

КОРАБЛЕВ
Алексей Николаевич

Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntn6* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) в Отделе молекулярных механизмов онтогенеза. г. Новосибирск

**Научный
руководитель:**

Серов Олег Леонидович
доктор биологических наук, профессор,
руководитель отдела молекулярных механизмов
онтогенеза Института цитологии и генетики СО РАН

**Официальные
оппоненты:**

Кулемзин Сергей Викторович
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории иммуногенетики Института
молекулярной и клеточной биологии Сибирского
отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Гуляева Людмила Федоровна
доктор биологических наук, профессор заведующая
лабораторией молекулярных механизмов
канцерогенеза, НИИ молекулярной биологии и
биофизики, ФГБНУ Исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины,
г. Новосибирск

Ведущее учреждение:

Институт биологии развития РАН имени Н.К.
Кольцова, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу:

пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел +7 (383) 3634906, факс +7 (383) 3331278.

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Известно, что хромосомные перестройки являются причинами наследственных заболеваний у человека. До недавнего времени хромосомные перестройки у пациентов выявляли с помощью методов световой микроскопии, включая метод FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization, флуоресцентная гибридизация *in situ*). Однако, для скрининга хромосомных перестроек у большого числа пациентов цитогенетический анализ G-окрашивания хромосом в сочетании с FISH слишком трудоемкий и требует много времени.

Ситуация изменилась благодаря разработке методов сравнительной геномной гибридизации (Comparative Genome Hybridization, CGH), которые позволяют выявлять CNV (микроделеции, микродупликации или транслокации) от 300 до 1000 т.п.о. В качестве примера эффективности метода CGH можно привести исследование 8789 пациентов, имевших по данным световой микроскопии нормальный кариотип, но среди которых, на основе данных CGH, было идентифицировано 1049 случая (12%) различных хромосомных аномалий. По разным оценкам, CNV являются причиной не менее 15% тяжелых наследственных патологий. Более того, до 25% случаев невропатологий и умственной отсталости обусловлено CNV.

Феномен CNV встречается с разной частотой в геноме человека. Своего рода «горячая точка» генома, в которой возникают CNV с повышенной частотой (до 0,4%), находится в плече 3-ей хромосомы (район 3p26.3). Район 3p26.3 содержит три гена, *CHL1*, *CNTN6* и *CNTN4*, относящихся к суперсемейству иммуноглобулиновых генов и выполняющих важную роль в процессах дендритогенеза при формировании синаптической пластичности и памяти у человека. Наше внимание привлек ген *CNTN6*, делеции и дупликации которого являются причиной психоневрологических патологий у гетерозиготных носителей. Сам ген *CNTN6* имеет сложную экзон-интронную организацию, содержит 23 экзона и кодирует белок CNTN6, состоящий из 1028 аминокислотных остатков.

Важно отметить, если CNV гена *CNTN6* приводят к психоневрологическим расстройствам, то точечные мутации этого гена не приводят к клиническим последствиям. Нокаут гена *Cntn6* у мышей в гомозиготном состоянии проявляется в незначительном снижении моторной координации, но не приводит к столь значительным невропатологическим последствиям, как у человека. У мышей гены *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4* локализованы на 6-ой хромосоме и этот район синтеничен району 3p26.3 человека.

Разработка методов адресного редактирования генома на основе технологии CRISPR/Cas9 открыла перспективу для получения целевых масштабных хромосомных перестроек у лабораторных животных. Это явилось для нас стимулом создать мышей-носителей масштабных хромосомных перестроек, затрагивающих

единственный ген *Cntn6*, и потенциально способных служить экспериментальной моделью для оценки их эффектов.

Цель исследования - создать мышей с масштабными делециями и дупликациями, включающими ген *Cntn6*, с помощью технологии CRISPR/Cas9 и оценить их влияние на жизнеспособность и развитие животных.

Задачи:

1. Разработать дизайн экспериментов получения целевых делеций, дупликаций и инверсий гена *Cntn6* в зиготах с использованием технологии CRISPR/Cas9;
2. Провести эксперименты на зиготах мышей с применением технологии CRISPR/Cas9 с целью адресного получения делеций (размером 1137 т.п.о.) и дупликаций (размером 2274 т.п.о.), включающих единственный ген *Cntn6*;
3. Исследовать процесс формирования индуцированных хромосомных перестроек и их судьбу от одноклеточных эмбрионов до взрослых животных F0, развившихся из экспериментальных зигот;
4. Оценить уровень корректности индуцированных CRISPR/Cas9 делеций и дупликаций гена *Cntn6* при помощи секвенирования ПЦР продуктов, Саузерн-блот анализа, полногеномного секвенирования и FISH;
5. Исследовать экспрессию генов *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4* у мышей-носителей делеций и дупликаций и оценить влияние перестроек на жизнеспособность и развитие мышей.

Научная новизна. Впервые показано, что целевые делеции, индуцированные CRISPR/Cas9, формируются на одноклеточной стадии (чаще в одном из пронуклеусов и реже в обоих) с высоким уровнем корректной репарации двунитевых разрывов ДНК. Впервые с помощью FISH и Саузерн-блот анализа показано отсутствие следов интеграции делетированных фрагментов ДНК (размером свыше 1000 т.п.о.) на 6-ую хромосому или другие хромосомы. Реконструирован возможный механизм одновременного образования делеции и дупликации посредством межхроматидного обмена в поздней S-фазе в одном из пронуклеусов одноклеточного эмбриона. Полногеномное секвенирование гомозиготных носителей дупликации гена *Cntn6* показало целостность дуплицированных копий с минимальными нецелевыми изменениями последовательностей ДНК в области целевых сайтов CRISPR/Cas9.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Впервые детально описано время и динамика формирования мегабазных делеций, дупликаций и инверсий в 6-ой хромосоме мыши, индуцированных с помощью технологии CRISPR/Cas9, с минимальным уровнем нецелевых модификаций генома. Впервые описана «судьба» делетированных фрагментов ДНК мегабазного размера посредством их элиминации на одноклеточной стадии. Созданные линии мышей с масштабными хромосомными перестройками гена *Cntn6* потенциально могут стать моделями для дальнейших физиологических исследований его роли в нейрогенезе.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Масштабные хромосомные делеции и дупликации, индуцированные системой CRISPR/Cas9, формируются на одноклеточной стадии чаще в одном из пронуклеусов у мышей, а делетированные фрагменты ДНК элиминируются на одноклеточной стадии без интеграции в другие районы генома;
2. Делеции и дупликации гена *Cntn6* не влияют на жизнеспособность мышей носителей в эмбриональной и постнатальной стадиях развития и не приводят к появлению дисморфозов и видимых невропатологий.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Получение мышей производилось совместно с Серовой И.А. FISH анализ выполнен Пристяжнюк И.Е. и Мининой Ю.М. Саузерн-блот анализ проведен группой Скрябина Б.В. (Германия). Полногеномное секвенирование выполнено компанией GENEWIZ (США), а биоинформационная обработка данных результатов проведена Фишманом В.С. при моем участии. Исследование экспрессии *Cntn6*, *Chll* и *Cntn4* у мышей с делециями и дупликациями было проведено совместно с Гридиной М.М.

