

Изменение 3D организации хроматина в локусе приводит к нарушению экспрессии гена SIX3 в раннем нейральном развитии

Хабарова А.^{1*}, Гридина М.^{1,2}, Степанчук Я.^{1,2}, Нурисламов А.^{1,2}, Кораблева С.^{1,2}, Крепиши А.³, Коста С.³, Бертола Д.³, Оливейра Д.³, Карвало Л.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

* khabarova@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: 3D геном; хромосомные перестройки; задержка развития; SIX3

Мотивация и цель: Нашим коллегами для консультации и медико-генетического исследования был направлен пациент (девочка 16 лет) с лицевыми диморфизмами, задержкой развития, аутистическими чертами и тугоухостью. Схожие клинические проявления обнаружены у ее брата и отца. В результате генетического исследования была обнаружена делеция 95 КБ 2p21 (chr2:45187369-45282639, GRCh37), затрагивающая только ген SIX2. Известно, что члены семейства транскрипционных факторов SIX участвуют в эмбриональном морфогенезе черепа и почечной системы. Ген SIX2 широко экспрессируется у плода в конце первого триместра, в том числе в конечностях, среднем ухе и почках, но его экспрессия происходит в ограниченном диапазоне тканей у взрослых. Известно, что мутации SIX2 у человека приводят к синдрому лобно-носовой дисплазии [1] и порокам развития косточек верхнего века и среднего уха, что приводит к потере слуха [2], наблюдаемой у пациента. На данный момент не показано участие SIX2 в развитии головного мозга, что могло бы объяснить описанную задержку ментального развития. Однако подобные нарушения описаны для другого гена – SIX3, расположенного в том же локусе, что и SIX2, на расстоянии 14 т.п.о. от границ делеции. SIX3 – фактор транскрипции, который участвует в развитии глаз, носа, женской репродуктивной системы и переднего мозга. Различные нарушения гена SIX3 приводят к тяжелому пороку развития головного мозга – голопрозэнцефалии [3]. Локус SIX2/SIX3 с точки зрения трехмерной организации хроматина состоит из двух доменов, причем гены SIX2 и SIX3 лежат в разных доменах. Обнаруженная у пациента делеция затрагивает не только ген SIX2, но и границу, разделяющую эти домены. Мы предполагаем, что делеция, обнаруженная у пациентов, может приводить к изменению пространственной организации окружающего участка ДНК, что в свою очередь может вызвать нарушение регуляции гена SIX3. Дополнительные исследования, включая анализ пространственной организации данного локуса в клетках пациентов и анализ экспрессии генов SIX2 и SIX3, могут дать дополнительную поддержку этой гипотезе.

Методы и алгоритмы: Поскольку экспрессия гена SIX3 необходима на самых ранних этапах развития нервной системы для правильного формирования переднего мозга [4], в качестве целевой популяции клеток, на которой мы будем

оценивать эффекты хромосомной перестройки данного локуса, мы используем клетки нейральных предшественников. На первом этапе мы планируем получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки из периферических мононуклеаров крови пациентов, а затем дифференцировать их в клетки нейральных предшественников по протоколу Muratore et al. [5]. В клетках пациентов и здоровых контролей мы планируем оценить экспрессию гена SIX3.

Результаты: Мы получили и проанализировали данные РНК-секвенирования в трех образцах с делецией гена SIX2 и девяти образцах нормы. Была показана достоверная корреляция между экспрессией генов SIX2 и SIX3. Так, во всех образцах с делецией SIX2 экспрессия SIX3 значительно повышалась.

Выводы: В клетках нейральных предшественников была показана корреляция между экспрессией гена SIX2 и SIX3: делеция гена SIX2 приводит к значительному повышению экспрессии гена SIX3.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ 22-14-00247.

