

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)

На правах рукописи

Кораблев Алексей Николаевич

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

Генетика - 03.02.07

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
профессор О. Л. Серов

Новосибирск

2020

Оглавление

Список использованных сокращений.....	5
Введение	6
Актуальность	6
Цель исследования	8
Задачи	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	9
Основные положения, выносимые на защиту:.....	9
Личный вклад автора	9
Объем и структура диссертации.....	10
Апробация работы.....	11
Обзор литературы.....	12
Клиническая манифестация CNV в районе 3p26.3 человека.....	12
Характеристика и экспрессия генов <i>Ch11</i> , <i>Cntn6</i> и <i>Cntn4</i> у лабораторных мышей. 18	
Экспериментальное получение масштабных делеций и оценка их фенотипических эффектов у мышей.....	23
Краткая история трансгеноза.....	23
Современные технологии адресной модификации геномов животных.....	25
Получение животных с хромосомными перестройками	27
Потенциальные недостатки технологии CRISPR/Cas9	30
Последствия хромосомных перестроек	33
Материалы и методы.....	35
Выбор целевых сайтов для применения технологии CRISPR/Cas9.....	35
Получение векторов, экспрессирующих хнРНК.	37
Получение компонентов для микроинъекции (мРНК Cas9, хнРНК и ssODN).....	38
Подготовка животных, получение зигот и манипуляции с ними	39
Выделение ДНК и генотипирование животных	41

Приготовление геномной ДНК и Саузерн-блот анализ делеций гена <i>Cntn6</i>	42
Получение культур первичных фибробластов от экспериментальных мышей ...	44
Приготовление и мечение ВАС-ДНК методом ник-трансляции	44
FISH анализ метафазных хромосом первичных фибробластов с использованием меченой ДНК ВАС клонов	45
Полногеномное секвенирование двух гомозиготных носителей дупликации 2274 т.п.о. и характеристика их границ	46
Цифровой количественный ПЦР	47
Криоконсервация сперматозоидов мышей-носителей делеций, дупликация и инверсий гена <i>Cntn6</i>	48
Результаты и обсуждение	49
Получение животных, несущих делеции, дупликации и инверсии района гена <i>Cntn6</i>	49
Наследование индуцированных CRISPR/Cas9 хромосомных перестроек среди потомства F1	55
Саузерн-блот анализ основателей и их потомков F1	59
Характеристика границ 2374 т.п.о. дупликаций и полногеномное секвенирование гомозиготных животных-носителей дупликации	65
SNP анализ основателей-носителей дупликаций.....	66
FISH анализ метафазных хромосом основателей-носителей, индуцированных CRISPR/Cas9 делеций.....	67
Интегральная оценка внутриутробного и постнатального развития гомо- и гетерозиготных носителей делеций 1137 т.п.о. и дупликаций 2374 т.п.о. относительно генотипа дикого типа	73
А. Генотипирование гомо- и гетерозиготных потомков-носителей делеции 1137 т.п.о. и аллеля дикого типа, родившихся от скрещивания гетерозиготных потомков основателей №30 и №20	73
Б. Генотипирование гомо- и гетерозиготных носителей дупликации 2374 т.п.о. и аллелей дикого типа, родившихся от скрещивания гетерозиготных потомков основателей №1 и №20.....	77

В. Динамика массы тела в постнатального период развития гетерозиготных по делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. относительно мышей генотипа дикого типа в постнатальный период развития.....	80
Экспрессия генов <i>Ch11</i> , <i>Cntn6</i> и <i>Cntn4</i> у гомо- и гетерозиготных носителей делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о.	83
Заключение.....	86
Выводы	95
Благодарности.....	97
Список литературы.....	98
Приложение.....	111
Создание криобанка линий мышей, полученных от основателей-носителей хромосомных перестроек и их редеривация	111
Динамика массы тела в постнатального период развития гетерозиготных по делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. относительно мышей генотипа дикого типа в постнатальный период развития	112
Экспрессия генов <i>Ch11</i> , <i>Cntn6</i> , <i>Cntn4</i> у гомо- и гетерозиготных носителей делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о.	116

Список использованных сокращений

CGH - Comparative Genomic Hybridization, сравнительная геномная гибридизация;

FISH – Fluorescence *in situ* Hybridization, Флуоресцентная гибридизация *in situ*;

CNV – copy number variation, вариация числа копий;

SNP - single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм;

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки;

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки;

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами;

Cas9 – CRISPR associated protein 9, CRISPR-ассоциированный белок 9, нуклеаза;

sgRNA – single guide RNA, химерная направляющая РНК, хнРНК;

crRNA – CRISPR RNA, CRISPR РНК;

tracrRNA – trans-activating CRISPR RNA, транс-активирующая CRISPR РНК;

PAM – protospacer adjacent motif, мотив, смежный с протоспейсером;

ssODN – single-stranded oligodeoxynucleotides, одноцепочечный олигонуклеотиды;

ASD – autism spectrum disorders, заболевания аутистического спектра;

F0 – основатель линии мышей, фаундер;

т.п.о. – тысяча пар оснований;

п.о. – пара оснований.

Введение

Актуальность

Известно, что хромосомные перестройки и изменение числа гомологов (моносомия, трисомия) являются причинами наследственных заболеваний у человека, таких как синдром Дауна, синдром Прадера-Вилли и других патологий. До недавнего времени хромосомные перестройки у пациентов выявляли с помощью методов световой микроскопии, что позволяло идентифицировать генетический дефект – первопричину той или иной наследственной патологии. Увеличению разрешающей способности цитогенетического анализа способствовала разработка метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*). 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 микроделеции, микродупликации и транслокации (от 300 т.п.о. до 1000 т.п.о.) [Conlin и др., 2010; Leeuw de и др., 2011]. В качестве яркого 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 (микроделеции, микродупликации, CNV полиморфизм в субтеломерных регионах) [Shaffer и др., 2007]. По разным оценкам, CNV являются причиной не менее 15% тяжелых наследственных патологий [Martin и др. 2015; Stankiewicz, Lupski, 2010]. Более того, до 25% случаев невропатологий и умственной отсталости обусловлено CNV [Iyer, Girirajan, 2015].

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) [Hu и др., 2015; Huang и др., 2017; Kashevarova и др., 2014; Li и др., 2016; Palumbo и др., 2015]. 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 [Shimoda, Watanabe, 2009; Kamei и др., 1998; Maness, Schachner, 2007; Panicker и др., 2003]. Наше внимание привлек ген *CNTN6* (кодирует белок контактин-6), делеции и дупликации которого являются причиной психоневрологических патологий у гетерозиготных носителей: заболеваний аутистического спектра, интеллектуальных расстройств, задержки развития и нередко дисморфизмов лицевой части головы [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Mercati и др., 2017; Tassano и др., 2018]. Сам ген *CNTN6* имеет сложную экзон-интронную организацию, содержит 23 экзона и кодирует белок CNTN6, состоящий из 1028 аминокислотных остатков (<https://genome.ucsc.edu/>, <https://www.uniprot.org/>).

Важно отметить, если CNV гена *CNTN6* приводят к психоневрологическим расстройствам, то точечные мутации этого гена не приводят к клиническим последствиям [Murdoch и др., 2015]. Нокаут гена *Cntn6* у мышей в гомозиготном состоянии проявляется в незначительном снижении моторной координации, но не приводит к столь значительным нейропатологическим последствиям, как у человека [Takeda и др., 2003]. 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 [Bogoviak и др., 2016]. 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 *Cntnb*, 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 *Cntnb* 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 *Cntnb*;
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 *Cntnb* при помощи секвенирования ПЦР продуктов, Саузерн-блот анализа, полногеномного секвенирования и FISH;
5. Исследовать экспрессию генов *Chl1*, *Cntnb* 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 *Cntnb* 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 *Cntnb* 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 *Cntnb* не влияют на жизнеспособность мышей-носителей в эмбриональной и постнатальной стадиях развития и не приводят к появлению дисморфозов и видимых невропатологий.

Личный вклад автора

Дизайн CRISPR/Cas9-экспериментов для получения целевых хромосомных перестроек (делеций, дупликаций и инверсий), микроинъекция компонентов CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот мышей, получение и генотипирование животных-основателей с адресными модификациями и их потомков были проведены мною самостоятельно. Неоценимую помощь в работе с мышами и манипуляциями с эмбрионами на всех этапах оказывала Серова И.А.

Первичные культуры фибробластов от взрослых мышей-основателей и эмбрионов, гетерозиготных по целевым хромосомным перестройкам, были получены совместно с Пристяжнюк И.Е. и Мининой Ю.М. FISH анализ фибробластов, несущих делеции или дупликации гена *Cntnb*, выполнен Пристяжнюк И.Е. и Мининой Ю.М., а очистка ДНК ВАС-клонов, использованных в

качестве зондов для этих экспериментов, проведено мною совместно с Гридиной М.М.

Саузерн-блот анализ геномной ДНК района целевых хромосомных перестроек был проведен группой Скрыбина Б.В. (Мюнстерский университет, Германия), а выделение и очистка геномной ДНК для этого анализа производилась мною самостоятельно.

Выделение и очистка геномной ДНК гомозиготных носителей дупликации гена *Cntn6* было проведено мною, а полногеномное секвенирование этой ДНК проводилось на коммерческой основе компанией GENEWIZ (США). Биоинформационная обработка данных результатов секвенирования проведена Фишманом В.С. при моем участии.

Оценка жизнеспособности и постнатального развития гомо- и гетерозиготных мышей-носителей делеций и дупликаций проведена мной самостоятельно.

Исследование экспрессии при помощи цифрового количественного ПЦР генов *Cntn6*, *Chl1* и *Cntn4* у гомо- и гетерозиготных мышей-носителей делеций и дупликаций был проведен совместно с Гридиной М.М.

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.

Апробация работы

Результаты диссертации были доложены на научных конференциях:

1. III-й Национальный конгресс по регенеративной медицине». Москва, 15-18 ноября 2017;
2. Международная конференция «CRISPR-2018». Новосибирск, 10-14 сентября, 2018;
3. IV-й Национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва, 18-22 ноября 2019.

По материалам работы опубликованы следующие статьи:

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 *Cntn6* 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.

Обзор литературы

Одна из «горячих точек», в которой CNV возникают с повышенной частотой, локализована в прителомерном районе короткого плеча 3-ей хромосомы человека (район 3p26.3). Делеции и дупликации в этом районе генома человека зачастую приводят к развитию разнообразных психоневрологических аномалий и порокам развития лицевого черепа (дисморфизмам). В связи с этим представляется целесообразным рассмотреть подробнее последствия CNV в этом районе.

Клиническая манифестация CNV в районе 3p26.3 человека

Первый случай CNV в этом районе был описан в 1978 году, при котором у ребенка наблюдалась сильная психомоторная заторможенность и имелись множественные дисморфизмы (ассиметричный череп, аномалии развития уха) [Shimoda, Watanabe, 2009; Verjaal, Nef De, 1978]. Характерными особенностями этого синдрома являются задержка психического развития, отставание в физическом развитии, заболевания аутистического спектра (ASD), а также возможны различные дисморфизмы (микроцефалия, гидроцефалия, асимметрия черепа и другие аномалии развития) [Beneck и др., 1984; Schwyzer и др., 1987; Verjaal, Nef De, 1978]. Позднее появились сходные описания клинических случаев психоневрологических патологий и нарушений в развитии у людей с хромосомными перестройками 3p26.3 [Cervantes и др., 2014; Juan-Perez, Farrand, Velakoulis, 2018; Tassano и др., 2018].

