26.3 в нейронах, полученных от пробанда с интеллектуальными нарушениями и его условно здорового отца

№	Транскриптомный эффект CNV в нейронах	Общее число ДЭГ	Теоретическая модель (по Deshpande A., Weiss A., 2018)
1	пробанд ↑ и отец пробанда ↑	47 (3 %)	U-образная модель
2	пробанд ↓ и отец пробанда ↓	784 (53 %)	U-образная модель
3	пробанд ↓ и отец пробанда ↑	634 (43 %)	Аддитивная модель
4	пробанд ↑ и отец пробанда ↓	14 (1 %)	Аддитивная модель
5	пробанд ↑	323 (16 %)	Доминантная модель
6	пробанд ↓	1720 (84 %)	Доминантная модель
7	отец пробанда ↑	1154 (66 %)	Доминантная модель
8	отец пробанда ↓	595 (34 %)	Доминантная модель

Примечание: ↑ – повышение экспрессии генов; ↓ – снижение экспрессии генов. В скобках указан процент от числа общих (пункты 1–4) и уникальных ДЭГ (пункты 5–6 и 7–8).

Анализ обогащения генных онтологий для биологических процессов, проведенный для 1479 общих ДЭГ (Табл. 4, пункты 1–4), выявил единственную статистически значимо обогащенную категорию – удлинения клетки, ограниченные плазматической мембраной ($P_{FDR} = 0,036$), к которой относятся процессы сборки и диссоциации основных структурных элементов аксона. Обогащенными категориями генных онтологий для клеточных компартментов ($P_{FDR} < 0,05$) являлись: синапс, нейрон (сома, аксон и дендриты), цитоскелет, аппарат Гольджи, митохондрии, эндосомы и экзосомы, секреторные пузырьки, клеточные контакты, цитоплазматическая мембрана и мембрана органелл, а также хромосомы. Одной из

наиболее обогащенных оказалась категория «синапс» (коэффициент обогащения равен 2, количество перекрывающихся генов – 104). Данные ДЭГ характеризовались сниженной относительно нормы экспрессией (103 из 104 генов снизили свою экспрессию в нейронах пробанда, 83 из 104 генов – в нейронах его отца).

Среди описанных выше групп транскриптомных эффектов микроудупликации 3p26.3 были отдельно проанализированы две группы с наибольшим числом общих ДЭГ (Табл. 4, пункты 2 и 3). Статистически значимо обогащенными категориями генных онтологий для биологических процессов ($P_{FDR} < 0,05$), выявленных для 784 общих гипохеппрессирующихся генов, являлись: образование синапсов, клеточный сигналинг, нейрогенез, везикулярный транспорт, сборка органелл, регуляция транспорта и развитие клетки. ДЭГ, снижающие свою экспрессию в нейронах, дифференцированных из ИПСК пробанда, и повышающие свою экспрессию в клетках, полученных из ИПСК его отца, участвуют в метаболизме ДНК, процессинге РНК и клеточной реакции на стресс ($P_{FDR} < 0,05$).

Анализ обогащения категорий генных онтологий для биологических процессов, проведенный для уникальных ДЭГ в клетках пробанда с микроудупликацией *CNTN6* (Табл. 4, 5–6), выявил ряд статистически значимо обогащенных категорий ($P_{FDR} < 0,05$), в частности, посттрансляционная модификация белков, внутриклеточный транспорт, локализация белка, процессинг РНК, регуляция катаболических процессов, клеточный ответ на повреждение ДНК, регуляция высвобождения вирусных частиц из клетки-хозяина, организация митохондрий, хромосом и везикул.

Анализ обогащения категорий генных онтологий показал вовлеченность продуктов уникальных ДЭГ в нейронах, дифференцированных из ИПСК условно здорового отца пробанда (Табл. 4, 7–8), в процессы катаболизма цитидина, формирование анатомических структур и морфогенез органов, развитие кровеносной и скелетной систем, клеточную миграцию, регуляцию ERK и MAPK каскадов, а также пролиферацию эпителиальных клеток.