Апробация работы. Результаты диссертации были доложены на научных конференциях: III-й Национальный конгресс по регенеративной медицине», Москва, 15-18 ноября 2017; Международная конференция «CRISPR-2018», Новосибирск, 10-14 сентября, 2018; IV-й Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, 18-22 ноября 2019.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах, содержит 16 рисунков и 12 таблиц, а также 4 рисунка и 1 таблицу в приложении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор целевых сайтов для применения CRISPR/Cas9 технологии. Выбор последовательностей хнПНК был произведен при помощи программы «sgRNA Scorer 2.0» (<https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/>). Выбор праймеров (справа и слева от целевого сайта) для каждой хнПНК производился при помощи программы «Primer-BLAST» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательность ssODN (single strand oligonucleotide, одноцепочечная олигонуклеотидная ДНК) содержала гомологичные геному мыши последовательности по обе стороны от сайтов хнПНК и имели длину по 60 нуклеотидов.

Получение компонентов для микроинъекции (мПНК Cas9, хнПНК и ssODN). Получение хнПНК было проведено как описано ранее [Korablev и др., 2020]. ssODN был химически синтезирован в фирме «ДНК-синтез» (Россия, Москва). мПНК-Cas9 была использована от фирмы «Thermo Fisher Scientific» (США).

Подготовка животных, получение зигот и манипуляции с ними. Все процедуры, направленные на получение генно-модифицированных животных выполнены по ранее описанным протоколам [Hogan B., Beddington R., Costantini F., 1994]. Цитоплазматическую микроинъекцию зигот производили водным раствором, содержащим 50 нг/мкл мПНК Cas9, 25 нг/мкл каждой хнПНК и 100 нг/мкл ssODN.

Выделение ДНК и генотипирование животных. Генотипирование животных проводили как описано ранее [Korablev и др., 2020].

Приготовление геномной ДНК и Саузерн-блот анализ делеций гена *Cntn6*. Выделение ДНК, приготовление зондов и гибридизацию проводили как было описано ранее [Skryabin и др., 2020].

Получение культур первичных фибробластов от экспериментальных мышей. Культуры первичных фибробластов были получены от взрослых основателей-носителей делеций и дупликаций и 14-дневных эмбрионов F1, гетерозиготных по этим перестройкам. Способ получения культур фибробластов описан ранее [Kruglova и др., 2008].

Приготовление и мечение ВАС-ДНК проб для FISH-анализа метафазных хромосом. ВАС-клоны были получены из «ВАСРАС Resources Center» (California, USA). Три ВАС-клона: I15, J8 и E20 были комплементарными к району делеции гена *Cntn6*, а K19 к последовательности ДНК расположенной в 10 000 т.п.о. левее сайта делеции. Мечение выделенной ДНК ВАС-клонов была проведена с помощью набора ник-трансляции (Invitrogen) с использованием digoxigenin-11-dUTP и Biotin-16-dUTP по протоколу производителя (Roche). **FISH анализ метафазных хромосом фибробластов с использованием меченой ДНК ВАС клонов.** Приготовление препаратов метафазных хромосом фибробластов и проведение FISH анализа было проведено как описано ранее [Podriadchikova и др., 2009].

Полногеномное секвенирование двух гомозиготных носителей 2274 т.п.о. дупликации и характеристика их границ. Полногеномное секвенирование было проведено как описано ранее [Korablev и др., 2020].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение животных, несущих делеции, дупликации и инверсии района гена *Cntn6*. Для получения мышей с делециями (размером 1137 т.п.о), инверсиями (размером 1137 т.п.о) и дупликациями (размером 2274 т.п.о.), включающих ген *Cntn6*, была использована система CRISPR/Cas9. Дизайн перестроек у мышей был спланирован так, чтобы воспроизвести делеции и дупликации, описанные у человека [Kashevarova и др., 2014]. Основной целью генетических манипуляций являлось удаление гена *Cntn6* (размер всего гена составляет 370,6 т.п.о.) с захватом 5'- и 3'-некодирующих регионов. Однако, кроме получения делеций, выбранный дизайн эксперимента предусматривает возникновение дупликаций и инверсий. Схема генетических модификаций представлена на Рисунке 1.

Эксперименты по получению целевых делеций проводились на зиготах, полученных от самок-гибридов F1 CBA/J x C57BL/6J или самок линии C57BL/6J, покрытых самцами линии C57BL/6J. Нами был выбран вариант микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 (пара хРНК и мРНК-Cas9) и ssODN в цитоплазму зигот, как более эффективный и менее травматичный метод. Всего нами было проведено 599 микроинъекций в зиготы и после кратковременного культивирования 256 из них были трансплантированы в воронку яйцевода псевдобеременным (суррогатным) самкам линии CD-1. Как результат, мы наблюдали рождение 41-го потомка.

ПЦР анализ (с последующим секвенированием ПЦР-продуктов) 41-го потомка показал, что 11 из них были носителями ожидаемых генетических модификаций

района гена *Cntn6*: 5 мышей-носителей целевой делеции, 2 мыши-носители делеции и дупликации одновременно и 4 мыши-носители инверсии (Рисунок 1 и 2).