В дистальном отделе короткого плеча 3-ей хромосомы у человека локализованы три гена, которые вовлечены в процессы нейрогенеза: *CHL1*, *CNTN4*, *CNTN6* [Maness, Schachner, 2007; Panicker и др., 2003]. Гены *CHL1*, *CNTN6* и *CNTN4* кодируют белки CHL1, CNTN6 и CNTN4 соответственно. Эти белки относятся к суперсемейству иммуноглобулиноподобных белков и имеют сходную структуру: на их N-терминальном конце имеется по 6 иммуноглобулиновых и 4 или 5 доменов фибронектинового III типа, тогда как C-терминальный конец этих белков содержит гликозилфосфатидилинозитол, при помощи которого они закрепляются на поверхности клетки [Maness, Schachner, 2007; Panicker и др., 2003].

Белки CHL1, CNTN6 и CNTN4 участвуют в образовании связей между нейронами и формировании нейрональной сети, важнейшего компонента памяти у

людей. По существу, эти белки осуществляют контроль дендритогенеза и формирования синапсов, роста нейритов и их миелинизации [Shimoda, Watanabe, 2009; Li и др., 2016; Murase, Schuman, 1999; Panicker и др., 2003; Stoeckli, 2004].

CNV (делеции или дупликации) в данном регионе, в зависимости от их размера (от сотен до нескольких тысяч т.п.о.), могут вовлекать как все три гена одновременно, так и каждый из них в отдельности [Hu и др., 2015], что является причиной развития разнообразных психоневрологических расстройств [Hu и др., 2015; Cuoco и др., 2011; Dijkhuizen и др., 2006; Fernandez и др., 2008; Li и др., 2016].

Имеет смысл рассмотреть более подробно случаи CNV в 3p26.3 районе, при которых затрагивается только один ген *CNTN6* [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Tassano и др., 2018]. В работе томских коллег [Kashevarova и др., 2014] были описаны семейные случаи делеций/дупликаций гена, кодирующего белок контактин-6. В одной семье у обоих sibсов (брат и сестра) была обнаружена делеция размером 295,1 т.п.о. Клинические проявления у обоих детей выражались в умственной отсталости и наличии дисморфизмов лицевого черепа. В другой семье у ребенка была обнаружена делеция размером 271,9 т.п.о., а в клинической картине наблюдалось снижение интеллекта, остальные симптомы были отнесены к атипичной форме аутизма. Интересно, что данная делеция ребенку досталась от клинически здорового отца. Еще в одной семье у ребенка с множественными дисморфизмами, задержкой развития и умственной отсталостью была найдена дупликация размером 766,1 т.п.о. Данная дупликация также была найдена у отца мальчика и его бабушки (по отцовской линии), при том, что оба родственника были здоровыми. В данной публикации исследователи делают вывод о том, что при CNV в гене *CNTN6* возможна неполная пенетрантность мутаций или наличие импринтинга [Kashevarova и др., 2014].

В другом исследовании, были описаны два неродственных пациента-мальчика со сходными психоневрологическими синдромами. Согласно данным CGH, у первого пациента была обнаружена делеция размером 427,7 т.п.о., а у второго дупликация размером 941,987 т.п.о., затрагивающие только ген *CNTN6*. Кроме того, у обоих пациентов диагностировали синдром ASD. Интересно, что в обоих случаях эти CNV достались пациентам от клинически здоровых отцов [Tassano и др., 2018].

В масштабном исследовании хромосомных перестроек в районе 3p26.3 среди 3724 пациентов с множественными врожденными аномалиями, пороками сердца, задержкой развития, задержкой интеллектуального развития, расстройствами аутистического спектра, припадками и другими аномалиями были выявлены 14 пациентов с вариациями копий гена *CNTN6* [Hu и др., 2015]. Семь пациентов из 14 имели полную или частичную делецию гена *CNTN6*: пять имели единичную дупликацию района 3p26.3, которая включала ген *CNTN6*, а у двух делеция включала *CHL1/CNTN6* и *CHL1/CNTN6/CNTN4* гены соответственно. У всех этих пациентов размер делеций/дупликаций составлял от 93,95 т.п.о. до 1230 т.п.о. Важно, что каких-либо других CNV у этих пациентов найдено не было. У 13 из 14 пациентов имелись различные клинические манифестации заболеваний, связанные с развитием нервной системы, включая ASD у трех, задержку развития у десяти, припадки у семи, синдром дефицита внимания и гиперактивности у четырех пациентов. У единственного пациента с внутригенной делецией *CNTN6* не было нарушений, связанных с развитием и поведением, но было обнаружено нарушение внутрисердечной проводимости. Кроме того, у двух пациентов была выявлена макроцефалия, у двух других – гидроцефалия или микроцефалия. У шести пациентов наблюдались другие дисморфизмы в виде черепно-лицевых аномалий (асимметрия лица, шизэнцефалия и брахицефалия), аномалий конечностей (синдактилия, клинодактилия и аномалии длины пальцев), проблемы со зрением (нистагм и страбизм). История семьи была изучена для 13 пациентов, за исключением одного пациента, который был усыновлен. У 12 из 13 проанализированных семей в анамнезе имеются различные отклонения и нейropsychические расстройства у старших родственников. В результате авторы отмечают, что *CNTN6* может быть одним из генов-кандидатов при психоневрологических заболеваниях. Однако, встречаются случаи при которых нет связи делеции гена *CNTN6* и психоневрологических синдромов, например, как у пациента с блокадой сердца [Hu и др., 2015].

В другом обширном клиническом исследовании группы пациентов с ASD и потенциальной связью с мутациями/делециями генов *CNTN5* или *CNTN6* были получены следующие результаты: в группе пациентов с ASD (633 пациента) были обнаружены один пациент с делецией гена *CNTN5* и четыре пациента с делецией

гена *CNTN6*. Из имеющейся выборки пациентов с ASD из «Autism Genome Project» (901 пациент) было обнаружено два пациента с делецией гена *CNTN6* и два пациента с дупликацией гена *CNTN6*. В контрольной группе из 8936 пациентов был обнаружен один человек с делецией и трое с дупликацией гена *CNTN5*, а также один человек с делецией и 12 с дупликацией гена *CNTN6*. Интересно, что для 633 человек с ASD исследователям был известен семейный анамнез и доступна ДНК родителей. Все CNV были унаследованы от родителей, а у двоих отцов с делецией гена *CNTN6* была симптоматика ASD. Исследователи также проанализировали доступные им базы данных по пациентам с ASD. Изучив больных из базы данных «Brain & Body Genetic Resource Exchange», которая включала 5891 пациента (из которых у 776 пациентов был ASD), исследователи обнаружили 14 делеций гена *CNTN6*. Шесть из 14 делеций принадлежали группе пациентов с ASD (776 пациентов). В этом случае рассматривались также крупные делеции, но при дополнительном анализе делеций менее 500 т.п.о. было обнаружено еще семь пациентов с делециями среди 5891 человека, шестеро из которых принадлежат к группе больных с ASD. Анализ другой базы данных «Decipher» выявил 47 пациентов с делецией *CNTN6* из 18506 пациентов, но в отличие от предыдущей базы данных, в этой фенотип аутизма указывался редко, однако для нескольких пациентов с делецией гена *CNTN6* все же были отмечены когнитивные нарушения, задержка умственного развития или ASD. При исследовании SNP для генов *CNTN5* и *CNTN6* у 212 пациентов с ASD, а также 217 человек из контрольной группы, была обнаружена более высокая частота индивидуальных вариантов в последовательности гена *CNTN6* у пациентов с ASD. Проанализировав полученные данные, исследователи сделали вывод о том, что CNV в гене *CNTN6* являются риском для развития ASD [Mercati и др., 2017]. Тем не менее, результаты этих двух исследований [Hu и др., 2015; Mercati и др., 2017] не позволяют однозначно связать наличие делеции гена *CNTN6* с развитием ASD.

В исследовании связи CNV и психических расстройств было исследовано 724 пациента с различными психическими нарушениями (тревожный невроз, аффективные расстройства, нарушение пищевого поведения и шизофрения) и 341 человек из контрольной группы. В исследовании было выбрано 353 гена-кандидата, среди которых был и *CNTN6*. В результате проведенного исследования была найдена одна делеция гена *CNTN6* среди группы больных, и одна

делеция среди контрольной группы, что может также свидетельствовать о вариабельности проявлений делеции гена *CNTN6* или об отсутствии связи CNV и психоневрологических патологий [Saus и др., 2010]. В исследовании [Repnikova и др., 2019] при сравнении группы пациентов (20226) и здоровых людей из доступной базы данных также не нашли статистически значимых различий.

Интересно, что в исследовании различных точковых мутаций в гетерозиготном состоянии в генах контактинов и генах контактин-ассоциированных белков не было найдено связи между их наличием и заболеваемостью ASD. Для этого была исследована группа людей с ASD (1030 человек) и группа контроля без психических заболеваний (942 человека). После секвенирования было выявлено 11 потенциально патогенных мутаций в группе больных ASD и 12 потенциально патогенных мутаций в контрольной группе. Такие мутации классифицировались как потенциально патогенные после анализа программами «PolyPhen2» и «SIFT», к этим же мутациям относились мутации сайта сплайсинга и нонсенс-мутации. В группе пациентов с ASD из 11 мутаций в гене *CNTN6* шесть мутаций были материнского происхождения, четыре отцовского, а одна мутация *de novo*. В целом, авторы делают вывод об отсутствии связи между мутациями в гене *CNTN6* и развитием ASD [Murdoch и др., 2015].

При изучении связи синдрома Туретта с CNV, при анализе 2434 пациентов с заболеванием и 4093 человек из контрольной группы, была обнаружена связь между делециями и дупликациями гена *CNTN6* и развитием заболевания [Huang и др., 2017].

Кроме анализа выборок пациентов и целенаправленного поиска связи *CNTN6* с заболеваниями существует ряд клинических работ, которые показывают связь CNV гена *CNTN6* и развития нейropsychических патологий [Cervantes и др., 2014; Juan-Perez, Farrand, Velakoulis, 2018; Weehi Te и др., 2014].

Современные клеточные технологии открывают перспективу исследования молекулярных механизмов эффектов CNV и их связи с развитием психоневрологических патологий. С этой целью [Gridina и др., 2018] получили индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов, выделенных из биопсийного материала от пациентов-носителей дупликаций *CNTN6*, описанных выше [Kashevarova и др., 2014]. Более того, используя протокол

индуцированной дифференцировки ИПСК путем экзогенной экспрессии гена *Ngn2* удалось получить *in vitro* корковые нейроны. Далее было установлено, что в нейронах, имеющих дупликацию гена *CNTN6*, экспрессия дуплицированного аллеля по данным цифрового количественного ПЦР составляет всего 2-10% относительно аллеля дикого типа [Gridina и др., 2018]. Именно этим объясняется сходство клинических проявлений психоневрологических аномалий у пациентов-носителей масштабных делеций и дупликаций гена *CNTN6*. Кроме того, были получены данные о том, что дупликация носителю передалась от здорового отца, от которого также были получены первичные культуры, ИПСК и нейроны. Интересно то, что у отца происходит нормальная экспрессия всех трех копий *CNTN6* в нейронах, полученных *in vitro* (Gridina М.М., неопубликованные данные). Однако, механизмы данного явления не ясны, а их изучение является актуальным для понимания причин возникновения заболеваний, вызванных CNV.

