

Поиск молекулярных путей и белковых партнеров *CNTN6* в регуляции краниогенеза

Лопаткина М.Е.^{1*}, Кашеварова А.А.^{1,2}, Скрыбин Н.А.^{1,2}, Шорина А.Р.^{3,4},
Масленников А.Б.³, Назаренко Л.П.^{1,5}, Лебедев И.Н.^{1,2,5}

¹ — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск; * e-mail: lopatkina_maria@mail.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

³ — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области

«Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр», Новосибирск

⁴ — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области

«Государственный Новосибирский областной детский психоневрологический центр»

⁵ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

«Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Актуальность. Вариации числа копий участков ДНК (CNV) у пациентов с интеллектуальными расстройствами, при которых хромосомная мутация затрагивает единственный ген, зачастую проявляются патологическими процессами не только в ЦНС, но и в других системах организма. Ранее нами и другими авторами было показано, что изолированные микроделеции и микродупликации гена *CNTN6* у пациентов с умственной отсталостью сопровождаются аномалиями черепа, лицевыми дисморфиями, сколиозом, кардиологическими нарушениями, эпилептиформными припадками. Однако чем обусловлен такой эффект, неизвестно. **Цель.** Поиск молекулярных путей и партнеров гена *CNTN6* в регуляции краниогенеза. **Материалы и методы.** На ДНК-микрочипах 44K и 60K (Agilent Technologies) проведено молекулярное кариотипирование 117 детей в возрасте от 3 до 17 лет с задержкой развития, недифференцированными интеллектуальными расстройствами (ИП) и дисморфиями. Анализ потенциальных молекулярных взаимодействий *CNTN6* и белковых продуктов генов, вовлеченных в CNVs, проведен путем построения генных сетей в ресурсе STRING. **Результаты.** Патогенные и потенциально патогенные CNVs обнаружены у 30 чел., среди которых аномалии черепа диагностированы у 24 пробандов. Для трех детей с изолированной мутацией в гене *CNTN6* значимыми оказались сигнальные пути Notch и CAM, гены которых *NOTCH1* и *ALCAM* участвуют в регуляции остеогенеза. При построении сетей для 17 пациентов с CNVs, затрагивающими другие хромосомные области, с аномалиями черепа (N = 11) и без (N = 6), вовлечение генов CAM-пути выявило еще для одного ребенка с аномалией черепа. Вовлечение Notch-сигнального пути было отмечено в обеих группах. **Выводы.** Аномалии черепа у пациентов с изолированными микроделециями и микродупликациями в гене *CNTN6* наиболее вероятно опосредованы CAM-сигнальным путем через взаимодействие *CNTN6* с продуктом гена *ALCAM*.

Ключевые слова: краниогенез, вариации числа копий участков ДНК, *CNTN6*, CAM сигнальный путь, *ALCAM*

Search for molecular pathways and protein partners of *CNTN6* in craniogenesis regulation

Lopatkina M.E.^{1*}, Kashevarova A.A.^{1,2}, Skryabin N.A.^{1,2}, Shorina A.R.^{3,4},
Maslennikov A.B.³, Nazarenko L.P.^{1,5}, Lebedev I.N.^{1,2,5}

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRC, Tomsk, Russia; * e-mail: lopatkina_maria@mail.ru

² — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ — State Novosibirsk Regional Clinical Diagnostic Center, Novosibirsk

⁴ — State Novosibirsk Regional Children's Psycho-Neurological Center, Novosibirsk

⁵ — Siberian State Medical University, Tomsk

Introduction: Copy number variations of single gene (CNVs), that have been described in patients with intellectual disability, frequently affect not only the central nervous system, but also some other systems. We and other authors have shown that isolated microdeletions and microduplications of *CNTN6* gene in patients with intellectual disability were accompanied by cranial malformations, facial dysmorphism, scoliosis, cardiological abnormalities, and seizures. However, it is unclear what underlies this effect. **Aim.** This work aims to search for molecular pathways and partners of *CNTN6* that may regulate craniogenesis. **Materials and methods.** The molecular karyotyping for 117 children of 3–17 years old with developmental delay, intellectual disability and dysmorphic features was performed using 44K and 60K arrays (Agilent Technologies). The analysis of possible molecular interactions of *CNTN6* and proteins encoded by genes of likely pathogenic CNVs was done by STRING gene networks. **Results.** Pathogenic and potentially pathogenic CNVs were found in 30 patients, among which 24 patients had skull anomalies. For three children with isolated *CNTN6* mutation the Notch and CAM signaling pathways with *NOTCH1* and *ALCAM* participating in osteogenesis appeared to be significant. When building gene networks for the 17 patients with the CNVs, affecting other chromosomal regions, with skull abnormalities (N = 11) and without them (N = 6), the involvement of CAM pathway genes was shown for one more child with skull anomaly. Notch

signaling pathway was found in both groups. **Conclusions.** Skull anomalies in patients with *CNTN6* microdeletions and microduplications are more likely mediated by CAM signaling pathway through the interaction of *CNTN6* with the product of *ALCAM* gene.