Анализ секвенирования «стыковочных» сайтов у семи носителей делеции (размером 1137 т.п.о.) показал, что у трех основателей №15, №20 и №35 нуклеотидные последовательности совпадают с последовательностью ssODN, что означает формирование «стыка» по механизму HDR (репарация по типу гомологичной рекомбинации, *homology directed repair*). У четырех других носителей №1, №9, №11, и №20 наблюдалась потеря нуклеотидов в диапазоне от одного (у основателя №1) до 101 п.о. (у основателя №9), что однозначно указывает на формирование «стыка» по механизму NHEJ (негомологичное соединение концов, *non-homologous end joining*). Учитывая, что основатель №15 был гомозиготным по делеции (см. ниже), то есть индуцированные делеции были в обоих гомологах, примененный нами протокол CRISPR/Cas9 обеспечил 50% корректное соединение концов ДНК, в четырех случаях двунитевых разрывов ДНК из семи. Несомненно, свою позитивную роль в данном процессе выполнило применение ssODN, который выступает в роли своеобразного «моста» [Boroviak и др., 2016] между двумя отдаленными сайтами двунитевых разрывов ДНК, выполняя функцию матрицы при репарации по механизму HDR.

У двух основателей №1 и №20, наряду с делецией, была идентифицирована дупликация размером 2274 т.п.о. (Рисунки 1 и 2). С точки зрения примененного дизайна образование дупликаций – это «побочное» событие [Birling и др., 2017; Boroviak и др., 2016; Zhang и др., 2015]. Стыки между дуплицированными копиями

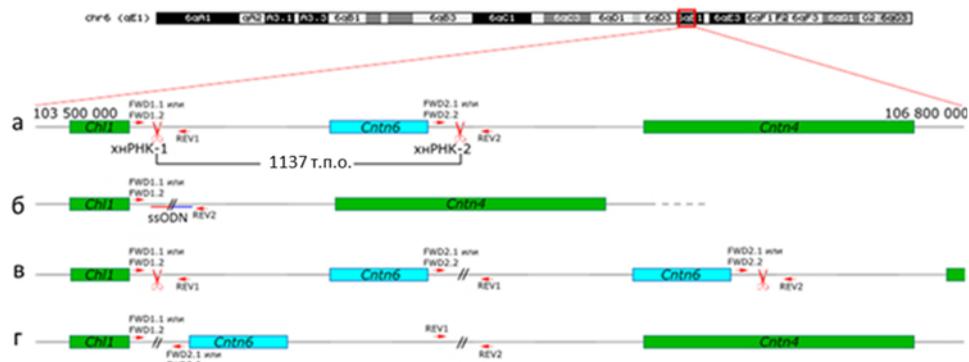


Рисунок 1. Схема целевого локуса у мышей дикого типа и мышей с целевыми модификациями. «а» Схема организации региона от 103 500 000 до 106 800 000 на 6-ой хромосоме мыши, содержащего гены *Chn1*, *Cntn6* и *Cntn4*. Красными стрелками изображены позиции для праймеров: FWD1.1 или FWD1.2, REV1, FWD2.1 или FWD2.2 и REV2. «б» Схема генотипирования делеции размером 1137 т.п.о. с использованием праймеров FWD1.1 и REV2, а также левое и правое плечо ssODN, которые обозначены красным и синим цветами соответственно. «в» Схема генотипирования дупликации при помощи праймеров FWD2.1 и REV1. «г» Схема генотипирования инверсии при помощи праймеров FWD1.1 или FWD1.2 и FWD2.2 для левой границы, и REV1 и REV2 для правой границы.

могут образовываться только при участии механизма NHEJ, так как потенциальная матрица для гомологичной репарации отсутствует. По результатам секвенирования сайтов «стыков» между двумя копиями была обнаружена потеря 5 п.о. и 13 п.о. у основателей №1 и №20 соответственно. В результате, обе линии мышей «воспроизводят» дубликацию гена *CNTN6*, которые были ранее описаны у человека [Kashevarova и др., 2014].

Так же, как и дубликации, инверсии являются «побочным» событием при использовании технологии CRISPR/Cas9 [Birling и др., 2017; Boroviak и др., 2016], а образование границ инверсий происходит также по пути NHEJ. При помощи ПЦР у всех четырех потомков-носителей инверсий F0 удалось определить их правую границу. Интересно, что у основателя №10 не произошло потери нуклеотидов и образовавшиеся концы ДНК лигировались сразу после возникновения двуцепочечных разрывов. У трех других основателей наблюдалась потеря от 6 п.о. (у №21) до 252 п.о. (у №39). Попытка установления левой границы инверсий удалась только у двух носителей №2 и №21. У этих же животных наблюдалась потеря 14 п.о. и 83 п.о. в сайте соединения соответственно. Можно предположить, что у двух других основателей произошли более масштабные потери нуклеотидов. Эти данные согласуются с представлениями, что при образовании крупных перестроек могут возникать локальные изменения в местах стыков [Boroviak и др., 2017].

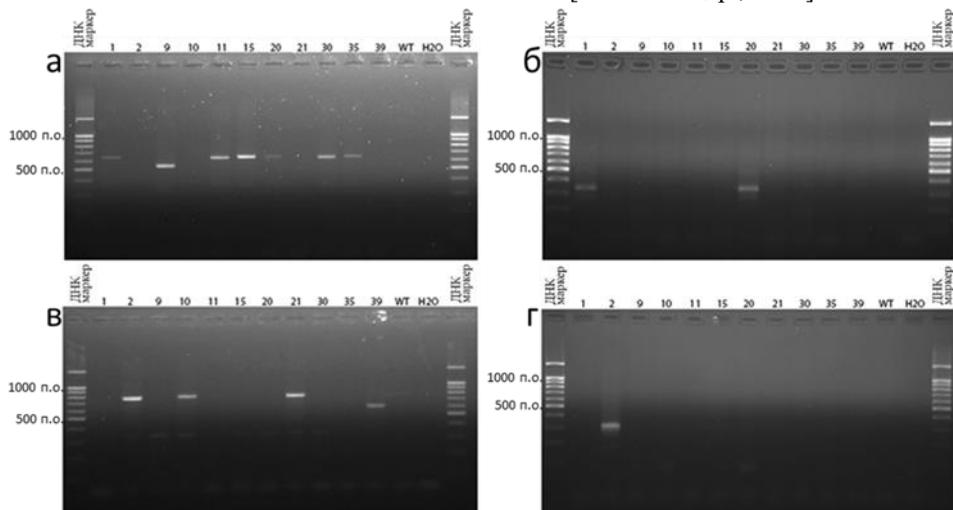


Рисунок 2. Результаты ПЦР 11 мышей F0 по идентификации делеции (а), дубликации (б), правой границы инверсии (в) и левой границы инверсии (г). Использованы следующие праймеры для определения: делеция - FWD1.1+REV2, дубликация - FWD2.1+REV1, инверсия - REV1+REV2 для правой границы и FWD1.1+FWD2.2 для левой границы. Ожидаемые размеры продуктов: делеция 636 п.о., дубликация 349 п.о., инверсия (правая границы) 790 п.о., инверсия (левая граница) 323 п.о. Индивидуальные номера животных указаны сверху, WT – образец ДНК мыши дикого типа, H₂O – отрицательный контроль. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.).

