

## **Изучение влияния делеции HAR, расположенных в гене *CNTN6*, на ранние этапы нейрогенеза человека с помощью церебральных органоидов**

Чвилёва А.<sup>1\*</sup>, Юнусова А.<sup>2</sup>, Пристяжнюк И.<sup>2</sup>, Рыжкова А.<sup>2</sup>, Смирнов А.<sup>2</sup>, Белокопытова П.<sup>1, 2</sup>, Шнайдер Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

\* a.chvileva@g.nsu.ru

**Ключевые слова:** эмбриональное развитие; нейрогенез; церебральные органоиды; регуляторные последовательности; умственная отсталость; HAR; ИПСК; *CNTN6*

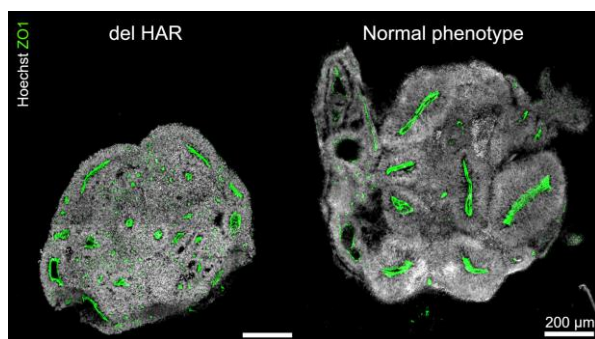
*Мотивация и цель:* Нарушение умственного развития считается одним из распространенных расстройств психики. Умственная отсталость встречается у 3 % родившихся детей и имеет высокий уровень сопутствующих нейропсихиатрических патологий. Причины подобных нарушений часто скрываются в наследственных факторах. Показано, что до 25 % этих проблем связаны с copy number variations (CNVs) различных генов. Однако на данный момент нет четкого описания генетической этиологии нарушения когнитивных функций.

Объектом нашего исследования является ген-кандидат для нарушений умственного развития – *CNTN6*. В настоящее время описано несколько десятков пациентов с умственной отсталостью, у которых были обнаружены CNVs данного гена [1–3]. Интересно, что большинство обнаруженных мутаций представлены делециями и дупликациями крупных размеров, однако точечная замена была обнаружена лишь в одном клиническом случае [4]. В связи с этим нами было выдвинуто предположение о наличии функциональных участков в локусе *CNTN6*, изменение в работе которых может привести к нарушениям ранних этапов развития мозга человека.

Аннотированных регуляторных элементов в данном локусе не было обнаружено, однако были выявлены два региона, быстро эволюционировавших у человека – human accelerated region (HAR) [5]. Эти участки ДНК часто являются энхансерами генов, вовлеченных в развитие мозга человека. Также на данный момент известны мутации в HAR, изменяющие экспрессию генов-кандидатов для различных психических расстройств [6]. Цель данной работы – исследование эффекта делеции HAR, расположенных в локусе *CNTN6*, на ранние этапы нейрогенеза человека с помощью церебральных органоидов (ЦО) [7].

*Результаты:* Для выполнения данной цели с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены линии ИПСК с гомозиготными делециями районов, содержащих HAR. Для полученных линий была подтверждена их способность поддерживать плюрипотентное состояние *in vitro* по экспрессии факторов плюрипотентности и наличию потенциала к дифференцировке в три зародышевых листка. Также линии ИПСК были проверены на отсутствие хромосомных aberrаций.

Полученные линии были дифференцированы в ЦО. При дифференцировке была выявлена тенденция к уменьшению размеров органоидов с делецией HAR по сравнению с контролем. Исследование внутренней организации ЦО позволило выявить, что на 20-й день дифференцировки в органоидах с делецией HAR достоверно уменьшается толщина и площадь желудочкоподобных структур. Иммуногистохимический анализ на маркер плотных межклеточных контактов ZO1 показал значительные уменьшения апикальной мембраны желудочкоподобных структур органоидов с делецией, что может говорить о нарушении процесса самоорганизации клеток радиальной глии. Этот тип клеток играет важнейшую роль в процессе развития данных структур. Одним из основных маркеров для клеток радиальной глии считается белок PAX6. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что наличие делеции гена CNTN6 приводит нарушению клеточной локализации белка и уменьшению его количества в ЦО. Однако в органоидах с делецией HAR подобный фенотип не наблюдался (рис. 1). Иммуногистохимический анализ показал нарушение распределения PAX6 сигнала, однако достоверных изменений доли площади PAX6-позитивного сигнала на срезе ЦО не было обнаружено.



**Рис. 1.** Иммуноокрашивание контрольных церебральных органоидов (Normal phenotype) и органоидов с делецией (del HAR) с использованием антител против ZO1. Масштабная линейка – 200 мкм

**Выводы:** Таким образом, делеция HAR в гене *CNTN6* приводит к уменьшению размеров органоидов и нарушениям формирования желудочкоподобных структур, что указывает на участие данной последовательности в регуляции раннего этапа нейrogenеза человека *in vitro*. Однако данная регуляция никак не связана с PAX6-опосредованным контролем дифференцировки клеток радиальной глии.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 24-24-00447).