Key words: craniogenesis, DNA copy number variation, *CNTN6*, CAM signaling pathway, *ALCAM*

Введение

Хромосомные болезни, обусловленные вариациями числа копий участков ДНК (CNV), как правило, проявляются патологическими процессами в различных тканях и органах. Традиционно это объясняется изменениями копийности нескольких генов, вовлеченных в хромосомную мутацию. Однако множественность проявлений наблюдается и у пациентов при микроделециях/микродuplicациях, затрагивающих один ген. Различными черепно-лицевыми аномалиями сопровождаются микроделеции/микродuplicации *CNTN6*, экспрессирующегося преимущественно в ЦНС [1, 2]. Возможная роль данного гена была также показана в процессе возникновения брахицефалической формы черепа у кошек персидской породы [3].

В основу настоящего исследования легла гипотеза о том, что изменение копийности одного гена отражается на функционировании других генов, взаимодействующих с ним. Работа направлена на выявление молекулярных путей и поиск потенциальных партнеров гена *CNTN6*, задействованных в регуляции краниогенеза.

Материалы и методы

С применением микрочипов Human Genome CGH Microarray Kits 4x44K и 8x60K (Agilent Technologies, США) обследовано 117 детей в возрасте от 3 до 17 лет с задержкой развития (до 5 лет) или ИР (IQ<70) и имеющими дисморфии. Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НИИМГ. Информированное согласие от родителей пробандов получено. Интерпретация CNVs проведена с использованием Базы данных геномных вариантов [4].

С помощью ресурсов STRING (степень достоверности ассоциаций $\geq 0,4$; число молекулярных партнеров 50) и KEGG PATHWAY ($p \leq 0,05$) построены сети белок-белковых взаимодействий *CNTN6* и продуктов генов, выявленных при анализе потенциально патогенных CNVs, а также визуализированы биологические пути, затрагиваемые такими взаимодействиями. STRING показывает наличие взаимодействия между белками в случае, если они совместно выполняют некоторую функцию, однако не обязательно физически взаимодействуя при этом друг с другом.

Результаты и обсуждение

Патогенные и потенциально патогенные CNVs обнаружены у 30 из 117 пациентов (26%). Аномалии черепа

(АЧ) в этой группе диагностированы у 24 детей, при этом у 3 были выявлены CNV, затрагивающие только ген *CNTN6*. У остальных 6 пациентов череп был без особенностей. Из дальнейшего анализа исключены 10 пациентов с АЧ и крупными CNVs, размером более 5 млн п.н. На первом этапе были построены сети белок-белковых взаимодействий для *CNTN6*. Показано, что данный белок потенциально может участвовать в регуляции остео- и краниогенеза через сигнальные пути Notch и молекул межклеточной адгезии (CAM) (табл. 1). Notch1 регулирует дифференцировку остеобластов [5]. Показано, что экспрессия *ALCAM* играет важную роль в формировании костной ткани [6].

Далее для каждого из 14 детей с АЧ были построены сети для выявления у них KEGG-путей, в которые вовлечены гены из CNVs и которые могут иметь отношение к остео- и краниогенезу, а также для оценки частоты встречаемости среди них Notch и CAM путей (табл. 1). Данные пути были значимыми для пациентов № 13 и № 9 соответственно.

Очевидно, что многие из выявленных путей могут регулировать не только краниогенез, но и другие процессы, в том числе интеллектуальное развитие ребенка. Для идентификации специфичных для краниогенеза механизмов и генов построены сети взаимодействия продуктов генов, вовлеченных в CNVs у пациентов с ИР, но без аномалий черепа, и выделены KEGG-пути, общие для двух групп пациентов. Сигнальный путь Notch был также зарегистрирован и в контрольной группе — пациент № 4 (табл. 2).

Таким образом, очевидно, влияние *CNTN6* на процессы остео- и краниогенеза наиболее вероятно через CAM-сигнальный путь, где молекулярным партнером контактина 6 является продукт гена *ALCAM*, локализованного в субсегменте 3q13.11 (OMIM 601662). Показано, что микроделеции области 3q13.11, затрагивающие гены *ALCAM* и *CBLB*, сопровождаются черепно-лицевыми аномалиями у пациентов [7, 8]. Учитывая участие белка *ALCAM* в регуляции остеогенеза [6], он может опосредовать нарушение краниогенеза у пациентов с мутациями в гене *CNTN6*.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа получила финансовую поддержку гранта Российского научного фонда (№ 14-15-00772).