Анализ аминокислотного состава контактинов выявил большое сходство между ними, которое составляет 40-60%. Наибольший уровень отличий наблюдается в 4-ом и 5-ом иммуноглобулиновых доменах. Гены контактинов имеют сложную экзон-интронную организацию и достигают больших размеров (до 1000 т.п.о.). Изучение структуры контактинов показало, что важной особенностью белков этого семейства является то, что четыре иммуноглобулиновых домена образуют конформацию в виде подковы. Эта особенность позволяет контактинам связываться с RPTP (receptor protein tyrosine phosphatases), а также с другими молекулами [Bouyain, Watkins, 2010].

Изложенные выше факты о клинических исследованиях связи гена *CNTN6* с ASD дают противоречивые сведения – одни из них устанавливают связь CNV района 3p26.3 с заболеваниями [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Tassano и др., 2018], а другие, напротив, опровергают [Murdoch и др., 2015; Repnikova и др., 2019]. Стоит отметить, что большая часть хромосомных перестроек для данного района имеет связь с такими заболеваниями, как ASD и другими психоневрологическими патологиями [Hu и др., 2015; Huang и др., 2017; Kashevarova и др., 2014; Mercati и др., 2017; Tassano и др., 2018]. Важно отметить, что точечные мутации в гене *CNTN6* не приводят к клиническим последствиям у человека [Murdoch и др., 2015].

Характеристика и экспрессия генов *Ch11*, *Cntn6* и *Cntn4*

у лабораторных мышей.

Как отмечалось выше, контактин-6 (Contactin-6, CNTN6, NB-3) является частью семейства контактиновых иммуноглобулин-подобных молекул клеточной адгезии (IgCAMs) и экспрессируется в нервной системе. У человека ген *CNTN6* локализован в дистальной части короткого плеча 3-ей хромосомы (3p26.3). Показано, что самый высокий уровень экспрессии *CNTN6* в мозге у взрослого человека наблюдается в мозжечке, таламусе и субталамических ядрах, а самый низкий в мозолистом теле, хвостатом ядре и спинном мозге [Kamei и др., 1998].

В период эмбриогенеза у мыши наблюдается низкий уровень экспрессии *контактина-6* во всем мозге. Данная ситуация изменяется в раннем постнатальном периоде – экспрессия *Cntn6* резко повышается в коре головного мозга до высокого уровня, достигая своего максимума к седьмому дню постнатального периода, именно к тому времени, когда активно происходит формирование и созревание синапсов. Затем происходит незначительное снижение экспрессии, которая сохраняется в течение всей жизни [Lee и др., 2000].

В мозжечке мышей экспрессия несколько отличается, в ранний постнатальный период она низкая, а ее увеличение происходит постепенно к трехмесячному возрасту. В целом, уровень мРНК *Cntn6* у 3-6 месячных мышей в девять раз выше, чем у мышат в первый день постнатального развития, что может свидетельствовать об очень важной роли *контактина-6* в мозжечке у взрослых мышей [Lee и др., 2000].

В неонатальном периоде наблюдается четкая экспрессия *контактина-6* в отдельных популяциях нейронов по всему головному мозгу мышей. В переднем мозге экспрессия наблюдается в нейронах обонятельных луковиц, во II, III, V слоях неокортекса, в обонятельной коре, гиппокампе и в базально-латеральном комплексе миндалевидного тела. Ген *Cntn6* также интенсивно экспрессируется в переднем, вентролатеральном, медиальном и латеральном коленчатых ядрах таламуса, а также в паравентрикулярном и вентральном ядрах гипоталамуса. Высокая экспрессия наблюдается в красном ядре, в нижнем двухолмии среднего мозга, в голубом пятне моста, в ядре среднемозгового пути тройничного нерва, в

двигательном ядре блуждающего нерва, в ядре подъязычного нерва, в нижней оливе, в спинномозговом ядре тройничного нерва. В мозжечке экспрессия наблюдается в клетках Пуркинье и в нейронах глубоких ядер мозжечка. На седьмой день постнатального развития картина экспрессии *Cntnb* не меняется, за исключением увеличения в клетках Пуркинье и голубом пятне, в сравнении с уровнем экспрессии на первый день постнатального периода [Lee и др., 2000].

Исследования экспрессии *Cntnb* с использованием мышей, несущих репортерный ген *LacZ*, встроенный во второй экзон *Cntnb* показывают высокую экспрессию в обонятельных луковицах, антеродорзальном ядре таламуса, нижнем двухолмии, V слое коры и мозжечке. В мозжечке экспрессия *Cntnb* изменяется в ходе развития: на седьмой день постнатального развития *Cntnb* выявляется в клетках Пуркинье десятой долики, а у взрослых животных *Cntnb* выявляется в десятой долике и появляется в каудальной части девятой долики в клетках Пуркинье. По мере взросления *Cntnb* выявляется во внутренних гранулярных клетках десятой долики и каудальной части девятой долики у шестимесячных мышей, тогда как в гранулярных клетках в десятой и каудальной половине девятой долек экспрессия не высокая. Это указывает на то, что *Cntnb* высоко экспрессируется во внутренних гранулярных клетках первой долики и до роstralной половины девятой долики, но только в части клеток Пуркинье в мозжечке взрослой мыши. Таким образом, экспрессия *Cntnb* показала явное различие между роstralными и каудальными долями, имеющими границу в девятой доле [Takeda и др., 2003]. Также было установлено, что *Cntnb* экспрессируется в гиппокампе с первого по седьмой дни постнатального развития [Mi и др., 2018]. Схожая картина в экспрессии выявляется и при иммуногистохимическом окрашивании мозжечка крысы на NB-3: *Cntnb* экспрессируется в 1-8 долях мозжечка в гранулярных клетках, при этом в девятой и десятой долях экспрессия значительно слабее. В клетках Пуркинье ситуация противоположная – в 1-8 долях нет экспрессии, а в девятой и десятой долях есть [Takeda и др., 2003].

С пятого дня постнатального развития в третьей долике мозжечка была обнаружена экспрессия *Cntnb* в развивающемся молекулярном и в гранулярном слоях, но отсутствовала в клетках Пуркинье. Также на 15-й день постнатального развития была зафиксирована экспрессия *Cntnb* в молекулярном слое вдоль

дендритов и возле дендритов клеток Пуркинье. При рассмотрении экспрессии *Cntnb* в мозжечке было замечено, что нет перекрытия между зонами экспрессии *контактина-б* и *контактина-2* в зоне под глубоким слоем гранулярных клеток. Однако, зона экспрессии гена *L1* (*L1 cell adhesion molecule*, данный белок тесно связан с семейством контактиновых белков) перекрывается как с одной, так и с другой зонами экспрессии контактинов [Sakurai и др., 2009].

Организация мозжечка и его цитоархитектоника не имеют различий между *Cntnb*(-/-) и *Cntnb*(+/+) мышами. Ультраструктурный анализ молекулярного слоя десятой дольки не выявил отклонений в развитии клеток Пуркинье [Takeda и др., 2003]. С другой стороны, у нокаутных мышей по гену *контактина-б* наблюдается расширение зоны, в которой экспрессируется *L1*. У мутантных мышей по гену *Cntnb* отмечена повышенная миграция клеток во внутренний гранулярный слой в мозжечке, в то же время транспортер глутамата VGLUT1 (*Vesicular glutamate transporter 1*) идентифицирован в клетках Пуркинье, но до 15-го дня постнатального развития не достигал краев их дендритов, в отличие от мышей дикого типа. Показано, что плотность рецепторов mGlu1 (*metabotropic glutamate receptor 1*) у нокаутных мышей была снижена на 18%, при повышении количества каспаза-3-позитивных клеток во внутреннем гранулярном слое, по сравнению с мышами дикого типа. Эти же авторы показали, что дефицит *контактина-б* вызывает снижение плотности синапсов между параллельными волокнами и клетками Пуркинье, увеличивается гибель гранулярных клеток в период развития мозжечка [Takeda и др., 2003]. Снижение количества образованных синапсов может быть связано с увеличением количества незрелых гранулярных клеток внутреннего гранулярного слоя, в которых обнаруживалась экспрессия *L1* [Sakurai и др., 2009].

Важная роль *контактина-б* в процессе развития нейритов была показана в экспериментах *in vitro*. Так, при сокультивировании нейронов крысы с трансформированными клетками НЕК293, которые экспрессировали растворимую форму белка *контактина-б*, было установлено увеличение длины нейритов на 4-8 день культивирования, а на шестой день значительно увеличилось общее число отростков [Mercati и др., 2013]. В независимом исследовании было показано, что растворимая форма NB-3 стимулирует рост нейритов кортикальных нейронов у крыс [Takeda и др., 2003]. Более того, в экспериментах на крысах было установлено, что

Cntnb выступает в качестве неканонического лиганда NOTCH1, принимая участие в формировании олигодендроцитов путем активации NOTCH1 через свободный notch-внутриклеточный домен (notch intracellular domain) с последующей транслокацией в ядро [Cui и др., 2004].

В целом, физиологические эксперименты на нокаутных *Cntnb*(-/-) мышах показали, что гомозиготные мутанты жизнеспособны, фертильны, и мало чем отличаются по этим параметрам от сибсов дикого типа. Более того, не было найдено различий в поведении, массе животных и размерах головного мозга, а отличия между мышами дикого типа и нокаутами проявлялись в том, что гомозиготные нокаутные мыши по *Cntnb* имели ослабленную моторную координацию [Takeda и др., 2003]. Позднее было показано, что гомозиготные *Cntnb*(-/-) мыши имеют нарушение пространственной памяти в водном лабиринте Морриса [Mu и др., 2018].

Выше отмечалось, что близкие по структуре к *Cntnb* гены *Chl1* и *Cntn4* находятся в одной синтенной группе у мышей, потому имеет смысл рассмотреть их экспрессию в эмбриональный и постнатальный периоды развития. Ген *Chl1* у мыши экспрессируется в головном мозге и периферических нервах. По данным иммуно-блот анализа, в переднем мозге выявляется две основные формы Chl1 – 185 кДа и 165 кДа и одна малая форма 125 кДа [Hillenbrand и др., 1999]. Белок Chl1 не детектируется на 11-й день эмбрионального развития, с 13-го дня детектируется слабо, но наибольший уровень экспрессии белка обнаруживается в период с 18-го для эмбрионального развития по седьмой дни постнатального развития. Далее, на 15-й день постнатального развития белок Chl1 определяется на низком уровне и полностью исчезает к 4-ой неделе. Chl1 определяется во многих типах нейронов (гиппокампальные, кортикальные, среднего мозга и спинного мозга), предшественниках олигодендроцитов, астроцитах и Шванновских клетках. Матричная РНК *Chl1* хорошо выявляется в пирамидальных клетках и не выявляется в гранулярных клетках гиппокампа, но в зубчатой извилине гиппокампа мРНК *Chl1* определяется на низком уровне [Hillenbrand и др., 1999].

Важно отметить, что гомозиготные нокаутные мыши по гену *Chl1* не имели отличий в строении головного мозга на уровне световой микроскопии в сравнении с мышами дикого типа. Изучение формирования синапсов у *Chl1*-дефицитных мышей показало нарушение организации мшистых волокон гиппокампа [Hillenbrand и др.,

1999]. Кроме этого, синапсы обонятельных нейронов также оканчивались отлично от таковых у мышей дикого типа: если у мышей дикого типа аксоны оканчивались на одном из клубочков обонятельной луковицы, то у нокаутных мышей они могли оканчиваться на двух клубочках или проходить через них и оканчиваться на внешнем плексиформном слое. По мнению исследователей, это свидетельствует о нарушении организации роста аксонов при отсутствии белка *Ch11*. При физиологическом тестировании нокаутные мыши по гену *Ch11* проявляли отклонения в тесте открытого поля, такие мыши больше времени находились в центре поля, что может указывать на снижение волнения и исследовательской активности [Hillenbrand и др., 1999].