**Благодарности:** Культивирование линий ИПСК проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепромышленного и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН. Микроскопический анализ проведен на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

# Investigating the effect of HAR deletion located in the *CNTN6* gene on early stages of human neurogenesis on the cerebral organoids model

Chvileva A.<sup>1\*</sup>, Yunusova A.<sup>2</sup>, Pristyazhnyuk I.<sup>2</sup>, Ryzhkova A.<sup>2</sup>, Smirnov A.<sup>2</sup>, Belokopytova P.<sup>1,2</sup>, Shnaider T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

\* a.chvileva@g.nsu.ru

**Key words:** embryonic development; neurogenesis; cerebral organoids; regulatory sequences; mental retardation; HAR; iPSCs; *CNTN6*

**Motivation and Aim:** Mental retardation is one of the most common mental disorders. Intellectual disability occurs in 3 % of born children and has a high rate of associated neuropsychiatric pathologies. The causes of such disorders often lie in hereditary factors. It has been shown that up to 25 % of these problems are associated with copy number variations (CNVs) of various genes. However, there is currently no clear description of the genetic etiology of cognitive impairment.

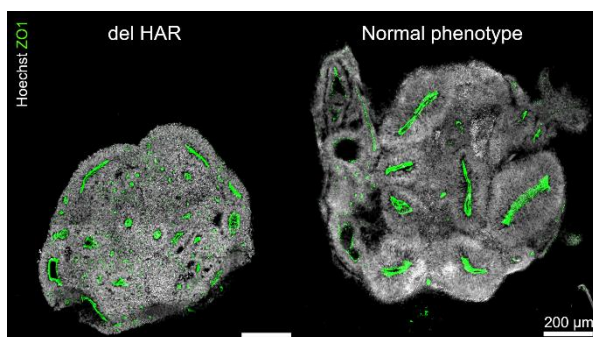
The object of our study is a candidate gene for mental retardation disorders – *CNTN6*. Currently, several dozens of patients with mental retardation in which CNVs of this gene have been detected have been described [1–3]. Interestingly, large deletions and duplications represent most of the associated mutations, but a point substitution was found in only one clinical case [4]. Therefore, we hypothesized the presence of functional regions in the *CNTN6* locus, the alteration of which may lead to abnormalities in the early stages of human brain development.

Annotated regulatory elements were not found at this locus, but two regions that evolved rapidly in humans – human accelerated region (HAR) – were identified [5]. These DNA regions may function as enhancers of genes involved in human brain development. Mutations in HAR are also known to alter the expression of candidate genes for various psychiatric disorders [6]. This work aims to study the effect of HAR deletion located in the *CNTN6* locus on the early stages of human neurogenesis on the cerebral organoid model (CO) [7].

**Results:** To realize this goal, hiPSC lines with homozygous deletions of HAR were obtained using the CRISPR/Cas9 system. Their ability to maintain the pluripotent state *in vitro* was confirmed by the expression of pluripotency factors and the potential for differentiation into three germ sheets. iPSC lines were also tested for the absence of chromosomal aberrations.

The obtained lines were differentiated into COs. The differentiation revealed a tendency to decrease the size of organoids with HAR deletion compared to the control. Analysis of the internal organization of the COs revealed that on day 20 of differentiation, the thickness and area of ventricle-like structures were significantly reduced in mutant organoids. Immunohistochemical analysis for the tight junction-associated proteins showed significant reductions in the apical membrane of ventricle-like structures of organoids with HAR deletion (Fig. 1), which may indicate impaired self-organization of radial glial cells.

This cell type plays a crucial role in the process of these structures' development. One of the key markers for radial glial cells is considered to be PAX6 protein. In our previous study it was found that the presence of CNTN6 gene deletion leads to the disruption of cellular localization of the protein and a decrease in its quantity in the COs. However, no such phenotype was observed in organoids with HAR deletion. Immunohistochemical analysis showed the distribution disorder of PAX6 signal; though, no significant changes in the area fraction of PAX6-positive signal were detected on the slice of COs.



**Fig. 1.** Immunostaining of control cerebral organoids (Normal phenotype) and organoids with deletion (del HAR) using antibodies against ZO1. The scale bar – 200 μm

**Conclusion:** Thus, HAR deletion in the *CNTN6* gene leads to decreased organoid size and impaired ventricle-like structure formation, indicating that this region is involved in the regulation of the early stage of human neurogenesis *in vitro*. However, this regulation is unrelated to PAX6-mediated control of radial glial cell differentiation.

**Funding:** This study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-24-00447).

**Acknowledgement:** iPSCs derivation and differentiation was performed at the Collective Center of ICG SB RAS “Collection of Pluripotent Human and Mammalian Cell Cultures for Biological and Biomedical Research”. Microscopy assays were performed at the Center of Collective Use for Microscopic Analysis of Biological Objects (ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia).

### Список литературы/References

1. Kashevarova A.A. et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: *CNTN6* as a new candidate gene for intellectual disability. *Mol Cytogenet.* 2014;7:97
2. Hu J. et al. *CNTN6* copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *J Neurodev Disord.* 2015;7:26
3. Tassano E. et al. Clinical and molecular characterization of two patients with *CNTN6* copy number variations. *Cytogenet Genome Res.* 2018;156(3):144-149
4. García-Ortiz J.E. et al. Case Report: Whole exome sequencing unveils an inherited truncating variant in *CNTN6* (p. Ser189Ter) in a mexican child with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord.* 2020;50:2247-2251
5. Pollard K.S. et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature.* 2006;443(7108):167-172
6. Doan R.N. et al. Mutations in human accelerated regions disrupt cognition and social behavior. *Cell.* 2016;167(2):341-354
7. Lancaster M.A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501(7467):373-379