Наследование индуцированных CRISPR/Cas9 хромосомных перестроек среди потомства F1. Полученные результаты по наследованию перестроек среди потомков F1, полученных от основателей-носителей делеций №9, №30 и №35 и всех основателей-носителей инверсий №2, №10, №21, №39, свидетельствуют об отсутствии заметных отклонений от соотношения 1:1 (Таблица 1). Эти данные предполагают, что образование делеций или инверсий произошло на одноклеточной стадии развития эмбриона только в одном из гомологов.

Все потомки F1 от основателя №15 (Таблица 1) унаследовали делецию, что указывает на его гомозиготный статус по делеции. Кроме того, дополнительный ПЦР-анализ F0 №15, с целью детекции удаляемого фрагмента и на границы делезируемого фрагмента, не выявил ПЦР-продуктов, что также указывает на гомозиготность основателя №15. Суммируя эти данные, можно сделать вывод, что образование делеций у основателя №15 произошло на стадии зиготы одновременно в двух гомологах.

Сложнее обстоит ситуация при наследовании делеций и дупликаций от основателей №1 и №20. Среди потомков выявляются как особи дикого типа, так и особи с делециями или дупликациями, но в разных соотношениях (Таблица 1). Обращает на себя внимание то, что суммарное соотношение потомков носителей делеции или дупликации относительно потомков дикого типа 19:11 и 12:8 у потомков от основателей №1 и №20 соответственно. Это означает, что перестройки формируют одну группу отдельную от животных дикого типа, причем вторая несколько

Таблица 1. Наследование хромосомных перестроек у потомков F1 от основателей-носителей делеций, инверсий и дупликаций.

Основатели с делецией	Количество пометов	Количество потомков	Дикий тип	Делеции	
№9	1	8	3	5	
№11	2	12	3	9	
№15	2	17	0	17	
№30	2	18	9	9	
№35	3	18	10	8	
Основатели с инверсиями	Количество пометов	Количество потомков	Дикий тип	Инверсии	
№2	2	17	8	9	
№10	2	16	9	7	
№21	1	10	5	5	
№39	2	18	8	10	
Основатели с дупликациями	Количество пометов	Количество потомков	Дикий тип	Делеции	Дупликации
№1	4	30	19	4	7
№20	2	20	12	6	2

превалирует над первой. Эти результаты свидетельствуют о мозаицизме среди гамет у обоих основателей и независимой сегрегации делеции и дупликации.

Саузерн-блот анализ основателей и их потомков F1. Нами был проведен Саузерн-блот анализ геномной ДНК всех основателей и потомков F1, полученных скрещиванием основателей-носителей делеций с мышами дикого типа (Рисунок 3). Целью такого исследования была характеристика границ хромосомных перестроек, наличие или отсутствие локальных изменений структуры ДНК в районах стыков. Отдельной задачей являлась идентификация потенциальных транслоцированных фрагментов ДНК, образующихся при делециях.

Суммируя результаты Саузерн-блот анализа, можно констатировать:

- 1) они обнаруживают ожидаемый (предсказанный) набор фрагментов ДНК при анализе всех пяти основателей-носителей делеций и двух носителей дупликаций и не детектируют какие-либо непредсказанные дополнительные фрагменты ДНК;
- 2) они согласуются с данными секвенирования ПЦР-продуктов, указывающих либо на отсутствие потери нуклеотидов, либо на небольшую утрату их числа вблизи сайтов двунитевых разрывов ДНК, что предсказуемо не должно было повлиять на размеры рестрикционных фрагментов ДНК. Тем не менее, потеря 101 п.о. у основателя-носителя делеции №9 и его потомка отразилась на увеличении электрофоретической подвижности фрагмента 4250 п.о. делеционного аллеля;
- 3) произошли заметные изменения в наборе фрагментов ДНК у трех из четырех исследованных основателей-носителей инверсий (за исключением F0 №2), которые указывают на дополнительные нецелевые структурные изменения ДНК, вызванные системой CRISPR/Cas9.

Характеристика границ 2374 т.п.о. дупликаций и полногеномное секвенирование гомозиготных животных-носителей дупликации. При помощи секвенирования ПЦР-продуктов по Сенгеру в сайте соединения двух копий у основателей-носителей дупликации (одновременно с делецией) №1 и №20 была установлена потеря 5 п.о. и 13 п.о. соответственно. Также был проведен аналогичный анализ для левой и правой границ, которые являются местами сайтов для хнРНК-1 и хнРНК-2 соответственно. У основателя №1 была обнаружена потеря 18 п.о. у левой границы дупликации, и 1 п.о. у правой границы дупликации, а у основателя №20 была выявлена потеря 172 п.о. у левой границы, и 4 п.о. у правой границы дупликации. Кроме того, было выявлено замещение GTTT последовательности на CCCA вблизи делеции 172 п.о. для левой границы у основателя №20.

Эти данные свидетельствуют о том, что в целевых сайтах для хнРНК произошли двунитевые разрывы, которые были репарированы по пути негомologичного соединения концов (NHEJ). Кроме того, это позволило нам в дальнейшем быстро и достоверно, при помощи метода ПЦР, определять гомозиготных носителей дупликаций.