Для нейронов пациента с микроудупликацией *CNTN6* прослеживалась тенденция к снижению экспрессии подавляющего большинства выявленных ДЭГ. Так, среди всех генов, изменивших свою экспрессию в нейронах пробанда, 89 % снижали свою экспрессию (Табл. 2). В то время как процент гипохеппрессирующихся генов в клетках отца пробанда составил 43 % от общего числа ДЭГ. Среди общих генов, 96 % ДЭГ в нейронах пробанда характеризовались сниженной относительно нормы экспрессией, в то время как аналогичный показатель в клетках его отца составил 54 %. Примечательно, что тенденция к снижению экспрессии в клетках пробанда прослеживается и среди его уникальных ДЭГ. Уникальные ДЭГ в клетках отца пробанда характеризовались повышенной и сниженной относительно нормы экспрессией (66 % и 34 % от общего числа уникальных ДЭГ, соответственно). Напротив, подавляющее число уникальных ДЭГ в нейронах пробанда снижало свою экспрессию (84 % от общего числа уникальных ДЭГ пробанда).

Сравнительный анализ изменения экспрессии генов в нейронах с микроделецией 3p26.3, дифференцированных из ИПСК сибсов с интеллектуальными нарушениями

В процессе работы выявлены 8 категорий транскриптомных эффектов моногенной CNV в нейронах, дифференцированных из ИПСК сибсов с микроделецией *CNTN6* (пробанда и его сестры), соответствующих U-образной, аддитивной и доминантной моделям (Табл. 5).

Таблица 5 – Транскриптомные эффекты микроделеции 3p26.3 в нейронах, полученных от сибсов с интеллектуальными нарушениями

№	Транскриптомный эффект CNV в нейронах	Общее число ДЭГ	Теоретическая модель (по Deshpande A., Weiss A., 2018)
1	пробанд ↑ и сестра пробанда ↑	248 (36 %)	U-образная модель
2	пробанд ↓ и сестра пробанда ↓	404 (59 %)	U-образная модель
3	пробанд ↓ и сестра пробанда ↑	8 (1 %)	Аддитивная модель
4	пробанд ↑ и сестра пробанда ↓	24 (4 %)	Аддитивная модель
5	пробанд ↑	82 (18 %)	Доминантная модель
6	пробанд ↓	375 (82 %)	Доминантная модель
7	сестра пробанда ↑	1560 (62 %)	Доминантная модель
8	сестра пробанда ↓	974 (38 %)	Доминантная модель

Примечание: ↑ – повышение экспрессии генов; ↓ – снижение экспрессии генов. В скобках указан процент от числа общих (пункты 1–4) и уникальных ДЭГ (пункты 5–6 и 7–8).

Выявлено 684 общих ДЭГ, изменивших свою экспрессию в нейронах, полученных из ИПСК как пробанда, так и его сестры (Табл. 5, пункты 1–4). Анализ обогащения категорий генных онтологий для биологических процессов показал вовлеченность продуктов данных ДЭГ в негативную регуляцию пролиферации стволовых клеток, ответ на действие интерферона-альфа, негативную регуляцию репликации вирусного генома, сборку компонентов постсинаптической мембраны, регуляцию системных процессов, мембранного потенциала, транспорта, а также межклеточную передачу сигналов ($P_{FDR} < 0,05$). Продукты общих для нейронов пробанда и его сестры ДЭГ локализованы в синапсах, различных участках нейрона и цитоплазматической мембраны, клеточных контактах, вакуолях, перинуклеарном пространстве, аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, входят в состав внеклеточного матрикса и цитоскелета клетки ($P_{FDR} < 0,05$).

Сравнение списков ДЭГ показало, что большая часть общих генов в нейронах пробанда и его сестры снижала свою экспрессию (404 ДЭГ, 59 % от числа общих ДЭГ). Продукты общих гипоэкспрессирующихся ДЭГ участвуют в процессах деполяризации мембраны, организации синапсов и синаптической передаче сигнала, локализации белка на периферии клеток, регуляции системных процессов, поведении, ионном и везикулярном транспорте, развитии клеток и нейрогенезе. Таким образом, несмотря на преобладание гиперэкспрессирующихся генов среди общего числа ДЭГ в нейронах сестры пробанда с микроделецией 3p26.3, также выявлены гены со сниженной экспрессией, продукты которых участвуют в синаптической передаче сигнала и нейрогенезе (аналогично гипоэкспрессирующимся

генам в нейронах, дифференцированных из ИПСК пробанда с аналогичной хромосомной мутацией).