Ген *Cntn4* экспрессируется у взрослых мышей в клубочковом слое, слое обонятельного нерва и обонятельной луковицы. Кроме того, было показано, что у гомозиготных мышей по нокауту этого гена, наблюдается абберрантная проекция аксонов чувствительных обонятельных нейронов на несколько клубочков. Это указывает на то, что белок *Cntn4* необходим для правильного формирования аксонов при развитии обонятельной луковицы [Kaneko-Goto и др., 2008]. Физиологическое тестирование нокаутных мышей по гену *Cntn4* не выявило расстройств поведения, которые наблюдаются при заболеваниях аутистического спектра у людей [Molenhuis и др., 2016].

В заключении, можно сделать вывод, что нокаут по гену *Cntn6* у мышей не приводит к развитию нарушений, характерных для носителей масштабных делеций или дупликаций гена *CNTN6* у человека. В тоже время, уместно подчеркнуть, точечные мутаций в гене *CNTN6* у человека скорее имеют сходство с эффектом нокаутных мутаций у мышей. Из этого следует, что масштабные делеции и дупликации гена *CNTN6* у человека вызывают более серьезные нарушения нейрогенеза, чем точечные мутации этого гена. Весомым аргументом в пользу этой точки зрения является то, что у человека не описаны гомозиготные носители масштабных делеций, инверсий и дупликаций гена *CNTN6*, а описанные клинические проявления психоневрологических отклонений у гетерозиготных носителей указывают на доминантный характер таких мутаций.

Экспериментальное получение масштабных делеций и оценка их фенотипических эффектов у мышей

Краткая история трансгенеза

На сегодняшний день существует две разные стратегии получения трансгенных мышей, которые были разработаны в 80-е годы: первая – микроинъекция рекомбинантной ДНК в пронуклеусы зигот и вторая – трансформация рекомбинантной ДНК культивируемых эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с последующей их микроинъекцией в полость реципиентных бластоцист и получение химерных животных [Hogan B., Beddington R., Costantini F., 1994]. Обе эти стратегии связаны с разнообразными эмбриологическими манипуляциями и имеют принципиальные различия, но при этом основаны на общих базовых методах. Для обеих технологий необходимо получение доимплантационных эмбрионов, зигот или бластоцист. Как правило, эмбрионы получают от суперовулированных самок, покрытых фертильными самцами. Затем, проводят инъекцию эмбрионов, после чего их трансплантируют заранее подготовленным псевдобеременным самкам, которые были покрыты вазектомированными самцами [Hogan B., Beddington R., Costantini F., 1994]. Интересно, что для развития беременности у мышей, (как и у ряда других грызунов) кроме наличия эструса и овуляции, самкам необходим факт покрытия самцом и образование вагинальной пробки. Сочетание этих факторов приводит к стимуляции клеток гипоталамуса и гиппокампа. В конечном итоге, вся цепь событий приводит к нейроэндокринному ответу, который является необходимым для успешной имплантации эмбрионов [Yang и др., 2009]. В результате трансплантации зигот или бластоцист, на свет могут появиться трансгенные или химерные мышата соответственно. Затем, от родившихся мышей можно получать трансгенное потомство [Hogan B., Beddington R., Costantini F., 1994].

Схема первой технологии состоит из нескольких последовательных этапов. На первом этапе получают зиготы, которые затем, кратковременно культивируют до стадии появления крупных пронуклеусов. Далее, производят микроинъекцию раствора экзогенной ДНК в мужской пронуклеус, так как он крупнее женского, а введенная ДНК может интегрироваться в случайное место в реципиентном геноме

[Gordon и др., 1980; Nakanishi и др., 2002; Wagner и др., 1981]. Данный метод имеет ряд преимуществ, поскольку он относительно прост, но при этом не позволяет производить модификации генома в целевом месте. Кроме того, зачастую рекомбинантная ДНК встраивается в реципиентный геном в виде многих копий [Bishop, Smith, 1989; Hamada и др., 1993; Rohan, King, Frels, 1990; Wilkie, Palmiter, 1987].

Второй метод получения генетически-модифицированных мышей существенно отличается от метода пронуклеарной микроинъекции, но имеет значительное с ним сходство, основанное на общих знаниях о раннем развитии мыши. Эмбрион мыши на стадии бластоцисты состоит из трофэктодермы и внутренней клеточной массы (ВКМ), из первой будут развиваться только плацента и внезародышевые ткани, тогда как из второй – все типы соматических клеток и половые клетки definitivoного организма. Эванс и Кауфман первыми разработали способ длительного культивирования клеток ВКМ *in vitro* (ЭСК), которые при этом сохраняют свои плюрипотентные свойства [Evans, Kaufman, 1981]. После этого были получены ЭСК мыши с целевыми модификациями в геноме. Для этого генетические конструкции, имеющие гомологичные плечи к целевому месту в геноме, а также содержащие ген антибиотикорезистентности в качестве селективного маркера, были доставлены в ЭСК путем электропорации. После селекции клеток, корректность целевой модификации устанавливалась при помощи Саузерн-блот анализа [Lin, Sperle, Sternberg, 1985; Mansour, Thomas, Sarcocchi, 1988]. Далее, ЭСК с целевыми перестройками в геноме инъецируются в полость реципиентных бластоцист, где они смешиваются с клетками ВКМ, в результате чего развивается химерный эмбрион и затем рождается химерное животное [Bradley и др., 1984; Gossler и др., 1986]. Более того, фертильные взрослые химерные животные способны продуцировать два типа гамет, одни генотипа геном-модифицированных ЭСК, другие – генотипа реципиентной бластоцисты, в результате чего от химерного самца рождаются как мыши с целевыми модификациями генома, так и дикого типа. Данная технология на протяжении долгого времени являлась единственным способом получения мышей с различными целевыми модификациями в геноме мыши.

Позднее произошла «эволюция» методов «классического» трансгеноза благодаря разработке технологий геномного редактирования, что привело к новым возможностям в области целевых модификаций генома животных.

Современные технологии адресной модификации геномов животных

В настоящее время трансгенез претерпел существенные изменения благодаря разработке систем направленного редактирования геномов, таких как ZFN [Carbery и др., 2010], TALEN [Sung и др., 2013] и CRISPR/Cas [Yang, Wang, Jaenisch, 2014]. Наиболее широкое применение нашла система CRISPR/Cas из-за своей высокой эффективности и простоты использования.

Система CRISPR/Cas была обнаружена у некоторых бактерий и архей и является основой их адаптивного иммунитета против вирусов и плазмид. Система имеет общие принципы организации у бактерий и архей и состоит из коротких палиндромных повторов ДНК, регулярно расположенных группами (CRISPR), и ассоциированных с ними белков семейства Cas. Принцип функционирования системы состоит в том, что при помощи белков Cas последовательности вирусной ДНК могут вноситься в локус CRISPR. Далее, при транскрипции региона CRISPR образуется длинная РНК, которая процессируется некоторыми белками Cas с образованием множества коротких РНК. Эти РНК образуют рибонуклеопротеидные комплексы с другими белками Cas, которые приобретают свойства нуклеаз направленного действия. За счет того, что участок РНК комплементарен геному вируса, комплекс РНК-Cas может производить направленную деградацию вирусной РНК или ДНК. Таким образом, система CRISPR/Cas может вносить информацию в геном хозяина о последовательности вирусных геномов, которая затем может быть использована для последующей защиты от вирусов [Horvath, Barrangou, 2010].

После расшифровки механизмов функционирования системы CRISPR/Cas бактерий и архей, у ряда исследователей возникла идея ее адаптации для применения в области генетической инженерии. В результате, была разработана технология геномного редактирования, основанная на системе CRISPR/Cas из бактерии *Streptococcus pyogenes*. Для этого у бактерии были позаимствованы белок spCas9, crRNA и tracrRNA. Все три компонента образуют рибонуклеопротеидный комплекс,

который является направляемой ДНК-нуклеазой. Кроме того, для удобства применения системы, crRNA и tracrRNA были объединены в одну общую химерную направляющую РНК (хнРНК, gRNA – guide RNA) [Jinek и др., 2012].

Принцип работы наиболее популярной системы CRISPR/Cas из бактерии *Streptococcus pyogenes* для геномного редактирования заключается в том, что комплекс spCas9 и направляющей РНК может узнавать 23-нуклеотидные последовательности вида NGG(N)₂₀ в геноме, за счет того, что (N)₂₀ (или протоспейсер) комплементарен вариативной части хнРНК, а NGG (PAM, protospacer adjacent motif – мотив, прилегающий к протоспейсеру) необходим для узнавания белком spCas9. После того, как весь комплекс связывается с целевым участком в геноме, происходит внесение двуцепочечного разрыва на расстоянии 3-4 п.о. от PAM внутри протоспейсера с образованием «тупых» концов ДНК [Jinek и др., 2012].

Позднее, для геномного редактирования были разработаны альтернативные варианты системы CRISPR/Cas, которые были заимствованы от других бактерий и архей, например nmCas9-нуклеаза из *Neisseria meningitidis* [Hou и др., 2013], stCas9-нуклеаза из *Streptococcus thermophiles* [Müller и др., 2016], AsCpf1 и LbCpf1 нуклеазы из *Acidaminococcus sp.* и *Lachnospiraceae bacterium* соответственно [Zetsche и др., 2015]. Их отличия заключаются в длине и последовательности нуклеотидов PAM, длине протоспейсера, места внесения двуцепочечного разрыва и типе оставляемых концов («липкие» или «тупые») [Hou и др., 2013; Müller и др., 2016; Zetsche и др., 2015]. Более того, на основе нуклеаз, при помощи внесения мутаций в их нуклеазные домены, были разработаны никазы, вносящие одноцепочечные разрывы [Ran и др., 2013].

В итоге, после адаптации системы CRISPR/Cas для геномного редактирования стало широко возможным получение мышей с целевыми модификациями в геноме не только при помощи технологии химер, но и при инъекции в зиготу [Wang и др., 2013]. На данный момент при помощи системы CRISPR/Cas с высокой точностью и эффективностью можно получать животных с нокаутами по различным генам [Wang и др., 2013], с точечными заменами нуклеотидов в геноме [Jin и др., 2019], с инсерциями трансгена в целевой участок генома [Chu и др., 2016], гуманизированных животных [Yoshimi и др., 2016], а также животных с различными хромосомными перестройками [Boroviak и др., 2016; Kraft и др., 2015].

Получение животных с хромосомными перестройками

Как отмечалось выше, первые экспериментальные подходы по целенаправленному получению хромосомных перестроек были основаны на использовании метода получения химер с применением технологии Cre-loxP-опосредованной рекомбинации. Данная технология основана на направленной встройке (инсерции) двух loxP-сайтов в целевые районы одной хромосомы или двух разных хромосом в ЭСК. Далее, при трансфекции плазмиды, экспрессирующей Cre-рекомбиназу можно индуцировать рекомбинацию между loxP-сайтами и получить клетки с хромосомными перестройками [Ramirez-Solis, Liu, Bradley, 1995; Yu, Bradley, 2001]. В результате, в зависимости от направления loxP-сайтов возможно получение делеций, инверсий и дупликаций в целевом районе хромосомы. Затем, клетки, несущие хромосомные перестройки инъецируют в полость бластоцисты для получения химерных мышей. [Ramirez-Solis, Liu, Bradley, 1995; Yu, Bradley, 2001]. Однако, данная технология является высокотехнологичной, требует много времени и большого количества методов для подтверждения перестроек [Bogoviak и др., 2016].