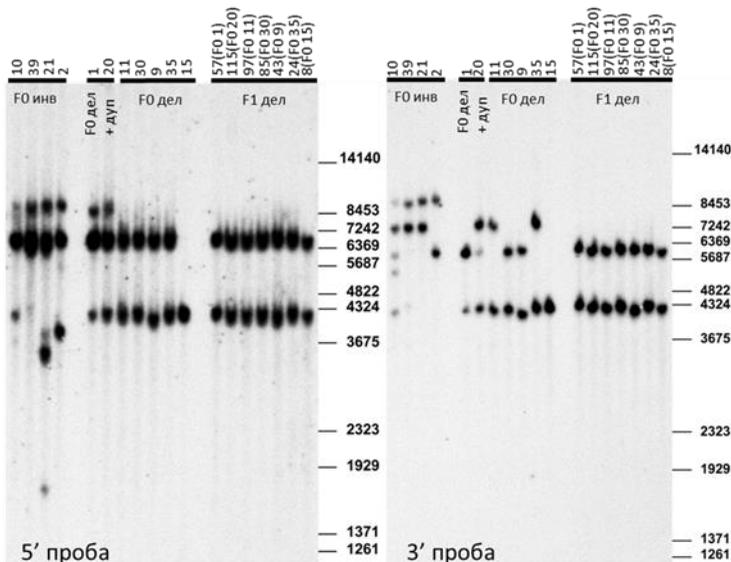


Рисунок 3. Результаты Саузерн-блот анализа геномной ДНК (с использованием меченых 5'- и 3'-зондов левая и правая стороны соответственно): основателей носителей делеций, №11, №30, №9, №35 и №15, их потомков F1: №97(F0 11), №85(F0 №30), №43(F0 №9), №24(F0 №35) и №8(F0 №15); основателей-носителей дупликации, №1 и №20 и их потомков F1: №57(F0 №1) и №115(F0 №20), и основателей-носителей инверсий, №10, №39, №21 и №2. Ожидаемые фрагменты: 6601 п.о. – дикий тип (5'-проба), 5887 п.о. – дикий тип (3'-проба), делеция - 4250 п.о. (5'- и 3'-пробы), дупликация - 5887 п.о. (5'-проба), инверсия (правая граница) – 3869 п.о. (5'-проба) и инверсия (левая граница) – 8619 п.о. (5'- и 3'-пробы). Фрагмент около 7500 п.о. при гибридизации с 5'-пробой соответствует аллелю дикого типа линии мышей СВА/Ј. Справа – маркеры молекулярных весов в п.о.

Полногеномное секвенирование двух гомозиготных потомков, полученных от основателей №1 и №20, подтвердило данные секвенирования по Сенгеру и не выявило дополнительных геномных аномалий. Важно также отметить, что по данным полногеномного секвенирования не было выявлено перестроек в дуплицированном фрагменте и в прилежащих районах от начала гена *Ch11* до конца гена *Cntn4*.

SNP анализ основателей-носителей дупликаций. Эксперимент по получению мышей, несущих целевые хромосомные перестройки, был проведен на межлинейных гибридах F1 C57BL/6J x CBA/J. В связи с этим, у части животных стало возможным установление происхождения родительских аллелей по SNP в 20 экзоне в позиции chr6: 104848175 (mm10): у линии C57BL/6J – T, у линии CBA/J – C.

Так с помощью ПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру было установлено, что основатель №20 имеет два разных аллеля гена *Cntn6* – один происходит от линии C57BL/6J, а другой от линии CBA/J. У потомка от этого основателя (№20), который был получен после возвратного скрещивания на линию C57BL/6J, все три аллеля *Cntn6* произошли от мышей линии C57BL/6J. Это означает,

что дублированный аллель у основателя №20 произошел из одной хромосомы линии C57BL/6J. Таким образом, наиболее вероятным механизмом образования дубликаций является межхроматидный обмен [Birling и др., 2017], а не обмен между хромосомами [Boroviak и др., 2016].

FISH анализ метафазных хромосом основателей-носителей, индуцированных CRISPR/Cas9 делеций. Применение технологии CRISPR/Cas9 на зиготах нередко сопровождается мозаицизмом среди соматических клеток. Целевые изменения в геноме могут происходить на разных стадиях развития эмбриона – от одноклеточной до 4-клеточной. Таким образом, соотношение клеток с модификациями и без (как соматических, так и половых) у основателей зависит от стадии развития на которой произошли генетические изменения.

В случае с индуцированными CRISPR/Cas9 масштабными делециями встают и другие важные вопросы: «Какова судьба делетированного фрагмента хромосомы? Он элиминируется полностью или может транслоцироваться в другие участки генома в виде одного блока или мелких фрагментов?».

Для ответа на эти вопросы был проведен FISH-анализ метафазных хромосом в культивируемых клетках пяти основателей-носителей делеции и двух носителей одновременно делеции и дубликации. Для проведения FISH было выбрано 4 ВАС клона, которые были использованы для приготовления меченых зондов: J8, E20, I15 и K19. Зонды J8, E20 и I15 (зеленые, суммарным размером 574 732 п.о.) маркируют делетируемый фрагмент (размер 1137 т.п.о.), а зонд K19 (красный) выступает в качестве маркера 6-ой хромосомы мыши и расположен за 10 000 т.п.о. от делеции.

По результатам FISH анализа культивируемых клеток от пяти основателей-носителей делеции 1137 т.п.о. не выявлено признаков транслокаций делетированного материала на другие хромосомы или в другой район 6-ой хромосомы. Эти результаты указывают на элиминацию делетированного материала вскоре после возникновения индуцированной CRISPR/Cas9 делеции 1137 т.п.о.

По данным FISH анализа 100% клеток основателей-носителей делеций №30 и №35 были позитивны (красный сигнал) по присутствию двух гомологов 6-ой хромосомы, а зеленый сигнал выявляется в 100% клеток только на одном гомологе этой хромосомы, что указывает на гетерозиготный статус исследованных носителей (Рисунок 2). Эти данные согласуются с данными наследования делеции у потомков F1 у основателей №30 и №35 (Таблица 1).

Что касается результатов FISH анализа клеток основателей №9 и №11 – гетерозиготных носителей делеции (Таблица 2), то было установлено, что 100% их клеток были позитивны по красному сигналу на обоих гомологах 6-ой хромосомы, и несколько меньше, 97,1% и 97,7%, были позитивны по зеленому сигналу на одном из гомологов. Единичные культивируемые клетки от обоих основателей №9 и №11 были позитивны по зеленому сигналу на обоих гомологах, 2,9% и 2,3% соответственно (Таблица 2), то есть имели фенотип дикого типа. Наличие

Таблица 2. Результаты FISH анализа метафазных хромосом в культивируемых клетках от основателей-носителей делеции и дупликации

№ F0 основателя	Количество метафазных пластинок	Фенотип			
		Гетерозигота по делеции	«Дикий тип»	Гомозигота по делеции	Клетки с трисомией по 6-ой хромосоме
Делеция					
№ 9 ♂	104	101 (97,1%)	3 (2,9%)	0 (%)	0 (%)
№ 11 ♂	87	85 (97,7%)	2 (2,3%)	0 (%)	0 (%)
№ 15 ♀	104	0 (0%)	0 (0%)	104 (100%)	0 (%)
№ 30 ♀	122	122 (100%)	0 (%)	0 (%)	0 (%)
№ 35 ♂	100	100 (100%)	0 (%)	0 (%)	0 (%)
Делеция + дупликация					
№ 1 ♀	90	31 (34,4%)	57 (66,3%)	0 (%)	2 (2,3%)
№ 20 ♀	118	69 (58,5%)	16 (39,0%)	0 (%)	3 (2,5%)

незначительного количества клеток может указывать на клеточный мозаицизм у основателей №9 и №11, но при допущении существенного селективного преимущества клеток-носителей делеции относительно клеток дикого генотипа, что маловероятно. В связи с этим, наиболее вероятным объяснением присутствия единичных клеток дикого генотипа у этих основателей следует рассматривать погрешность метода FISH.