Среди уникальных ДЭГ пробанда также преобладали гены со сниженной относительно нормы экспрессией (375 ДЭГ, 82 % от числа уникальных ДЭГ). Анализ обогащения не показал статистически значимо обогащенных категорий генных онтологий для биологических процессов и молекулярных функций. Большая часть уникальных ДЭГ, выявленных в нейронах, дифференцированных из ИПСК сестры пробанда с микроделецией 3p26.3, характеризовалась повышенной относительно нормы экспрессией (1560 ДЭГ, 62 %). Продукты уникальных ДЭГ участвуют в морфогенезе закладки эндокарда, дифференцировке мезенхимальных клеток, фазовом переходе клеточного цикла и метаболизме ДНК ($P_{FDR} < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые с помощью технологий репрограммирования были получены нейроны, несущие реципрокные моногенные CNV, затрагивающие единственный ген *CNTN6*, мутации в котором имеют непосредственное влияние на процессы развития и функционирования ЦНС. Для изучения молекулярных эффектов хромосомных aberrаций в регионе 3p26.3 были получены линии ИПСК с варьирующим числом копий *CNTN6* и соответствующего хромосомного региона в ряду от нуллисомии (нокаута гена) к моносомии, дисомии (норма) и трисомии.

Результаты исследования свидетельствуют о глобальном характере нарушений транскрипционных процессов в клетках с хромосомной мутацией. Для значительного числа генов в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с дупликацией *CNTN6* (3522 ДЭГ) и гетерозиготной делецией (1141 ДЭГ), а также клеток с генотипом *CNTN6*^{del/mut} (217 ДЭГ), было показано изменение уровня их экспрессии относительно клеток без хромосомного дисбаланса. С одной стороны, это может являться результатом влияния реципрокных хромосомных мутаций на транскриптом клетки через ряд известных (*CHL1* [Ye H. et al., 2008], *NOTCH1* [Cui X.-Y. et al., 2004], *PTPRG*, *PTPRZ* [Bouyain S., Watkins D.J., 2010], *PTPRA* [Ye H. et al., 2011], *LPHN1* [Zuko A. et al., 2016]) или еще неизвестных молекулярных партнеров *CNTN6*. В ходе исследования установлено снижение экспрессии *CHL1* в клетках с дупликацией, *NOTCH1* – с делецией 3p26.3, и *CNTN6* во всех анализируемых линиях. С другой стороны, изменения транскриптома могут быть следствием возможного нарушения клеточных контактов между нейронами, что, в свою очередь, может приводить к нарушению протекающих в них в норме молекулярных процессов, что будет выражаться в изменении экспрессии генов на уровне целого нейрона. Наблюдаемые изменения транскриптома клетки могут являться результатом нарушения топографии хромосомных территорий в пространстве клеточного ядра, внутри- и межхромосомных взаимодействий, вызванных избытком или недостатком генетического материала. Стоит отметить, что озвученные варианты не противоречат друг другу и могут вносить свой вклад в изменения транскриптома клетки с реципрокными моногенными CNV.

При сравнении ДЭГ в нейронах, полученных из ИПСК пациентов с реципрокными микроделециями и микродупликациями *CNTN6*, нами были выделены 8 категорий транскриптомных эффектов хромосомных перестроек, соответствующих U-образной, аддитивной и доминантным моделям фенотипических проявлений реципрокных CNV, из которых одной из наиболее представленных оказалась группа, включающая 402 ДЭГ (83 % от числа общих ДЭГ), характеризующихся снижением экспрессии как в клетках с микроделцией, так и микродупликацией *CNTN6* (U-образная модель). Продукты данных гипохеэкспрессирующихся генов принимают участие в процессах, связанных с развитием ЦНС, в частности, нейрогенезе и регуляции синаптической передачи. Гены *NLGN3*, *PRKCZ* и *CHRNA7* относились к нескольким выявленным статистически значимо обогащенным категориям биологических процессов. Примечательно, что данные гены могут быть вовлечены в патогенез интеллектуальных и когнитивных нарушений, расстройств аутистического спектра, шизофрении, биполярного и депрессивного расстройств.