Применяя современные технологии редактирования генома, такие как CRISPR/Cas, можно получать мышей с хромосомными перестройками, используя два пути – модификация генома ЭСК и последующее получение химер или микроинъекция компонентов CRISPR/Cas системы в зиготу (в цитоплазму или пронуклеус).

Для получения адресной модификации генома ЭСК мыши разработан протокол CRISVar (CRISPR/Cas-induced structural variants), при помощи которого возможно получить животное с адресной хромосомной перестройкой (делецией, инверсией или дупликацией) за 10 недель, благодаря применению системы CRISPR/Cas. Используя данный протокол были получены перестройки размером 1,1 т.п.о., 3,7 т.п.о., 12,6 т.п.о., 353 т.п.о. и 1600 т.п.о. в районе генов *H2afy*, *Vmp2*, *Ihh*, *Laf4* и *Epha4* [Kraft и др., 2015]. Позднее, этот подход был успешно применен для получения животных с различными перестройками, а именно делеций размером 1670 т.п.о., инверсий размером 1060 т.п.о. и [Luriáñez и др., 2015] и дупликаций размером от 400 т.п.о. до 1600 т.п.о. [Franke и др., 2016].

Значительный прогресс в получении целевых делеций, в том числе и хромосомных перестроек был достигнут благодаря применению микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas в цитоплазму или в пронуклеусы зигот. Такая модификация метода основана на микроинъекции раствора, содержащего мРНК или белок Cas9, хнРНК (или crRNA+tracrRNA) и матрицу для гомологичной рекомбинации в виде одностороннего олигонуклеотида (ssODN) или плазмиды [Boroviak и др., 2016; Fujii и др., 2013; Kato и др., 2017].

При таком дизайне, резко возросла эффективность создания животных с разнообразными целевыми модификациями генома в широком диапазоне – от единичных нуклеотидных делеций до масштабных хромосомных делеций: 381 п.о. [Mashiko и др., 2013], 10 т.п.о. [Fujii и др., 2013], 65 т.п.о. [Zhang и др., 2015], 95 т.п.о. [Wang и др., 2015], 500 т.п.о. [Hara и др., 2016], 2200 т.п.о. [Yang и др., 2016]. Интересно, что предположительно существует предел размера целевых масштабных делеций. Так по данным [Brandl и др., 2015], авторам удалось получить делеции размером 3,2 т.п.о. и 9,3 т.п.о., но не удалось создать делецию 30 т.п.о., что по их мнению может быть связано с пространственной организацией хроматина.

Оценка эффективности применения системы CRISPR/Cas, как инструмента хромосомной инженерии у мышей, была проведена группой Алана Брэдли. Используя метод микроинъекции в зиготы компонентов CRISPR/Cas и ssODN, авторам удалось получить делеции размером 9,5 т.п.о., 65 т.п.о., 155 т.п.о., 545 т.п.о. и 1150 т.п.о. Для увеличения эффективности возникновения делеций, авторы использовали четыре хнРНК – по две на каждую границу удаляемого фрагмента ДНК и достигли эффективности хромосомных перестроек (делеций, инверсий и дупликаций) уровня 12-18% [Boroviak и др., 2016]. Позднее, используя сходный подход были получены мыши с делециями размером 3000 т.п.о., моделирующие эффекты делеции 22q11.2 человека [Saito и др., 2020].

В экспериментах, направленных на моделирование болезни Дауна на грызунах (мыши и крысы), была показана возможность получения крупных хромосомных перестроек (делеций, дупликаций и инверсий) от 16,8 т.п.о. до 24500 т.п.о. Как отмечалось выше, получение очень крупных хромосомных перестроек у мышей, с использованием технологии CRISPR/Cas, не всегда

сопровождаются успехом, предположительно из-за сопровождающих их летальных эффектов [Birling и др., 2017].

В другой работе была показана возможность получения мышей с хромосомными перестройками (делециями и инверсиями, но не дупликациями) размером 2000 и 5000 т.п.о при помощи микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas в зиготы. Был отмечен интересный факт того, что частота возникновения делеций размером 5000 т.п.о. была выше, чем для делеций размером 20000 т.п.о. [Kato и др., 2017].

Таким образом, наиболее эффективным подходом получения целевых хромосомных перестроек у мышей являются микроинъекции компонентов CRISPR/Cas в цитоплазму или пронуклеусы зигот. Кроме того, не менее важно, данный метод является наиболее эффективным с точки зрения, как финансовых, так и временных затрат.

Потенциальные недостатки технологии CRISPR/Cas9

Несмотря на то, что технология CRISPR/Cas стала эффективным инструментом для адресной модификации генома, она имеет и некоторые недостатки. Одним из таких недостатков являются изменения нуклеотидных последовательностей в нецелевых сайтах (off-target эффекты). Это происходит вследствие связывания комплекса хнРНК-Cas9 с нецелевыми участками генома (из-за несоблюдения Уотсон-Криковских пар), причем их уровень варьирует в широких пределах – от низкого [Yuег и др., 2018] до высокого [Fu и др., 2013].

Другим недостатком системы CRISPR/Cas являются незапланированные изменения нуклеотидной последовательности в целевом сайте или on-target эффекты. В подавляющем количестве экспериментов в области генетической инженерии, система CRISPR/Cas применяется с одной целью – внесение двуцепочечного разрыва в геномной ДНК. Далее, образовавшийся двунитевой разрыв ДНК может устраняться системами репарации клетки, которые, упрощенно, можно сократить до двух разных типов. Первый, и наиболее часто используемый – это негомологичное соединение концов (Non-Homologous End Joining, NHEJ), при котором могут происходить укорочения свободных концов ДНК и возникают делеции или инсерции. Второй – это репарация по типу гомологичной рекомбинации (homologous directed repair; HDR), при которой системы репарации клетки используют гомологичный район ДНК в качестве матрицы для «точного» восстановления разрыва. В случае применения системы CRISPR/Cas незапланированные on-target эффекты можно связать с типом репарации NHEJ или некорректной работой механизма HDR.

Так, например, в работах, проведенных на культурах клеток было показано, что возможно укорочение образовавшихся концов ДНК от нескольких нуклеотидов до нескольких т.п.о. [Kosicki, Tomberg, Bradley, 2018] и даже 1000 т.п.о. [Cullot и др., 2019].

По другим данным, полученным из эксперимента по микроинъекции системы CRISPR/Cas в зиготы мышей, у 57 из 127 основателей были обнаружены делеции более 100 п.о., а наибольшая делеция была размером 2,3 т.п.о. вблизи сайтов хнРНК [Adikusuma и др., 2018]. Кроме того, в нашей лаборатории при реализации одного из проектов был зарегистрирован случай делеции 290 т.п.о., возникшей после одного

двухцепочечного разрыва, образованного системой CRISPR/Cas в зиготах у одного из 113 животных [Korablev и др., 2020]. Важно отметить, если возникают укорочения образовавшихся концов, то, как правило, происходит и удаление сайтов для праймеров, используемых для генотипирования, вследствие чего достаточно сложно выявлять подобные изменения без применения дорогостоящих методов, как, например, полногеномного секвенирования.

Как уже было отмечено выше, применение системы CRISPR/Cas для получения масштабных делеций зачастую сопровождается возникновением инверсий и реже дупликаций. Данная ситуация связана с тем, что в дизайне этих экспериментов для получения делеции система CRISPR/Cas применяется для внесения двух двухцепочечных разрывов. Дальнейшие события репарации двухцепочечных разрывов могут привести к образованию не только целевой делеции, но и инверсии или дупликации [Boroviak и др., 2017; Nara и др., 2016; Zhang и др., 2015]. Более того, если в эксперименте необходимо получение не только делеций, а дупликаций и инверсий, то это является преимуществом данного подхода.

Другой проблемой метода является мозаицизм мышей-основателей, которые были получены после микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas в зиготы. Мозаицизм осложняется тем, что целевая модификация будет присутствовать только в части клеток животного, включая гаметы. Таким образом, мозаики будут передавать целевые модификации только части потомков, нередко единичным [Adikusuma и др., 2018; Boroviak и др., 2016]. Однако, если основатели являются фертильными, то эта проблема разрешается увеличением числа потомков.

Еще один важный аспект, который следует учитывать при получении животных с целевыми хромосомными перестройками, это несоответствие данных ПЦР и реальных изменений в геноме. Так, группа Алана Брэдли, используя полученный ранее материал от основателей-носителей делеций, дупликаций и инверсий размером 155 т.п.о. [Boroviak и др., 2016] провела FISH с целью выяснения достоверности данных ПЦР. Авторы показали, что данные генотипирования основателей при помощи ПЦР не могут в полной мере отражать реальную картину. Так, у основателя №1 при помощи ПЦР выявлялись делеция и инверсия, которые не сегрегировали у потомков, а при помощи FISH были выявлены аллель с инверсией и аллель с неполной инвертированной дупликацией. Однако, по результатам ПЦР

данные изменения определялись как инверсии и делеции. У другого основателя (№3) при помощи ПЦР определялись инверсия и дупликация, а при FISH выявлялись и инверсия, и инвертированная дупликация на разных аллелях. У основателя №4 при помощи ПЦР определялась инверсия и делеция, но при FISH были выявлены аллель с делецией и аллель с инвертированной дупликацией [Boroviak и др., 2017].

Эти данные свидетельствуют о том, что при использовании системы CRISPR/Cas9 для создания животных, несущих обширные делеции, дупликации или инверсии, следует учитывать возможность возникновения незапланированных ложных перестроек, которые необходимо выявлять при помощи разных методов (включая FISH) [Boroviak и др., 2017]. Однако, в другом исследовании, в котором также был проведен FISH нескольких основателей-носителей делеций, было отмечено полное соответствие ПЦР данным FISH [Kato и др., 2017].

Последствия хромосомных перестроек

Интересно, что эффекты больших хромосомных перестроек могут проявляться не только благодаря масштабным делециям какого-то гена, но и за счет изменения экспрессии соседних генов. Это может происходить за счет того, что различные перестройки (инверсии, дупликации или делеции) могут приводить к неправильному взаимодействию между промоторами и энхансерами, что приводит к нарушению экспрессии [Lupiáñez и др., 2015]. Так, например, у человека перестройки (делеции, инверсии и дупликации) в районе гена *EPHA4* приводят к различным аномалиям развития конечностей: брахидактилии, синдактилии и полидактилии. Эти хромосомные перестройки человека были смоделированы на мышах при помощи технологии CRISPR/Cas9 [Lupiáñez и др., 2015]. Дальнейшее изучение полученных мышей позволило выяснить, что в зависимости от типа перестройки энхансер гена *Epha4*, который в норме регулирует только экспрессию гена *Epha4*, начинает активировать соседние гены: *Pax3*, *Wnt6* или *Ihh*. Это в свою очередь приводит к развитию схожих аномалий в развитии конечностей у мышей. Данная ситуация обсуждается в контексте выделения топологически-ассоциированных доменов, которые выполняют «барьерную» функцию на распространение действия энхансера на соседние гены, а описанные в этой работе перестройки разрушают границы домена гена *Epha4* [Lupiáñez и др., 2015].