Disruption in the 3D organization of chromatin at the locus leads to impaired expression of the SIX3 gene in early neural development

Khabarova A.^{1*}, Gridina M.^{1, 2}, Stepanchuk Y.^{1, 2}, Nurislamov A.^{1, 2}, Korableva S.^{1, 2}, Krepishi A.³, Costa S.³, Bertola D.³, Oliveira D.³, Carvalho L.³, Fishman V.^{1, 2}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ University of San Paulo, San Paulo, Brazil

* khabarova@bionet.nsc.ru

Key words: 3D genome; chromosomal rearrangements; developmental delay; SIX3

Motivation and Aim: Our colleagues for consultation and medical genetic research referred a patient (a 16-year-old girl) with facial dimorphisms, developmental delay, autistic traits and hearing loss. Her brother and father had similar clinical manifestations. A genetic study revealed a deletion of 95 KB 2p21 (chr2:45187369-45282639, GRCh37) affecting only the SIX2 gene. It is known that members of the SIX family of transcription factors are involved in the embryonic morphogenesis of the skull and renal system. The SIX2 gene is widely expressed in the fetus at the end of the first trimester, including in the extremities, middle ear and kidneys, but its expression occurs in a limited range of tissues in adults. Currently, SIX2 mutations in humans have been shown to lead to frontal nasal dysplasia syndrome [1] and malformations of the bones of the upper eyelid and middle ear, which leads to hearing loss [2] observed in the patient. The participation of SIX2 in the development of the brain has not been shown and gene deletion could not explain the described delay in mental development. However, similar disorders have been described for another gene, SIX3, located at the same locus as SIX2 at a distance of 14 bp from the boundaries of the deletion. SIX3 is a transcription factor that is involved in the development of the eyes, nose, female reproductive system and forebrain. Various disorders of the SIX3 gene lead to severe brain malformation – holoprosencephaly [3]. From the point of view of the three-dimensional organization of chromatin, the SIX2/SIX3 locus consists of two domains, with the SIX2 and SIX3 genes

lying in different domains. The deletion detected in the patient affects not only the SIX2 gene, but also the boundary separating these domains. We suggest that the deletion found in patients may lead to a change in the spatial organization of the surrounding DNA region, which in turn may cause a violation of the regulation of the SIX3 gene. Additional studies, including analysis of the spatial organization of this locus in patients' cells and analysis of the expression of genes SIX2 and SIX3, may provide additional support for this hypothesis.

Methods and Algorithms: Since the expression of the SIX3 gene is necessary at the earliest stages of the development of the nervous system for the proper formation of the forebrain [4], we use neural progenitor cells as the target cell population on which we will evaluate the effects of chromosomal rearrangement of this locus. At the first stage, we plan to obtain induced pluripotent stem cells from peripheral mononuclear blood of patients, and then differentiate them into neural progenitor cells according to the protocol Muratore et al. [5]. In the cells of patients and healthy controls, we plan to evaluate the expression of the SIX3 gene.

Results: We obtained and analyzed RNA sequencing data in three SIX2 gene deletion samples and 9 normal samples. A significant correlation was shown between the expression of the SIX2 and SIX3 genes: in all samples with the SIX2 deletion, the expression of SIX3 was significantly increased.

Conclusion: A correlation between the expression of the SIX2 and SIX3 gene was shown in neural progenitor cells: deletion of the SIX2 gene leads to a significant increase in the expression of the SIX3 gene.

Funding: The Russian Science Foundation supported the study (No. 22-14-00247).

Список литературы/References

1. Hufnagel R.B., Zimmerman S.L. et al. A new frontonasal dysplasia syndrome associated with deletion of the SIX2 gene. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(2):487-491. doi 10.1002/ajmg.a.37441
2. Guan J., Wang D., Cao W. et al. SIX2 haploinsufficiency causes conductive hearing loss with ptosis in humans. *J Hum Genet*. 2016;61(11):917-922. doi 10.1038/jhg.2016.86
3. Laflamme C., Filion C., Labelle Y. Functional characterization of SIX3 homeodomain mutations in holoprosencephaly: interaction with the nuclear receptor NR4A3/NOR1. *Hum Mutat*. 2004;24(6):502-508. doi 10.1002/humu.20102
4. Gestri G., Carl M., Appolloni I. et al. Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development*. 2005;132(10):2401-2413. doi 10.1242/dev.01814
5. Muratore C.R., Srikanth P. et al. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols. *PLoS One*. 2014 28;9(8):e105807. doi 10.1371/journal.pone.0105807