Таким образом, наличие 402 ДЭГ со сниженной относительно нормы экспрессией при делеции и при дупликации 3p26.3 можно рассматривать как следствие одинакового характера изменения экспрессии гена *CNTN6* в нейронах с полярными изменениями его копийности. Факт снижения экспрессии гена *CNTN6* вне зависимости от типа хромосомной перестройки, и выявление группы генов, одинаково изменяющих свою экспрессию в нейронах с делецией и дупликацией *CNTN6*, могут объяснить наличие общих клинических черт у пациентов с реципрокными перестройками в регионе 3p26.3, в частности, интеллектуальных нарушений и неврологической симптоматики.

Результаты анализа обогащения категорий генов онтологий для клеточных компартментов, проведенного для 485 общих ДЭГ в нейронах с микроделцией и микродупликацией *CNTN6*, показали, что одной из наиболее статистически значимо обогащенных оказалась категория «синапс» (коэффициент обогащения составлял 3,8; подавляющее большинство генов данной категории характеризовались сниженной относительно нормы экспрессией). Мы предполагаем, что нарушение экспрессии *CNTN6* может влиять на формирование синаптических контактов и приводить к синаптической дисфункции. Этот вариант синаптопатии, в свою очередь, может проявляться нарушением развития нейронов и приводить к развитию интеллектуальных и психических расстройств у пациентов, являющихся носителями как микроделций, так и микродупликаций гена *CNTN6*.

Стоит отметить, что CNV в локусе 3p26.3 описаны как у пациентов с нарушением нервно-психического развития, так и у здоровых индивидов, при этом у последних статистически значимо чаще регистрируется носительство микродупликаций, что может указывать на неполную пенетрантность мутации ($p < 0,05$). С целью изучения возможных молекулярных проявлений неполной пенетрантности микродупликации *CNTN6* проведен транскриптомный анализ нейронов, дифференцированных из ИПСК с микродупликацией 3p26.3, полученных от пробанда и его отца без фенотипических проявлений мутации. Примечательно, что

общее число ДЭГ в нейронах пробанда и его отца было примерно одинаковым (3228 против 3522). Однако большая часть ДЭГ в нейронах пробанда характеризовалась сниженной экспрессией (гипоэкспрессирующиеся гены составляли 89 % от общего числа ДЭГ), в то время как процентное соотношение генов с повышенной и сниженной экспрессией в нейронах отца пробанда составило 57 % и 43 %, соответственно. Можно предположить, что установленные в настоящем исследовании практически двукратные отличия по числу гипоэкспрессирующихся генов в клетках пробанда и его отца – носителя аналогичной микродупликации, отражают молекулярные процессы, лежащие в основе формирования неполной пенетрантности CNV в регионе 3p26.3.

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

ВЫВОДЫ

1. В группе пациентов с нарушением нервно-психического развития частота хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, составляет 1 : 711.
2. Среди клинически здоровых носителей вариаций в числе копий гена *CNTN6*, по сравнению с пациентами с нарушениями нервно-психического развития, отмечается статистически значимое преобладание хромосомных микродупликаций 3p26.3.
3. Созданы клеточные модели заболеваний, сопровождающихся нарушениями нервно-психического развития, на основе нейронов, дифференцированных из ИПСК пациентов с различным числом копий гена *CNTN6*.
4. В модельной системе нейронов, дифференцированных из ИПСК с различным числом копий *CNTN6*, для клеток с дупликацией показано изменение экспрессии 3522 генов (384 гипер- и 3138 гипоэкспрессирующихся генов), для клеток с делецией – 1141 гена (338 гипер- и 803 гипоэкспрессирующихся гена), для клеток с нокаутом гена *CNTN6* – 217 генов (49 гипер- и 168 гипоэкспрессирующихся генов), по сравнению с клетками без хромосомной мутации.
5. В нейронах, дифференцированных из ИПСК, в зависимости от числа копий *CNTN6* выявлено 8 категорий транскриптомных эффектов, соответствующих U-образной, аддитивной и доминантной теоретическим моделям фенотипических проявлений реципрокных моногенных CNV. Показано, что среди общих дифференциально экспрессирующихся генов, выявленных в нейронах с микроделецией и микродупликацией *CNTN6*, 83 % генов снижают свою экспрессию.