Таблица 1

Патогенные CNVs у пациентов с интеллектуальными расстройствами и аномалиями черепа

№	Результаты aCGH (по ISCN (2013))	Размер, млн п.н.	KEGG-пути	Гены-кандидаты краниогенеза, вовлеченные в CNVs	Аномалии черепа
1	arr[hg18] 3p26.3(1,172,623-1,467,721) x 1	0,29	Сигнальный путь Notch** Клеточная адгезия (CAMs)**	<i>CNTN6</i>	Микроцефалия
2	arr[hg18] 3p26.3(1,172,623-1,467,721) x 1	0,29	Сигнальный путь Notch** Клеточная адгезия (CAMs)**	<i>CNTN6</i>	Оксицефалия, выступающие лобные бугры
3	arr[hg18] 3p26.3(701,645-1,467,721) x 3 pat	0,77	Сигнальный путь Notch** Клеточная адгезия (CAMs)**	<i>CNTN6</i>	Долихоцефалия
4	arr[hg18] 11q22.3(107,970,000-108,140,000) x 1	0,17	Биогенез рибосом у эукариот*	---	Микроцефалия, удлиненное лицо, гидроцефалическая форма черепа
5	arr[hg18] 2q12.3(107,971,000-108,435,000) x 1	0,46	---	---	Микроцефалия
6	arr[hg18] 12q24.12q24.13(110,668,504-110,811,179) x 3 mat	0,14	Сигнальный путь MAPK* Сигнальный путь VEGF* Сигналинг через NOD-подобные рецепторы* Сигналинг через RIG-I-подобные рецепторы** Сигнальный путь пролактина* Сигнальный путь эндоканнабиноидов** Сигналинг через Toll-подобные рецепторы* Сигнальный путь TNF* Сигнальный путь FoxO* Дифференцировка остеокластов* Сигнальный путь Rap1* Сигнальный путь инсулина* Сигнальный путь PI3K-Akt* Метаболизм пируватов** Сигнальный путь AMPK* Сигнальный путь ErbB* Сигнальный путь эстрогена* Сигнальный путь mTOR* Сигнальный путь cGMP-PKG* Сигнальный путь HIF-1* Сигнальный путь тиреоидного гормона* Клеточный цикл* Сигнальный путь Wnt* Сигнальный путь адипоцитокинов**	<i>MAPKAPK5</i>	Акроцефалия
7	arr[hg18] 4q21.21q21.22(82,189,943-83,801,062) x 4 dn	1,61	—	<i>BMP3</i>	Макроцефалия, выступающие лобные бугры, непропорционально длинные конечности
8	arr[hg18] 22q11.21(17,277,000-19,713,000) x 1	2,44	Клеточный цикл* Сигнальный путь ErbB*	<i>CDC45</i>	Акроцефалия, выступающие надбровные дуги, уплощенное лицо
9	arr[hg18] 15q22.2(60,137,384-60,978,277) x 3	0,84	Фокальная адгезия* Сигнальный путь Rap1* Сигнальный путь PI3K-Akt* Сигналинг через ECM-рецепторы** Клеточная адгезия (CAMs)** Адгезионные контакты* Цитотоксичность, опосредованная NK-клетками*	<i>TLN2</i>	Микроцефалия

Таблица 1 (окончание)