Согласно данным по наследованию делеции у потомков F1 основателя №15 (Таблица 1), его статус определен как гомозиготный по делеции. FISH анализ (Таблица 2) показал, что 100% исследованных клеток основателя №15 позитивны только по красному сигналу на обоих гомологах (Таблица 2). Более того, по результатам Саузерн-блот анализа (Рисунок 3) основатель №15 также определяется как гомозигота по делеции. Все эти данные независимо подтверждают гомозиготность основателя №15 по делеции.

FISH анализ клеток основателей №1 и №20 выявил мозаицизм среди исследованных клеток (Таблица 2). Около половины клеток определялись как гетерозиготные по делеции, а остальные – как клетки дикого типа. Однако, использованный метод FISH не позволяет надежно дискриминировать клетки гомозиготные по аллелю дикого типа и клетки-носители одновременно дупликации и аллеля дикого типа. Мозаицизм у двух основателей-носителей одновременно делеции и дупликации имеет сходный характер и может быть объяснен тем, что делеция и дупликация произошли на стадии зиготы в одном из пронуклеусов в ходе репликации ДНК путем межхроматидного обмена [Reams, Roth, 2015]. Интересно, что у обоих основателей были идентифицированы 2,3% и 2,5% метафазных пластинок с трисомией по 6-ой хромосоме соответственно (Таблица 2). Поскольку трисомия наблюдается у двух независимо полученных основателей с делецией и

дупликацией и отсутствует у носителей делеции, то можно предположить, что трисомия произошла под влиянием *de novo* образовавшейся дупликации (CNV).

Интегральная оценка внутриутробного и постнатального развития гомо- и гетерозиготных носителей 1137 т.п.о. делеций и 2374 т.п.о. дупликаций относительно генотипа дикого типа. Определить возможное отрицательное влияние гомо- или гетерозиготного носительства делеций или дупликаций во время внутриутробного развития можно классическим способом оценки расщепления генотипов потомков, которые получены в результате скрещивания гетерозиготных носителей делеций. Если отрицательное влияние будет присутствовать, то в картине расщепления будет отклонение от стандартного Менделевского 1:2:1.

Для получения гомо- и гетерозиготных носителей делеции или дупликации и мышей дикого типа, нами были использованы потомки основателей с делециями №30 и №20 и основателей с дупликацией №1 и №20. От скрещивания гетерозигот линии №30 с делецией было получено 44 мышонка: 14 – дикого типа, 21 – гетерозиготы и 9 – гомозиготы. От скрещивания гетерозигот линии №20 с делецией было получено 104 мышонка: 22 – дикого типа, 60 – гетерозиготы и 22 – гомозиготы. От скрещивания гетерозигот линии №1 с дупликацией было получено 54 мышонка: 14 – дикого типа, 23 – гетерозиготы и 17 – гомозиготы. От скрещивания гетерозигот линии №20 с дупликацией было получено 34 мышонка: 7 – дикого типа, 15 – гетерозиготы и 12 – гомозиготы.

Характер наследования трех генотипов близок к ожидаемому при равенстве их вклада в выживаемость, что свидетельствует об отсутствии признаков неравенства внутриутробного развития эмбрионов исследованных генотипов с делециями и дупликациями ($p > 0,05$, критерий χ^2).

Нами была изучена динамика веса у гетерозиготных по делеции или дупликации мышей относительно их сибсов дикого типа в постнатальный период развития. Для анализа развития гомозиготных и гетерозиготных носителей делеций были получены потомки от скрещивания гетерозиготных пар, имеющих модификацию – для двух линий от основателей №20 и №30. Аналогичные скрещивания были проведены и для линии, полученной от носителя дупликации №1.

В результате скрещивания гетерозиготных пар для линии с делецией №20 было получено 113 потомков, для линии с делецией №30 было получено 79 потомков, а для линии с дупликацией №1 было получено 82 потомка.

В результате, не было установлено отклонений расщепления трех генотипов ($p > 0,05$, критерий χ^2), а также нарушения развития, судя по сходству динамики изменения веса в постнатальном развитии при сравнении гомо-, гетерозиготных мышей с мышами дикого типа для исследованных линий животных (2 линии с делецией и одна линия с дупликацией). В целом, полученные данные свидетельствует о том, что делеции и дупликации гена *Cntnb* у мышей, как в гетеротак и в гомозиготном состоянии, не приводят к нарушениям развития (в рамках исследования жизнеспособности и динамики изменения веса).

Экспрессия генов *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4* у гомо- и гетерозиготных носителей делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. Для оценки молекулярно-генетических последствий полученных перестроек было предпринято измерение уровня экспрессии гена *Cntn6*, а также двух соседних генов – *Chl1* и *Cntn4* у животных, несущих как делеции, так и дупликации. Для этого были получены пометы от гетерозиготных пар по делеции или дупликации и на момент возраста 7 дней от мышат были получены материалы мозга. Затем, для анализа были выбраны особи трех генотипов: гомо-, гетерозиготные животные и животные дикого типа по делеции или дупликации. Для оценки уровня экспрессии был использован мозжечок, в котором *Cntn6*, *Chl1* и *Cntn4* имеют высокие уровни экспрессии. В качестве референсного гена был выбран ген *Hprt*, относительно которого измеряли экспрессию генов *Cntn6*, *Chl1* и *Cntn4*. Анализ экспрессии проведен при помощи цифрового количественного ПЦР (ddPCR, droplet digital PCR).