6. Гены со сниженной относительно нормы экспрессией в нейронах, дифференцированных из ИПСК с микроделецией, микродупликацией и нокаутом гена *CNTN6*, кодируют продукты, вовлеченные в нейрогенез и синаптическую передачу ($P_{FDR} < 0,05$).

7. В нейронах, полученных из ИПСК пациента с интеллектуальными нарушениями и микродупликацией *CNTN6*, выявлено снижение транскрипции подавляющего числа дифференциально экспрессирующихся генов (89 %), по сравнению с клетками без хромосомной мутации, тогда как в нейронах, полученных из ИПСК его отца – носителя микродупликации без фенотипических проявлений, снижение экспрессии затронуло 43 % генов ($p < 0,001$).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Лопаткина М.Е., Иванова С.А., Лебедев И.Н. Оценка распространенности и родительского происхождения хромосомных микроделений и микродупликаций, затрагивающих ген *CNTN6*, в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов // *Генетика*. 2021. 57:8. С. 964-969.
2. Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Лебедев И.Н. Оценка ассоциации вариаций числа копий гена *CNTN6* с идиопатическими интеллектуальными расстройствами // *Генетика*. 2016. 52:9. С. 1109-1112.
3. Лопаткина М.Е., Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Шорина А.Р., Масленников А.Б., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Поиск молекулярных путей и белковых партнеров *CNTN6* в регуляции краниогенеза // *Медицинская генетика*. 2016. 15:5(167). С. 10-14.
4. Лопаткина М.Е., Лебедев И.Н. Транскриптомный анализ как инструмент изучения патогенеза хромосомных болезней // *Генетика*. 2020. 56:5. С. 534-549.
5. Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Гридина М.М., Скрыбин Н.А., Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Транскриптомное профилирование нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с реципрокными моногенными CNV в субсегменте 3p26.3 // *Медицинская генетика*. 2020. 19:3(212). С. 10-11.
6. Gridina M.M., Nikitina T.V., Pristyazhnyuk I.E., Kashevarova A.A., Lopatkina M.E., Vasilyev S.A., Nazarenko L.P., Lebedev I.N., Serov O.L. Generation of the induced pluripotent stem cell line, ICAGi002-A, from unaffected carrier megabase scaled duplication involving the *CNTN6* gene // *Stem Cell Res.* 2019. 40:101556.
7. Shnaider T.A., Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G., Matveeva N.M., Nikitina T.V., Khabarova A.A., Skryabin N.A., Kashevarova A.A., Lopatkina M.E., Nazarenko L.P., Lebedev I.N., Serov O.L. Generation of four iPSC lines from two siblings with a microdeletion at the *CNTN6* gene and intellectual disability // *Stem Cell Res.* 2019. 41:101591.

Статьи в сборниках и материалах конференций:

8. Кашеварова А.А., Скрыбин Н.А., Лопаткина М.Е., Назаренко Л.П., Лебедев И.Н. Алгоритм молекулярно-цитогенетической диагностики микроструктурных хромосомных aberrаций в сегменте 3p26.3 у детей с недифференцированной умственной отсталостью // *Медицинские рекомендации по медицинским технологиям диагностики и лечения хромосомных, орфанных и многофакторных*

заболеваний человека / под ред. проф. В.А. Степанова. Новосибирск: Академиздат. 2016. С. 75-90.

9. Лопаткина М.Е. Оценка влияния изменения числа копий гена *CNTN6* на интеллектуальное развитие ребенка // Всероссийская Итоговая 74-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова (Томск, 27-29 апреля 2015 г.): сборник материалов / под ред. Г.Э. Черногорюка. Томск: Сибирский государственный медицинский университет. 2015. С. 318-319.

10. Лопаткина М.Е., Иванова С.А., Лебедев И.Н. Оценка распространенности микроделений и микродупликаций гена *CNTN6* в выборке пациентов с нарушением нервно-психического развития и у здоровых индивидов // Актуальные проблемы нейробиологии психических и аддиктивных расстройств: сборник тезисов Российской конференции с международным участием / под ред. Н.А. Бохана, С.А. Ивановой, Т.П. Ветлугиной. Томск : «Интегральный переплет». 2020. С. 93-97.

