

Изучение влияния дупликации гена *STAG2* в раннем нейральном развитии

Гридина М.^{1, 2*}, Хабарова А.¹, Степанчук Я.^{1, 2}, Нурисламов А.^{1, 2}, Кокшарова Г.¹, Крепиши А.³, Коста С.³, Фишман В.^{1, 2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Университет Сан-Паулу, Сан-Паулу, Бразилия

* gridinam@gmail.com

Ключевые слова: когезин; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; нейральная дифференцировка; когезинопатии

Мотивация и цель: Когезин – эволюционно консервативный мультимерный белковый комплекс, состоящий из нескольких субъединиц: SMC1A, SMC3, RAD21 и STAG1 или STAG2. Когезин – важный белок митотического цикла, обеспечивающий когезию сестринских хроматид, участник процессов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации [1]; участвует во взаимодействиях между цис-регуляторными элементами генома [2]. Мутации белков когезинового комплекса связаны с возникновением заболеваний, которые получили названия когезинопатии. Наиболее охарактеризованной из них является синдром Корнелии де Ланге, вызываемый мутациями в генах *NIPBL*, *SMC1A* или *SMC3* [3, 4]. Микродупликации Xq25, включающие всю последовательность гена *STAG2*, также вызывают когезинопатии, основными фенотипическими проявлениями которых являются: гипотония, задержка развития речи, умственная отсталость от легкой до умеренной степени и аномальное поведение [5, 6]. Однако механизм развития патологии в результате дупликации *STAG2* неизвестен. Ранее были обнаружены два пациента с амплификацией района Xq25 размером 377 kb (chrX:123056490-123433630, GRCh37), которая затрагивает единственный ген – *STAG2*. Пациенты – сводные братья, у обоих наблюдается задержка развития и аутистические черты. Целью исследования является определение роли нарушений копияности гена *STAG2* на ранних этапах развития клеток мозга. Мы ожидаем, что эти эксперименты прольют свет на молекулярные механизмы развития патологии, лежащие в основе эффекта амплификации Xq25.

Методы и алгоритмы: Для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека из мононуклеарных клеток периферической крови мы использовали котрансфекцию эписомальных векторов, несущих следующие гены: *OCT4*, *MYC*, *LIN28*, shRNA p53, *SOX2*, *KLF4*, *EBNA1*, – согласно протоколу [7]. Дифференцировку в нейральные клетки предшественники проводили через образование эмбрионидных телец и последующую селекцию нейральных розеток [8]. РНК была выделена с использованием набора Hi pure Total RNA Plus kit (Magen), согласно инструкции производителя. Секвенирование polyA-селектированной РНК проводили на платформе DNBSEQ парными прочтениями по 100 п.н. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов проводили при помощи DESeq2.

Результаты: У обоих пациентов наблюдается задержка развития и аутистические черты, поэтому можно предположить, что дупликация гена *STAG2* приводит к нарушению раннего развития головного мозга. Поэтому в качестве целевой популяции клеток для оценки эффектов микродупликации мы решили использовать клетки нейральных предшественников. На первом этапе из мононуклеарных клеток периферической крови мы получили линии ИПСК для обоих пациентов и здоровых доноров. Для каждого генотипа были выбраны по три линии ИПСК. Увеличение копияности генов не всегда приводит к увеличению уровня их экспрессии [8]. Мы показали, что уровень экспрессии *STAG2* был выше во всех проанализированных линиях ИПСК пациентов, по сравнению с клетками здоровых доноров. Далее мы дифференцировали выбранные ИПСК, получили клетки нейральных предшественников и провели анализ транскриптома. РСА по всем генам показал, что реплики хорошо сходятся между собой. Также мы обнаружили ряд особенностей транскрипции в клетках нейральных предшественников пациентов.

Выводы: Микродупликация гена *STAG2* приводит к увеличению его экспрессии в ИПСК, по сравнению с клетками с нормальным кариотипом. В нейральных клетках-предшественниках с дупликацией гена *STAG2* обнаружен ряд особенностей транскрипции по сравнению с клетками с нормальным кариотипом.

Финансирование: Исследование поддержано Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, номер Соглашения № 075-15-2024-539 от 24.04.2024.