Было установлено, что у гомозигот по делеции экспрессия гена *Cntn6* отсутствует, а у гетерозиготных носителей делеции уровень экспрессии снижен в два раза по сравнению с мышами дикого типа. Экспрессия соседних генов - *Chl1* и *Cntn4* у гетеро- и гомозиготных носителей делеции находится на таком же уровне что у мышей дикого типа. У гетеро- и гомозиготных мышей по дупликации установлено изменение экспрессии гена *Cntn6* в сравнении с мышами дикого типа, а именно увеличение в 1,5 и 2 раза соответственно. Другими словами, наблюдается дозово-зависимая экспрессия гена *Cntn6*. Также важно, что экспрессия генов *Chl1* и *Cntn4* у гетеро- и гомозиготных носителей дупликации находится на одинаковом уровне с экспрессией у мышей дикого типа (Рисунок 3).

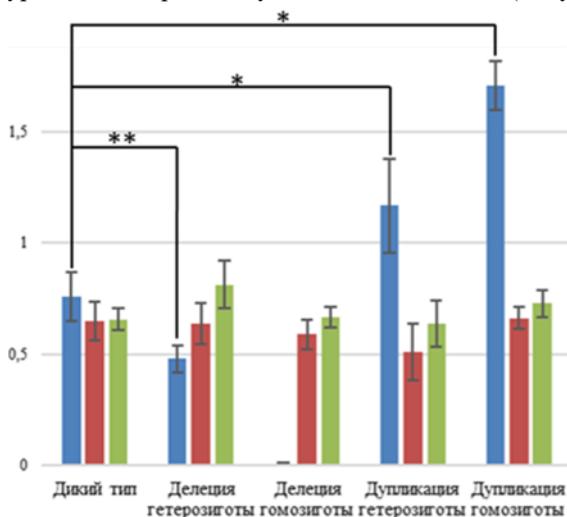


Рисунок 3. Уровень экспрессии генов *Cntn6* (синий цвет), *Cntn4* (красный цвет) и *Chl1* (зеленый цвет), в мозжечке мышей дикого типа, гетеро- и гомозиготных мышей по делеции, гетеро- и гомозиготных мышей по дупликации. Экспрессия была измерена относительно уровня экспрессии гена *Hprt*. На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

* – $p < 0,01$, t-критерий Стьюдента.

** – $p < 0,05$, t-критерий Стьюдента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованный протокол микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот мышей позволил нам получить адресные хромосомные перестройки – делеции, инверсии и дупликации района гена *Cntn6* с эффективностью около 25%, что соответствует другим данным [Birling и др., 2017; Boroviak и др., 2016; Zhang и др., 2015].

Анализ наследования инверсий и делеций предполагает, что перестройки возникают на одноклеточной стадии. Более того, наиболее вероятно возникновение делеции на стадии PN3-PN4 (согласно распространенной номенклатуре [Adenot и др., 1997]) или в ранний период репликации ДНК хроматид перед кариогамией. FISH анализ основателей с делециями установил отсутствие мозаицизма среди исследованных соматических клеток, что дополнительно свидетельствует о возникновении делеции на одноклеточной стадии. Следует отметить, что мозаицизм среди соматических клеток по делециям (и другим хромосомным перестройкам индуцируемых системой CRISPR/Cas) описан в сходных экспериментах [Birling и др., 2017; Boroviak и др., 2016].

Согласно данным FISH анализа соматических клеток четырех гетерозиготных и одного гомозиготного по делеции основателей нами не были идентифицированы клетки со следами транслокации делеционного фрагмента ДНК ни на 6-ой хромосоме, ни на других хромосомах. При проведении Саузерн-блот анализа также не было обнаружено признаков транслокаций. Сходные, но еденичные данные были получены ранее при индукции масштабных делеций с помощью технологии CRISPR/Cas9 [Birling и др., 2017; Hara и др., 2016; Kato и др., 2017; Wang и др., 2015]. Таким образом, впервые проведенный комплексный анализ судьбы делетированных фрагментов ДНК при масштабных хромосомных перестройках указывает на их элиминацию вскоре после возникновения индуцированной CRISPR/Cas9 делеции.

Одновременное обнаружение делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2274 т.п.о. у основателей №1 и №20 позволило нам определить время и стадию их образования благодаря активности системы CRISPR/Cas9. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что образование делеции и дупликации — это одномоментное событие. Наиболее вероятным сценарием, который согласуется с полученными данными, является образование делеции и дупликации путем межхроматидного обмена после возникновения двуцепочечных разрывов, индуцированных системой CRISPR/Cas9 [Birling и др., 2017]. Существует и другая гипотеза, которая предполагает возникновение дупликации путем межхромосомного обмена или реинтеграции удаляемого фрагмента в гомологичную хромосому во время слияния двух пронуклеусов [Boroviak и др., 2016]. Однако, результаты нашего эксперимента противоречат такому механизму возникновения дупликации, поскольку обе копии гена *Cntn6* несут маркер SNP одной из родительских хромосом, а родительские хромосомы в зиготе находятся в разных пронуклеусах.

Секвенирование ПЦР продуктов в новых сайтах, образовавшихся после индуцированных делеций 1137 т.п.о., показало, что среди семи основателей-носителей делеции у трех из них наблюдалась корректная «стыковка» концов ДНК. Более того, у основателя №15 гомозиготного по делеции также наблюдалось корректное соединение концов ДНК, причем в обоих гомологах 6-ой хромосомы. Суммируя эти данные можно констатировать, что использованный протокол CRISPR/Cas9 обеспечил корректное соединение концов ДНК у 50% индуцированных делеций 1137 т.п.о., что предполагает репарацию ДНК по типу гомологичной рекомбинации (HDR). У остальных четырех основателей-носителей делеции наблюдалась потеря нуклеотидов в сайтах «стыковки» ДНК, что указывает на репарацию ДНК по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ).

Данные Саузерн-блот анализа основателей с делециями и их потомков полностью подтверждают данные ПЦР-анализа. При гибридизации меченых зондов к 5'- и 3'-концам рестрикционная картина соответствует ожидаемой. Это позволяет заключить, что все полученные делеции не сопровождались масштабными нецелевыми потерями последовательностей в сайтах стыка слияния двух образовавшихся концов ДНК. Кроме того, проведенный Саузерн-блот анализ позволяет исключить реинтеграцию удаленного фрагмента ДНК вблизи сайтов хнРНК. Полученные результаты отличаются от данных группы Алана Брэдли в которых отмечены незапланированные хромосомные перестройки в модифицируемом локусе [Boroviak и др., 2017], а также высокая частота изменений последовательностей в районе 1-2 т.п.о. от места двунитевых разрывов ДНК [Kosicki и др., 2018]. Мы предполагаем, что такие расхождения могут быть связаны с тем, что в нашем протоколе была использована только одна пара хнРНК для индукции делеций, а в работе с описанными незапланированными перестройками были применены 4 хнРНК для получения делеций [Boroviak и др., 2016].