11. Лопаткина М.Е., Лебедев И.Н. Роль *CNTN6* в патогенезе нарушений нервно-психического развития // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. Вып. 29. Новосибирск: Академиздат. 2019. С. 93-110.

12. Лопаткина М.Е., Фишман В.С. Дифференциальная активность генов в нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных клеток пациентов с интеллектуальными нарушениями и реципрокными микроструктурными хромосомными микроделениями и микродупликациями // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых, 24-25 мая 2018 г. / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова; ТНИМЦ РАН. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2018. С. 109-111.

13. Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Гридина М.М., Скрыбин Н.А., Кашеварова А.А. Транскрипционные эффекты реципрокных моногенных CNV в субсегменте 3p26.3 в модельной системе нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с нарушением нервно-психического развития // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых / под ред. В.А. Степанова, Е.Л. Чойнзонова, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.В. Жданова; ТНИМЦ РАН. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2020. С. 41-44.

14. Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Гридина М.М., Скрыбин Н.А., Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Дифференциальная активность генов в нейронах с реципрокными хромосомными микроделениями и микродупликациями // Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики: сборник научных трудов / под ред. В.А. Степанова. Вып. 12. Томск: Литературное бюро. 2019. С. 37-38.

15. Лопаткина М.Е., Фишман В.С., Гридина М.М., Скрыбин Н.А., Никитина Т.В., Кашеварова А.А., Назаренко Л.П., Серов О.Л., Лебедев И.Н. Дифференциальная экспрессия генов в нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с задержкой интеллектуального развития и реципрокными микроделениями и микродупликациями в субсегменте 3p26.3 // Хромосома 2018: Материалы Междунар. конф. Новосибирск, Россия, 20-24 авг. 2018 г. / Ин-т молекулярной и клеточной биологии СО РАН ; Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск. 2018. С. 135-137.

16. Gridina M., Matveeva N., Mensorov A., Nikitina T., Kashevarova A., Skryabin N., Nazarenko L., Lopatkina M., Lebedev I., Serov O. *CNTN6* expression in human iPSC

derived neurons from patient with neurodevelopmental disorders and 3p26.3 microduplication and the same microduplication healthy carrier // *Molecular Cytogenetics*. 2019. 12(Suppl 1):6.P5.

17. Lopatkina M.E., Fishman V.S., Gridina M.M., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Serov O.L., Lebedev I.N. Patterns of gene expression in neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with reciprocal 3p26.3 microdeletion and microduplication // 23rd International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics / Comparative Cytogenetics. 2018. 12:3. P. 320-321.

18. Lopatkina M.E., Fishman V.S., Gridina M.M., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Serov O.L., Lebedev I.N. The search of biological processes affected by *CNTN6* microdeletion in neurons, derived from induced pluripotent stem cells of a patient with intellectual disability and 3p26.3 microdeletion / *European Journal Of Human Genetics*. 2019. 27:P08.13A. P. 216-216.

19. Lopatkina M.E., Gridina M.M., Fishman V.S., Valeev E.S., Skryabin N.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Serov O.L., Lebedev I.N. Patterns of gene expression in iPS cell-derived neurons, obtained from affected and unaffected carrier of *CNTN6* microduplication at 3p26.3 // *ECA News Letter*. 2021. 48. P. 36.

База данных

20. Свидетельство о регистрации базы данных № 2020621448 «Клинические и молекулярно-генетические характеристики больных шизофренией» / Падерина Д.З., Лопаткина М.Е., Иванова С.А., Лебедев И.Н. Правообладатель: ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». Заявка № 2020621308, дата поступления 31.07.2020, дата регистрации 17.08.2020 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

aCGH – (от англ. Array Comparative Genomic Hybridization) – матричная сравнительная геномная гибридизация

CNV – (от англ. Copy Number Variations) – вариации числа копий участков ДНК

qPCR – (от англ. quantitative Polymerase chain reaction) – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

канд. биол. наук Хитринской И.Ю.

e-mail: khitrinskaya@tnimc.ru