Более того, организация трехмерной структуры хроматина может регулировать экспрессию гена в ходе развития конечностей. Так, экспериментально была показана роль трехмерной организации хроматина в регуляции экспрессии гена *Pitx1* в период развития задних и передних конечностей. Благодаря различной организации локуса в тканях будущих задних и передних конечностей задается разница в контакте регуляторного элемента *Pen* с геном *Pitx1*. Модификации (перестройки) в данном локусе у людей приводят к развитию синдрома Лейбенберга (Liebenberg syndrome), а их воспроизведение у мышей приводит к эктопическому взаимодействию регуляторного элемента *Pen* и гена *Pitx1* у мышей в передних конечностях, что в свою очередь приводит к соответствующему фенотипу [Kragestein и др., 2018].

Схожие ситуации, в которых изменяется экспрессия генов за счет неправильного взаимодействия промоторов и энхансеров и возникает из-за

изменения границ топологически-ассоциированных доменов, подтверждается рядом других работ [Niedermaier и др., 2005; Seoighe и др., 2014; Spielmann и др., 2012].

В целом, на данный момент благодаря новым системам редактирования генома, таким как CRISPR/Cas9, возможно получение различных геномных модификаций у животных [Boroviak и др., 2016; Kato и др., 2017], тогда как среди вероятных механизмов, которые могут приводить к развитию аномалий, можно рассматривать не только разрушение самого гена, но и изменения 3D организации в редактируемом локусе [Kragesteen и др., 2018; Lupiáñez и др., 2015].

Материалы и методы

Выбор целевых сайтов для применения технологии CRISPR/Cas9

Выбор последовательностей хнРНК был сделан с учетом их комплементарности к «+»-цепи ДНК, а первым нуклеотидом был гуанин, который необходим для *in vitro* транскрипции с промотора T7. Выбор последовательностей хнРНК был произведен при помощи программы «sgRNA Scorer 2.0» (<https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/>) [Chari и др., 2017] и осуществлен исходя из опубликованных данных о делециях и дупликациях гена *CNTN6* у человека [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Weehi Te и др., 2014]. Выбор пары праймеров (справа и слева от целевого сайта) для каждой хнРНК производился при помощи программы «Primer-BLAST» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Для всех выбранных пар праймеров был проведен градиентный ПЦР для оптимизации температуры реакции (от 55 до 63°C). Последовательности и позиции в геноме варибельной части хнРНК и праймеров представлены в Таблице 1, а схема эксперимента представлена на Рисунке 2 (в разделе «Результаты и обсуждение»).

Последовательность ssODN (single strand oligonucleotide, одноцепочечная олигонуклеотидная ДНК) содержала гомологичные геному мыши последовательности («плечи») по обе стороны от сайта хнРНК, причем оба плеча были комплементарны «-»-цепи ДНК до места внесения разрыва нуклеазой Cas9 (между третьим и четвертым нуклеотидом после PAM) и имели длину по 60 нуклеотидов. Последовательность ssODN представлена в Таблице 1.

Эксперимент по микроинъекции в зиготы был проведен с использованием двух линий мышей: C57BL/6J и CBA/J, которые имеют различия в 20 экзоне гена *Cntn6* в позиции chr6: 104848175 (mm10): у линии C57BL/6J – T, у линии CBA/J – C. Поэтому, для генотипирования этих двух линий были выбраны праймеры FWD-SNP и REV-SNP при помощи программы «Primer-BLAST» (Таблица 1).

Таблица 1. Список последовательностей варибельной части хнРНК (в скобках указан РАМ), праймеров и ssODN, с указанием позиции в геноме мыши (версия генома: GRCh38/mm10).

Название	Последовательность (5' - 3')	Позиция
хнРНК-1	GAGCACATGGTAAACGCAGG(AGG)	chr6: 103842565-103842587
хнРНК-2	GGTAATATAGTGCGCCAAAG(AGG)	chr6: 104979795-104979817
FWD1.1	TGGGTCCTTGGAGAGGAACA	chr6: 103842509-103842528
FWD1.2	ACTCTGGTGACAATGTGCGT	chr6: 103841824-103841843
REV1	TGCACATGACCCATGACCTC	chr6: 103842786-103842767
FWD2.1	TCCCCATCTGCTGGCTCTAT	chr6: 104979678-104979697
FWD2.2	AGAGGTTGATGCAAGCTGCC	chr6: 104979540-104979559
REV2	CCCCCAAGTGATGCTTCTGT	chr6: 104980397-104980378
ssODN	GGTCCTTGGAGAGGAACATGGCCTTGCTTCTG TGCAGTCTTCCATCCTCAGTGGCCTCCTTGGCG CACTATATTACCTAATCCATTTTTCAGCATCCA AGATATTTTAAAGAAGAAGAAA	chr6: 103842511-103842570; 104979824-104979883
FWD-SNP	TTGCCCTGGTTGTCTTTTATTCAT	chr6: 104847831-104847854
REV-SNP	AGCACAAACCATGTCACCAAG	chr6: 104848314-104848334

Получение векторов, экспрессирующих хнРНК.

Плазмидный вектор, содержащий хнРНК, был получен на основе плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Adgene #48138). Первым этапом подготовки экспрессирующего вектора была линейаризация плазмиды pSpCas9(BB)-2A-GFP. Данная плазида содержит два сайта для эндонуклеазы *BbsI* и в результате рестрикции образуются два фрагмента с липкими концами длиной 9266 п.о. и 22 п.о. Рестриктазная смесь была следующего состава: 10 ед (1 мкл) рестриктазы *BbsI* (*BbsI*-HF, NEB R0539S), 1 мкг плазмидной ДНК, 5 мкл 10-ти кратного «NEBuffer» (NEBuffer 2.1, NEB B7202S) и воды (до 50 мкл); реакция проходила при 37°C в течение ночи. По окончании реакции, фрагмент размером 9266 п.о. был очищен при помощи электрофореза в 1%-ом агарозном геле с последующим выделением при помощи «Набора для элюции ДНК из агарозного геля» («БиоСилика», кат. № GED-100) по стандартному протоколу производителя.

Следующим этапом подготовки экспрессирующего вектора был отжиг и фосфорилирование олигонуклеотидов, последовательность олигонуклеотидов для каждой хнРНК приведена в Таблице 2. Реакционная смесь состояла из 6,5 мкл дважды дистиллированной воды, 1 мкл каждого из двух олигонуклеотидов (100 мкМ), 0,5 мкл полинуклеотид-киназы фага Т4 (Т4 РНК, NEB M0201S), 1 мкл 10-тикратного Т4 РНК Buffer (NEB, B0201S) (общий объем реакционной смеси составляет 10 мкл). Смесь инкубировали при 37°C - 30 минут и при 95°C - 5 минут, при равномерном снижении температуры до 25°C по 5°C/мин. В результате, после отжига олигонуклеотидов должны образоваться короткие фрагменты двуцепочечной ДНК, которые имеют липкие концы, комплементарные линейаризованной плазмиде pSpCas9(BB)-2A-GFP.

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов для получения плазмидных векторов, экспрессирующих хнРНК.

Название	Последовательность олигонуклеотида (5' → 3')
FWD-oligo-хнРНК-1	caccgGAGCACATGGTAAACGCAGG
REV-oligo-хнРНК-1	aaacCCTGCGTTTACCATGTGCTCc
FWD-oligo-хнРНК-2	caccgGGTAATATAGTGCGCCAAAG
REV-oligo-хнРНК-2	aaacCTTTGGCGCACTATATTACCc

При лигировании линейной плазмиды и олигонуклеотидов, смесь, состоящую из 7 мкл H₂O, 0,5 мкл (200 Ед) Т4 ДНК-лигазы (T4 DNA ligase, NEB M0202S), 1 мкл Т4 DNA Ligase Buffer (NEB, B0202S), 0,4 мкл смеси олигонуклеотидов после фосфорилирования и отжига, 0,1 мкл BSA (бычий сывороточный альбумин) (20 мг/мл; NEB B9000S), 1 мкл линейной плазмиды (300 нг/мкл) инкубировали при 16°C в течение ночи. По окончании реакции, полученный продукт был электропорирован в компетентные клетки *Escherichia coli* (NEB C3019). Далее, смесь бактерий после электропорации была перенесена в 1 мл среды LB (Luria-Bertani) (состав на 100 мл: бакто-триптон 1 грамм; бактериально-дрожжевой экстракт 0,5 грамм; NaCl 0,5 грамм) и инкубировалась в течение 45 минут при 37°C, после чего бактерии были посеяны на 10-см чашки Петри (покрытые агаром), содержащие среду следующего состава: бакто-триптон 1 грамм, бактериально-дрожжевой экстракт 0,5 грамм, NaCl 0,5 грамм, агар 1,5 грамма, и 10 мг ампициллин в объеме 100 мл. Бактериальные колонии (выборочно по 10 шт.) были пересажены в индивидуальные пробирки с 5 мл среды для бактерий, содержащей дополнительно ампициллин (10 мг на 100 мл), а затем были исследованы при помощи ПЦР с использованием реверс-олигонуклеотидов (REV-oligo-хнРНК-1 или REV-oligo-хнРНК-2) в качестве реверс-прайма и форвард-прайма K-Orig-3R (GTTTCGCCACCTCTGACTTG). Положительные клоны бактерий были выделены (выборочно по два) при помощи «Набора для выделения геномной ДНК из бактерий» («БиоСилика», кат. № GBD-100), а затем секвенированы по Сенгеру.

Получение компонентов для микроинъекции (мРНК Cas9, хнРНК и ssODN)

Для синтеза хнРНК нами был использован набор для *in vitro* транскрипции «MEGAscript™ T7 Transcription Kit» (Ambion, AM1354), а для очистки синтезированной хнРНК был использован набор «MEGAclean™ Transcription Clean-Up Kit» (Ambion, AM1908), с использованием стандартных протоколов от производителя. Концентрация полученной хнРНК была измерена при помощи «NanoDrop 2000 Spectrophotometer» (Thermo Scientific).

В качестве ДНК-матрицы для реакции *in vitro* транскрипции был использован ПЦР-продукт, длиной 117 п.о. и содержащий минимальный T7-промотор

(5'-ТААТАСГАСТСАСТАТА-3') за которым следует последовательность хнРНК (100 п.о.) (последовательность хнРНК начинается с G). ПЦР-продукт был получен с использованием описанной выше плазмидной матрицы (pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), с внесенными изменениями для экспрессии хнРНК). Поскольку в плазмиде хнРНК находилась под U6-промотором, то для ПЦР был использован праймер с дополнительным T7-промотором, в результате чего, полученный ПЦР-продукт содержал последовательность из T7-промотора, и следующей за ним последовательности хнРНК. Полученные ПЦР-продукты были очищены при помощи электрофореза в 3% агарозном геле, целевой фрагмент был вырезан из геля и очищен при помощи «Набора для элюции ДНК из агарозного геля» («БиоСилика», кат. № GED-100), после чего переосажден этанолом. Матричная РНК Cas9 (GeneArt™ CRISPR Nuclease mRNA (A29378)) была использована от фирмы «ThermoFisher Scientific» (США).

ssODN, длиной 120 нуклеотидов был химически синтезирован в фирме «ДНК-синтез» (Россия, Москва).

Подготовка животных, получение зигот и манипуляции с ними

Для проведения эксперимента по получению адресно-модифицированных мышей заблаговременно были подготовлены все необходимые животные. Во-первых, необходимы псевдобеременные самки-реципиенты, которым будут трансплантированы инъецированные эмбрионы. Псевдобеременных самок получают в результате их покрытия вазэктомированными самцами. Поэтому, были подготовлены вазэктомированные самцы линии CD-1. Во-вторых, для получения зигот необходимы самки-доноры. В нашем эксперименте мы использовали заблаговременно полученных самок-гибридов первого поколения C57BL/6J x CBA/J (B6CBAF1/J) или самок инбредной линии C57BL/6J. Для покрытия самок-доноров были использованы фертильные самцы инбредной линии C57BL/6J.