По данным ПЦР и Саузерн-блот анализа носителей инверсий только один из четырех основателей имеет инверсию с надежно установленными границами. У остальных трех основателей достоверно удалось установить только одну из границ инверсии. Эти данные предполагают, что образование индуцированных CRISPR/Cas9 инверсий сопровождается значительным уровнем нецелевых модификаций генома по сравнению с делециями. Возможно, при инверсиях могут происходить более масштабные укорочения образовавшихся концов ДНК. Сходные результаты были описаны ранее [Boroviak и др., 2017].

Детальный анализ мышей-носителей дупликаций показал, что обе копии дупликации являются полноценными, а сайты-границы дупликации имеют минимальные потери нуклеотидов относительно их размеров. Важно отметить, что полногеномное секвенирование не выявило перестроек в дуплицированном фрагменте и в прилежащих районах, где локализованы соседние гены *Ch11* и *Cntn4*.

Это заключение подкрепляется данными исследования экспрессии гена *Cntn6* у животных-носителей делеции или дупликации, показавших ее зависимость от дозы

гена, а именно, у гомозиготных носителей делеции отсутствовала экспрессия, а у гомозиготных носителей дупликации наблюдалось двукратное увеличение экспрессии гена *Cntnb* по сравнению с животными дикого типа.

Выше отмечалось, что масштабные делеции и дупликации, затрагивающие ген *CNTN6* у человека, приводят к развитию серьезных психоневрологических отклонений и дисморфозов лицевого черепа [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Tassano и др., 2018]. Однако, анализ жизнеспособности и развития гомозиготных и гетерозиготных носителей делеций и дупликаций в эмбриональный и постнатальный периоды не выявил каких-либо отклонений в сравнении с животными дикого типа. Эти данные разительно отличаются от серьезных клинических проявлений хромосомных перестроек, затрагивающих ген *CNTN6* у человека и, как следствие, полученные линии мышей с масштабными хромосомными перестройками гена *Cntnb* не могут служить адекватными моделями психоневрологических патологий человека.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах с использованием микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму 599 зигот, с последующей трансплантацией 256 зигот приемным матерям, наблюдалось рождение 41 мыши. Среди родившихся животных были идентифицированы пять носителей целевой делеции размером 1137 т.п.о., два - делеции и дупликации размером 2374 т.п.о., и четыре - инверсии, вовлекающие единственный ген *Cntnb*. Все 11 основателей-носителей хромосомных перестроек стали основателями линий мышей.

2. На основании анализа наследования адресных делеций 1137 т.п.о. у потомков F1, полученных от скрещивания основателей с мышами дикого типа, было установлено, что шесть делеций сформировались на одноклеточной стадии в одном из пронуклеусов, а в одном случае в обоих родительских пронуклеусах. Эти данные согласуются с результатами FISH анализа метафазных хромосом основателей, показавшем присутствие делеции на одном из гомологов 6-ой хромосомы в исследованных клетках у пяти гетерозиготных носителей и на обоих гомологах у гомозиготного носителя.

3. Впервые показано, что одновременное возникновение делеции и дупликации произошло на одноклеточной стадии в пронуклеусе, маркированном SNP специфичным для линии C57BL/6J, предположительно в результате обмена сестринскими хроматидами. Эти данные подтверждаются результатами анализа наследования делеций и дупликаций у потомков F1, полученных от скрещивания основателей-носителей делеции и дупликации с мышами дикого типа, а также данными полногеномного секвенирования гомозиготных носителей дупликации, показавших, что обе копии гена *Cntnb* специфичны для линии C57BL/6J.

4. Впервые проведен комплексный анализ «судьбы» делетированного фрагмента ДНК размером 1137 т.п.о. у семи основателей-носителей этой делеции. По результатам использования двух методов – Саузерн-блот и FISH не было выявлено

транслокаций делетированного материала размером 1 т.п.о. и более ни на 6-ой хромосоме, ни на других хромосомах. Предполагается, что элиминация делетированного фрагмента ДНК происходит на одноклеточной стадии.

5. Комплексный анализ последовательностей «стыков» делеций и границ дублированных копий, включающий секвенирование ПЦР продуктов, Саузерн-блот анализ и полногеномное секвенирование, не выявил нецелевых масштабных изменений ДНК. Более того, в 50% индуцированных делеций 1137 т.п.о. наблюдалось корректное соединение концов ДНК по механизму HDR (механизм репарации по гомологичному типу), а в остальных случаях выявлены минорные изменения вблизи сайтов хРНК (от единичных замен до потери 100 п.о.), что указывает на репарацию ДНК по механизму NHEJ (механизм негомологичного соединения концов).

6. Установлено, что экспрессия гена *Cntnb* у гомозиготных носителей делеции и дубликации соответствует дозе гена – отсутствует у мутантов по делеции, но повышена вдвое у носителей дубликации по сравнению с мышами дикого типа. Показано, что экспрессия соседних генов *Ch11* и *Cntn4* у гомозиготных носителей делеций и дубликаций не отличается от животных дикого типа. У мутантных носителей делеции или дубликации гена *Cntnb* отсутствуют признаки снижения жизнеспособности в эмбриональном и постнатальном развитии, а также не выявлены дисморфозы и видимые нейральные нарушения, характерные для пациентов-носителей хромосомных нарушений, затрагивающих этот ген.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Pristyazhnyuk I.E., Minina J., Korablev A., Serova I., Fishman V., Gridina M., Rozhdestvensky T.S., Gubar L., Skryabin B.V., Serov O.L. Time origin and structural analysis of the induced CRISPR/cas9 megabase-sized deletions and duplications involving the *Cntnb* gene in mice. Scientific reports 2019, 9 (1), 14161.

2. Korablev AN, Serova IA, Serov OL. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the *Contactin-6* gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. BMC Genetics. 2017;18 (Suppl 1):112.

3. А.Н. Кораблев, И.А. Серова, Б.В. Скрябин. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017, 21 (7):758-763.

4. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016, 20(6):930-944.