Influence of *STAG2* gene duplication in early neural development

Gridina M.^{1, 2*}, Khabarova A.¹, Stepanchuk Ya.^{1, 2}, Nurislamov A.^{1, 2}, Koksharova G.¹, Krepishi A.³, Costa S.³, Fishman V.^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil

* gridinam@gmail.com

Key words: cohesin; induced pluripotent stem cells; neuronal differentiation; cohesinopathies

Motivation and Aim: Cohesin is an evolutionarily conserved protein complex consisting of several subunits: SMC1A, SMC3, RAD21 and STAG1 or STAG2. Cohesin is an important protein of the mitotic cycle, involving in the cohesion of sister chromatids, in a the repair of double-stranded DNA breaks through the mechanism of homologous recombination [1] and in interactions between cis-regulatory elements of the genome [2]. Mutations in the cohesin complex proteins are associated with the called cohesinopathies. The best characterized of these is Cornelia de Lange syndrome, caused by mutations in the *NIPBL*, *SMC1A* or *SMC3* genes [3, 4]. Microduplications of Xq25, including the entire *STAG2* gene sequence, also cause cohesinopathies, the main phenotypic manifestations of which are: hypotonia, delayed speech development, mild to moderate mental retardation and abnormal behavior [5, 6]. However, the mechanism of the pathology development is unknown. Previously, two patients were identified with amplification of the Xq25 region of 377 kb (chrX:123056490-123433630, GRCh37),

which affects a single gene, *STAG2*. The patients are half-brothers and both have developmental delays and autistic traits. The purpose of the study is to determine the role of *STAG2* gene copy number variations in the early stages of brain cell development. We expect that these experiments will shed light on the molecular mechanisms of diseases resulting from Xq25 amplification.

Methods and Algorithms: Reprogramming of human blood cells into induced pluripotent stem (iPS) cells was performed by episomal vectors cocktail contained: reprogramming vectors expressed OCT4, MYC, LIN28, shRNA against p53, SOX2, KLF4 and EBNA1, according to the previously described protocol [7]. iPS cells were cultured and differentiated into neural progenitor cells as described before [8]. RNA was isolated using the Hi pure Total RNA Plus kit (Magen) according to the manufacturer's instructions. Sequencing of polyA-selected RNA was performed on the DNBSEQ platform using paired 100 bp reads. The statistical analysis and identification of differentially expressed genes was performed using DEseq2.

Results: Both patients have developmental delay and autistic features, suggesting that *STAG2* gene duplication leads to impairment of early brain development. Therefore, we decided to use neural progenitor cells as the target cell population to evaluate the effects of microduplication. We obtained iPS cell lines from peripheral blood mononuclear cells for both patients and healthy donors. Three iPS cell lines were selected for each genotype. An increase in the copy number of genes does not always lead to an increasing in their expression level [8]. We showed that the *STAG2* expression was higher in all patient iPS cell lines compared to cells from healthy donors. Next, we differentiated the selected iPS cells into neural progenitor cells, and performed transcriptome analysis. The replicas converged well with each other according to PCA for all genes. We also discovered a number of transcriptional features in the patients' neural progenitor cells.

Conclusion: Xq25 microduplication leads to an increasing of the *STAG2* gene expression in iPS cells compared to cells with a normal karyotype. A number of transcriptional features were found in neural progenitor cells with *STAG2* gene duplication compared to cells with a normal karyotype.

Funding: The study was supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation, Agreement number No. 075-15-2024-539 dated April 24, 2024.

Список литературы/References

1. Meisenberg C., Pinder S.I., Hopkins S.R., Wooller S.K., Benstead-Hume G. et al. Repression of transcription at DNA breaks requires cohesin throughout interphase and prevents genome instability. *Mol Cell*. 2019;73(2):212-223.e7. doi 10.1016/j.molcel.2018.11.001
2. Merkschlager M., Odom D.T. CTCF and cohesin: linking gene regulatory elements with their targets. *Cell*. 2013;152(6):1285-1297. doi 10.1016/j.cell.2013.02.029
3. Krantz I.D., McCallum J., DeScipio C., Kaur M., Gillis L.A. et al. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet* 2004;36(6):631-635. doi 10.1038/ng1364
4. Revenkova E., Focarelli M.L., Susani L., Paulis M., Bassi M.T. et al. Cornelia de Lange syndrome mutations in SMC1A or SMC3 affect binding to DNA. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):418-427. doi 10.1093/hmg/ddn369
5. Kumar R., Corbett M.A., Van Bon B.W.M., Gardner A., Woenig J.A., Jolly L.A. et al. Increased *STAG2* dosage defines a novel cohesinopathy with intellectual disability and behavioral problems. *Hum Mol Genet*. 2015;24(25):7171-7181. doi 10.1093/hmg/ddv414
6. Leroy C., Jacquemont M.-L., Doray B., Lamblin D., Cormier-Daire V., Philippe A. et al. Xq25 duplication: the crucial role of the *STAG2* gene in this novel human cohesinopathy. *Clin Genet*. 2016;89(1):68-73. doi 10.1111/cge.12567

7. Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A. et al. Biochemical characteristics of iPSC-N370S GBA variant carriers with and without parkinson's disease. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4437. doi 10.3390/ijms24054437
8. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S., Menzorov A.G., Kizilova H.A., Beregovoy N.A. et al. Allele-specific biased expression of the CNTN6 gene in iPS cell-derived neurons from a patient with intellectual disability and 3p26.3 microduplication involving the CNTN6 gene. *Mol Neurobiol.* 2018;55(8):6533-6546. doi 10.1007/s12035-017-0851-5