Для получения зигот были использованы суперовулированные самки B6CBAF1/J или самки C57BL/6J. Суперовуляция была произведена путем интраперитонеальной инъекции 7,5 Ед. PMSG (pregnant mare's serum; Folligon, Intervet, Voxmeer, Holland) в 16:00 часов первого дня и 7,5 Ед. hCG (human chorionic gonadotrophin; Folligon, Intervet, Voxmeer, Holland) в 13:00 третьего дня (спустя 45

часов после инъекции PMSG). После введения hCG, самок подсаживали в клетки к самцам инбредной линии C57BL/6J (одна самка к одному самцу). Утром 4-го дня был произведен осмотр самок на наличие вагинальных пробок и самки с вагинальными пробками были умерщвлены путем дислокации шейных позвонков. Затем, была произведена диссекция яйцеводов, из которых были вымыты одноклеточные эмбрионы, окруженные кумулюсными клетками в каплю со средой M2 (Sigma Aldrich, M7167) (между 10:00 и 11:00, спустя 21-22 часа после инъекции PMSG). Оплодотворенные яйцеклетки были освобождены от кумулюсных клеток при помощи гиалуронидазы (Hyaluronidase from bovine testes, Sigma Aldrich, H4272) после чего зиготы культивировали в каплях среды M16 (Sigma Aldrich, M7292), покрытых минеральным маслом (mineral oil, Sigma Aldrich M8410), при 37°C и 5% CO₂ до момента процедуры микроинъекции.

Микроинъекция раствора, содержащего пару хнРНК, ssODN и мРНК Cas9, была проведена в цитоплазму зигот (культивируемых в капле среды M2, покрытой минеральным маслом под инвертированным микроскопом (Olympus IX71, Japan), оснащенным микроманипуляторами Narishige (Japan). Микроинъекции зигот производились в диапазоне между 13:00 и 17:00 часами 4-го дня (спустя 24-28 часов после инъекции hCG). Водный раствор, содержащий 50 нг/мкл мРНК Cas9, 25 нг/мкл каждой хнРНК и 100 нг/мкл ssODN, подавали под давлением в инъекционную иглу при помощи воздушного компрессора (Transjector 5246, Eppendorf). После инъекции эмбрионы культивировали в каплях со средой M16 под маслом в инкубаторе в течение 1 часа.

Инъецированные эмбрионы были трансплантированы в яйцеводы псевдобеременным (суррогатным) матерям линии CD-1 (0,5 дней после коитуса). Для анестезии животных был использован ингаляционный изофлурановый наркоз. Для индукции наркоза животных помещали в индукционную камеру при следующих настройках наркозного аппарата: поток воздуха 1000 мл/мин, концентрация изофлурана 5%. После того как мышь «заснула», ее перемещали в ингаляционную маску и задавали новые параметры наркоза, при которых проводили операции: поток воздуха 200 мл и концентрация изофлурана 1,5-2,5%.

Все манипуляции с животными одобрены биоэтической комиссией Института цитологии и генетики СО РАН №17.4 от 17.04.2013.

Выделение ДНК и генотипирование животных

Первой стадией выделения ДНК из кусочков кончика хвоста экспериментальных мышей была обработка их лизирующим буфером (Tail Lysis Buffer, состоящим из 100 мМ NaCl, 10 мМ Трис рН8.0, 25мМ ЭДТА рН8.0, 0,5% SDS, Протеиназа К 0,2 мкг/мл). Перед забором образцов, каждая мышь получала индивидуальную метку на ухе. К каждому образцу было добавлено по 500 мкл лизирующего буфера, после чего образцы инкубировали при 55°C до полного лизиса ткани. Полученный лизат, был обработан смесью фенол-хлороформ (в соотношении 1:1), а ДНК была осаждена при помощи 0,7 объема изопропилового спирта, с добавлением 0,1 объема ацетата натрия (3М, рН 5,2).

Генотипирование животных-носителей делеций, инверсий и дупликаций было проведено с помощью ПЦР. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 20 нг геномной ДНК, 67 мМ Трис-НСl рН 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого нуклеотида (dATP, dCTP, dGTP, и dTTP), 0,4 мМ каждого из праймеров (форвард-праймер и реверс-праймер) и 1 Ед. Taq-полимеразы. Реакция была проведена при следующих условиях: предварительная денатурация 95°C 3 минуты, 35 циклов: 30 секунд при 95°C, 30 секунд при 60-62°C, 1-2 минуты при 72°C, финальная инкубация при 72°C 5 мин.

Список праймеров, использованных для характеристики различных сайтов делеций, дупликаций и инверсий:

- 1) Район целевого сайта для хнРНК-1: FWD1.1 или FWD1.2 + REV1;
- 2) Район целевого сайта для хнРНК-2: FWD2.1 или FWD2.2 + REV2;
- 3) Внутренняя часть удаляемого фрагмента и SNP: FWD-SNP + REV-SNP
- 4) Стык делеции: FWD1.1 или FWD1.2 + REV2;
- 5) Левая граница инверсии: FWD1.1 или FWD1.2 + FWD2.1 или FWD2.2
- 6) Правая граница инверсии: REV1 + REV2
- 7) Стык двух копий дупликации: FWD1.1 или FWD1.2 + REV2

Приготовление геномной ДНК и Саузерн-блот анализ делеций гена *Cntn6*

Образцы тканей экспериментальных животных (мышечная ткань) были лизированы в течение ночи в буфере (100 мМ Трис-НСl pH 8,5, 5 мМ ЭДТА, 0,2% SDS, 200 мМ NaCl, 100 мкг/мл Протеиназа К) при постоянном перемешивании и температуре 55°C. Экстракция геномной ДНК из лизата проводилась двойной обработкой смесью фенол-хлороформа и однократно хлороформом, после чего проводилось осаждение ДНК добавлением 0,1 объема ацетата натрия (3М, pH5,2) и изопропилового спирта (0,7 объемов). Затем, смесь перемешивали, осторожно переворачивая пробирку, а образовавшуюся «медузу» ДНК переносили при помощи пипетки в 2 мл пробирки с 80% этиловым спиртом. Для хранения образцы были помещены в морозильную камеру (температура -20°C). Образцы ДНК были пересланы в Мюнстерский университет (Германия), в лабораторию Бориса Скрябина для проведения Саузерн-блот анализа.

5 мкг геномной ДНК гидролизировали эндонуклеазой *EcoRV* (Thermo Scientific™), разделяли в 0,8% агарозном геле, а затем переносили на нейлоновые мембраны «GeneScreen» (NEN DuPont). Мембраны помещали в гибридизационный раствор, содержащий меченые P³²-зонды специфические к 5'- и 3'-районам фланкирующих делеции, зонды 5'-HR проба и 3'-HR проба соответственно.

Мечение P³²зондов проводили с использованием «Random prime DNA labeling kit» (Roche) и P³²-ЦТФ (PerkinElmer). Мембраны промывали 0,5 x SSPE (1x SSPE - 0,18 М NaCl, 10 мМ NaH₂PO₄ и 1 мМ ЭДТА, pH 7.7) и 0,5% SDS при 65 °C и экспонировали на «MS-film» (Kodak) при -80 °C.

3'-HR проба была амплифицирована как два ДНК-фрагмента с использованием геномной ДНК мыши методом вложенного ПЦР. 3'-HR-A фрагмент ДНК (0,6 т.п.о.) был амплифицирован с использованием пары праймеров *Cntn6-3hrD1* + *Cntn6-3hrR1*, а затем реамплифицирован с парами праймеров *Cntn6-3hrD1pr* + *Cntn6-3hrR1pr*. 3'-HR-B фрагмент ДНК (0,7 т.п.о.) был амплифицирован с использованием пары праймеров *Cntn6-3hrD2* + *Cntn6-3hrR2* и реамплифицирован с праймерами *Cntn6-3hrD2pr* + *Cntn6-3hrR2pr*. Последовательности праймеров для приготовления 3'-HR пробы приведены в Таблице 3.

5'-HR проба была амплифицирована аналогично. 5'-HR-A фрагмент ДНК (0,8 т.п.о.) был амплифицирован с использованием пары праймеров Cntn6-5hrD4 + Cntn6-5hrR3 и реамплифицирован парой Cntn6-5hrD4pr + Cntn6-5hrR3pr. 5'-HR-B фрагмент ДНК (1,0 т.п.о.) был амплифицирован с использованием пары праймеров Cntn6-5hrD3b + Cntn6-5hrR4, а затем реамплифицированы парой праймеров Cntn6-5hrD3pr + Cntn6-5hrR4pr. Последовательности праймеров для приготовления 3'-HR пробы приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованные при подготовке зондов для Саузерн-блот анализа.

Название	Последовательность
Cntn6_3hrD1	GTCTCAAGCGTCTCTTGGAGCATCCAAGATATTTTAAAGAAG AAGA
Cntn6_3hrR1	GTCTCAAGCGTCTCTTAAGCCTAACAGGAGTTAAATTCACGG TA
Cntn6_3hrD1pr	GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAACCGGAGGACGAATTCACCT GCTTTTGCAAAGAAGAAGAAAAAACATGGTAAA
Cntn6_3hrR1pr	ACTCTCCGGTGAACAGCTCCTCGCTTGCTCACCATCCGGTGGC GGGATCCAAATTCACGGTAGCTGTACACAAATAC
Cntn6_3hrD2	GTCTCAAGCGTCTCTCTTATTGGAGGAGGGGTTCTGTTTG
Cntn6_3hrR2	GCTCTAGACGTCTCTGAGATATGTTTGAAAGCAGAGTCTGTA AGC
Cntn6_3hrD2pr	GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAACCGGAGGACGAATTCACCT GCTTTTGCAAGGGGTTCTGTTTGGTTTTAATGC
Cntn6_3hrR2pr	ACTCTCCGGTGAACAGCTCCTCGCTTGCTCACCATCCGGTGGC GGGATCCGCAGAGTCTGTAAGCAGTAGGTCAAG
Cntn6_5hrD4	GTCTCAAGCGTCTCTCTTAGGATTTATCTGGTTGCCTCATCTT AG
Cntn6_5hrR3	GCTCTAGACGTCTCTGAGATGAATGTACCCAAACACACCTGC
Cntn6_5hrD4pr	GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAACCGGAGGACGAATTCACCT GCTTTTGCGTTGCCTCATCTTAGGATCATGGG
Cntn6_5hrR3pr	ACTCTCCGGTGAACAGCTCCTCGCTTGCTCACCATCCGGTGGC GGGATCCAAACACACCTGCATACATATATAAAAT
Cntn6_5hrD3b	GTCTCAAGCGTCTCTTGGACAGCCATGCACAGGGAGACTT
Cntn6_5hrR4	GTCTCAAGCGTCTCTTAAGTGCACATGACCCATGACCTC
Cntn6_5hrD3pr	GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAACCGGAGGACGAATTCACCT GCTTTTGCGACTTGACCTTGTGGTAGGTTATGGG
Cntn6_5hrR4pr	ACTCTCCGGTGAACAGCTCCTCGCTTGCTCACCATCCGGTGGC GGGATCCTGACCCATGACCTCCTTTCACC

Получение культур первичных фибробластов от экспериментальных мышей

Донорами культур первичных фибробластов были взрослые основатели линий мышей-носителей делеций и дупликаций и 14-дневные эмбрионы-носители этих же перестроек, полученные от скрещивания гетерозигот по хромосомным перестройкам с мышами дикого генотипа (линия C57BL/6J). У умерщвлённых животных дислокацией шейных позвонков, были выделены грудина и фаланги пальцев при помощи хирургических инструментов, после чего ткани были измельчены и помещены в 0,25% раствор трипсина в фосфатном буфере (PBS). Далее, в течение 30 минут и при комнатной температуре ткани перемешивали на магнитной мешалке с добавлением стеклянных шариков. Трипсин инактивировали добавлением FBS (fetal bovine serum). Полученную суспензию клеток помещали в культуральные матрасы и культивировали в среде DMEM (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco) и 50 мг/мл смеси антибиотиков (Пенициллин/Стрептомицин) (Gibco), при 37°C и атмосфере 5% CO₂. Смена среды производилась каждые 2-3 дня.