№	Результаты aCGH (по ISCN (2013))	Размер, млн п.н.	KEGG-пути	Гены-кандидаты краниогенеза, вовлеченные в CNVs	Аномалии черепа
10	arr[hg18] 16p11.2(29,233,000-30,106,000) x 1	0,87	Сигнальный путь HIF-1* Сигнальный путь MAPK* Сигнальный путь ErbB* Сигнальный путь эстрогена* Сигналинг через Toll-подобные рецепторы* Цитотоксичность, опосредованная NK-клетками* Сигнальный путь VEGF* Сигнальный путь окситоцина* Сигнальный путь пролактина* Щелевые контакты* Формирование дорзо-вентральной оси* Сигнальный путь TNF* Сигнальный путь FoxO* Дифференцировка остеокластов* Сигнальный путь cGMP-PKG* Сигнальный путь Ras* Сигнальный путь тиреоидного гормона* Сигнальный путь инсулина* Сигнальный путь Rap1* Фокальная адгезия* Сигнальный путь mTOR* Сигнальный путь PI3K-Akt* Сигналинг через NOD-подобные рецепторы* Сигнальный путь TGF-beta* Сигнальный путь AMPK* Сигнальный путь эстрогена* Сигнальный путь хемокинов*	ALDOA TAOK2	Микроцефалия
11	arr[hg18] 14q11.2(20,767,632-22,722,130) x 3 dn	1,95	Протеасомный комплекс**	PSMB5, PSMB11	Микроцефалия
12	arr[hg18] 7q21.3(94,769-94,901) x 3	0,13	Сигнальный путь PPAR*	---	Микроцефалия, гидроцефалическая форма черепа
13	arr[hg18] 6p22.2(25,677,000-26,393,000) x 3	0,72	Клеточный цикл* Сигнальный путь Notch* Сигнальный путь тиреоидных гормонов* Сигнальный путь FoxO*	---	Деформация черепа
14	arr[hg18] 17q21.31(41566540-41700815) x 3	0,13	Сигнальный путь Wnt*	---	Макроцефалия
Примечание. * — пути остео- и краниогенеза, общие для пациентов с аномалиями черепа и без них; ** — пути остео- и краниогенеза, специфичные для пациентов с аномалиями черепа; «—» — отсутствие KEGG-путей, которые могут иметь отношение к нарушению остеогенеза; «---» — в выявленных KEGG-путях участвуют не сами гены, вовлеченные в CNVs, но их молекулярные партнеры.					

Патогенные CNVs у пациентов с интеллектуальными расстройствами и нормальной формой черепа

№	Результаты aCGH (по ISCN (2013))	Размер, млн п.н.	KEGG-пути
1	arr[hg18] 3q22.1(133,649,717-133,761,328) x 1	0,11	Сигнальный путь PPAR*
2	arr[hg18] 18p11.32(2,322,000-2,672,000) x 3 pat	0,35	Клеточный цикл*
3	arr[hg18] 1q44(244,417,000-244,798,000) x 3	0,38	Биогенез рибосом у эукариот*
4	arr[hg18] 15q24.1q24.2(70,766,177-73,754,412) x 1 dn	3	Биогенез рибосом у эукариот* Сигнальный путь тиреоидных гормонов* Сигнальный путь Notch* Клеточный цикл*
	arr[hg18] 15q24.1q24.2(73,035,132-73,419,685) x 1 dn	0,38	Биогенез рибосом у эукариот* Адгезионные контакты*
5	arr[hg18] 5q33.1(148,620,000-148,735,000) x 3 mat	0,12	Сигнальный путь эстрогена* Сигнальный путь MAPK*
6	arr[hg18] 16p11.2(29,581,000-30,105,000) x 1	0,52	Сигнальный путь MAPK* Сигнальный путь HIF-1* Формирование дорзо-вентральной оси* Цитотоксичность, опосредованная НК-клетками* Сигнальный путь TNF* Сигнальный путь FoxO* Сигнальный путь эстрогена* Сигналинг через Toll-подобные рецепторы* Сигнальный путь ErbB* Сигнальный путь VEGF* Сигнальный путь пролактина* Дифференцировка остеокластов* Сигнальный путь Rap1* Сигнальный путь mTOR* Сигнальный путь окситоцина* Сигнальный путь тиреоидных гормонов* Сигнальный путь инсулина* Фокальная адгезия* Сигнальный путь cGMP-PKG* Сигнальный путь PI3K-Akt* Щелевые контакты* Сигнальный путь Ras* Сигнальный путь AMPK* Сигналинг через NOD-подобные рецепторы* Сигнальный путь TGF-beta* Сигнальный путь Wnt* Сигнальный путь эндоканнабиноидов* Сигнальный путь хемокинов*
Примечание. * — пути остео- и краниогенеза, общие для пациентов с аномалиями черепа и без них			

Список литературы

1. Hu J, Liao J, Sathanoori M et al. *CNTN6* copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *J Neurodev Disord*. 2015;7(1):26.
2. Kashevarova AA, Nazarenko LP, Schultz-Pedersen S 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(1):97.
3. Bertolini F, Gandolfi B, Kim ES et al. Evidence of selection signatures that shape the Persian cat breed. *Mamm Genome*. 2016;27(3-4):144-155.
4. База данных геномных вариантов — <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>
5. Sciaudone M, Gazzero E, Priest L et al. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*. 2003;144(12):5631-5639.
6. Hooker RA, Chitteti BR, Egan PH et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM or CD166) modulates bone phenotype and hematopoiesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2015;15(1):83-94.
7. Simovich MJ, Bland SD, Peiffer DA et al. Delineation of the proximal 3q microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(13):1729-1735.
8. Sobreira N, Gnanakkan V, Walsh M et al. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Res*. 2011;21(10):1720-1727.