Сходным образом получали культуры эмбриональных фибробластов из эмбрионов. У извлеченных эмбрионов удаляли головную часть и оставшиеся части эмбрионов измельчались и трипсинизировались, как описано выше. После инактивации трипсина, суспензии клеток помещали в культуральные матрасы и культивировали сходным образом, как описано выше для фибробластов взрослых животных.

Приготовление и мечение ВАС-ДНК методом ник-трансляции

ВАС-клоны были заказаны и получены из «ВАСРАС Resources Center» (California, USA). Три ВАС-клона: RP24-173I15 (I15), RP24-85J8 (J8) и RP23-285E20 (E20) были комплементарными к району делеции гена *Cntn6*, а RP23-443K19 (K19) комплементарен к последовательности ДНК, расположенной примерно в 10 000 т.п.о. от места делеции левее. Для выделения ДНК ВАС-клонов, бактерии были культивированы в 100 мл среды Luria-Bertani (LB), содержащей хлорамфеникол (12,5 мкг/мл), при 37°C и при постоянном ротационном перемешивании в течение 14–16 часов. Затем, культуру бактерий центрифугировали

при 4000 g в течение 10 минут. ДНК ВАС была выделена и очищена из *E. coli* щелочным лизисом и смесью фенол-хлороформ (1:1), переосаждена изопропанолом и растворена в 100 мкл Трис-ЭДТА буфера. Концентрация ДНК была измерена при помощи набора «Qubit dsDNA BR Assay» (Invitrogen, Life Technologies, USA) на «Qubit 2.0 Fluorometer» (Invitrogen, Life Technologies, USA) руководствуясь инструкциями производителя. Конечная концентрация была доведена до 0,1-0,2 мкг/мкл.

Мечение выделенной ДНК ВАС-клонов была проведена с помощью набора ник-трансляции (Invitrogen) с использованием digoxigenin-11-dUTP (Roche) и Biotin-16-dUTP по протоколу производителя (Roche).

FISH анализ метафазных хромосом первичных фибробластов с использованием меченой ДНК ВАС клонов

При получении препаратов метафазных хромосом, культивируемые клетки были обработаны колцемидом (20 нг/мл) в течение 2 часов, затем они переносились в гипотонический раствор 0,075 мМ KCl на 20 минут при 37°C и фиксировались смесью метанола и уксусной кислоты (3:1).

При проведении FISH анализа метафазных хромосом, препараты были обработаны РНКазой А (100 мкг/мл) в течение 1 часа, с последующим трехкратным отмыванием 2xSSC буфером (солевой раствор цитрата натрия: 0,3 М хлорид натрия и 30 мМ цитрат натрия, рН 7,0). Далее, препараты были помещены в раствор пепсина (0,02% в 10 мМ HCl) на 5 минут при 37°C, после чего препараты фиксировали в растворе 1% пара-формальдегида в PBS (фосфатно-солевой буфер) в течение 10 минут и денатурировали в 70% растворе формальдегида в течении 2 минут при 75°C. Меченые ВАС-зонды (описано выше) смешивали с Cot1 ДНК, денатурировали в течение 5 минут при 95°C, оставляли на 50 минут при 37°C, затем наносили на препараты метафазных хромосом и гибридизовали 3 дня при 37°C в термостате. Биотиновые зонды детектировали при помощи «ExtrAvidin-FITC» (Sigma) и антител *Anti-Avidin-FITC* (Sigma), а диоксигениновые зонды выявляли овечьими антителами к диоксигенину (меченые Rhodamine (Roche)), усиливая сигнал кроличьими поликлональными антителами к овечьему иммуноглобулину, мечеными родамином (abcam). Хромосомы контрастировали подкрашиванием с помощью

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma). Микроскопический анализ проведен с использованием микроскопа AxioPlan 2 (Zeiss), оснащенным CV-M300 CCD камерой (JAI Corporation, Japan), и программного обеспечения «ISIS5-software» (METASystems, GmbH). Для каждого случая проанализировано примерно по 100 метафазных пластинок.

Полногеномное секвенирование двух гомозиготных носителей дупликации 2274 т.п.о. и характеристика их границ

Получение геномной ДНК из кончиков хвостов от двух гомозиготных F2 №5 и F3 №22 по дупликации животных независимого происхождения проводили как описано выше. Приготовление библиотек для «Illumina» и секвенирование было проведено коммерческой фирмой «GeneWiz service» (New Jersey, USA). Секвенирование было проведено с параметрами 150x2 – парных концов на глубину 400 и 460 млн. прочтений для животных F2 №5 и F3 №22 соответственно. Секвенированные последовательности анализировали, используя «fastqc» софт, и выравнивали на референсный геном мыши *mm10* (основанный на геноме линии мышей C57BL/6J), используя программу «bowtie2» для сравнительной оценки конкордантности и дискордантности. Для получения визуализированных данных, выравнивание конвертировали в «bam» формат, сортировали, индексировали, используя «samtools», и загружали «IGV browser track». Данные секвенирования доступны в базе данных NCBI по регистрационному номеру PRJNA525906.

Для определения границ дупликации при помощи секвенирования ПЦР-продуктов с дальнейшим их секвенированием по Сенгеру были использованы праймеры:

- 1) FWD1.1 + REV1 – для определения левой границы
- 2) FWD2.2 + REV2 – для определения правой границы
- 3) FWD2.2 + REV1 – для определения границы стыка двух копий

Перед секвенированием ПЦР-продукты оценивались при помощи гель-электрофореза в 2% агарозном геле.

Цифровой количественный ПЦР

Тотальная РНК из мозжечков экспериментальных животных была выделена с использованием «TRI Reagent» (Sigma-Aldrich) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрация и чистота РНК была определена при помощи «NanoDrop 2000» (Thermo Scientific). Затем, РНК была обработана ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific) для удаления геномной ДНК. После этого, 0,6 мкг тотальной РНК были использованы для получения кДНК при помощи «RevertAid RT Kit» (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для проведения цифрового количественного ПЦР были подобраны пары праймеров и зонды к последовательностям генов *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4*. В качестве референсного гена был выбран *Hprt* (кодирует фермент гуанин-гипоксантин-фосфорибозил трансферазу). Последовательности праймеров приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Последовательности праймеров и зондов для цифрового количественного ПЦР.

Название	Последовательность 5'- -3'
q_Ch11_ex6_F	TGAACCCATTGATGTAGAAGAAGG
q_Ch11_ex6_R	GCAAAGGTGGGAGGCCTTT
q_Ch11_ex6_P	HEX- CCATTGTCTTACCCTGCAACCCTCC -BHQ
q_Cntn6_ex4_F	ATAGGTTGGATGGAGGCAGT
q_Cntn6_ex4_R	TTCTACTCAGAATGGTGCCC
q_Cntn6_ex4_P	HEX- CCATCAGCAGCCCCAGAACAGA -BHQ
q_Cntn4_ex8_F	AGACAAGAACAAGAAGCACTG
q_Cntn4_ex8_R	GCCGCACAGAAGGACCATT
q_Cntn4_ex8_P	HEX- TCAGTCCGTCGAGGTCAGGG -BHQ
q_Hprt_cntrl_F	AAAGCCTAAGATGAGCGCAA
q_Hprt_cntrl_R	AGATGGCCACAGGACTAGAA
q_Hprt_cntr_P	FAM- GTTGATGTTGCCAGTAAAATTAGCAGGT -BHQ

Цифровой ПЦР был проведен с использованием «QX100» (Bio-Rad) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакционная смесь общим объемом содержала однократный «ddPCR™ Supermix» для проб (без dUTP), 900 нМ праймеры, и 250 нМ пробы и образец. Последовательности праймеров и зондов

представлены в Таблице 4. Каждая реакция была продублирована. Капли были получены с использованием «DG8™» картриджей, после чего были перенесены в ПЦР-платы. ПЦР был проведен в соответствии программе: 95°C в течение 10 минут, затем 45 циклов: 95°C в течение 30 секунд и 60°C в течение 1 минуты. Нагрев и остывание происходило со скоростью 2°C в секунду. Затем, капли были прочитаны при помощи «ридера», а результат был проанализирован при помощи «Quanta Soft» (Bio-Rad). Пороговые значения были установлены для установления позитивных и негативных капель, после чего данные были экспортированы как «CSV»-файлы (commaseparated values file).

Криоконсервация сперматозоидов мышей-носителей делеций, дупликация и инверсий гена *Cntn6*

Для криоконсервации сперматозоидов нами использован широко распространенный протокол [Takeo, Nakagata, 2018b] с небольшими техническими модификациями. Для криоконсервации сперматозоидов использовали самцов-доноров старше 3 месяцев. Сперматозоиды в gCPA (среда для заморозки сперматозоидов, содержащая глутамин) (объем 10 мкл) помещали в криосоломинки (PETG sperm straw, CryoBio Systems, Франция) и запаивали при помощи запайщика для полиэтиленовых пакетов. Затем, соломинки охлаждали в парах азота и переносили в дюары с жидким азотом для длительного хранения.

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 геномного редактирования CRISPR/Cas9. Дизайн перестроек у мышей был спланирован так, чтобы воспроизвести реальные делеции и дупликации, описанные у человека [Kashevarova и др., 2014]. Исходя из данных о перестройках у человека было решено разработать дизайн генетических манипуляций таким образом, чтобы полностью удалить ген *Cntn6* (размер всего гена составляет 370,6 т.п.о.) с захватом 5'- и 3'-некодирующих регионов.

Для непосредственного выбора целевых сайтов хнРНК был произведен биоинформационный подбор, который основывался на двух принципах – высокая целевая активность и минимизация нецелевой (off-target) активности хнРНК. Все это достигается благодаря уникальности 20-тинуклеотидных последовательностей в геноме, которые являются целевыми сайтами хнРНК. В результате, был выбран дизайн, при котором целевой сайт для первой хнРНК располагался примерно за 650 т.п.о. до начала гена *Cntn6* в 5'-некодирующей области, а сайт для второй хнРНК находился на расстоянии 116,4 т.п.о. от стоп-кодона в 3'-некодирующей области. Размер всего гена *Cntn6* составляет 370,6 т.п.о.

Для анализа хромосомных перестроек использовали пары праймеров (подробно описаны в разделе «Материал и методы») для генотипирования: FWD1.1+REV1 и FWD1.2+REV2 для сайта первой хнРНК, а праймеры FWD2.1+REV и FWD2.2+REV2 для сайта второй хнРНК (Рисунок 2а).

Перед проведением следующих этапов работы было необходимо удостовериться в точности аннотированных геномных данных для мыши в области планируемых целевых модификаций. С этой целью была выделена геномная ДНК от двух линий мышей C57BL/6J и CBA/J, содержащихся в виварии ИЦиГ СО РАН. Затем, была проведена ПЦР с парами праймеров FWD1.1+REV1 и FWD2.1+REV с использованием геномной ДНК этих линий мышей. В результате, были получены ПЦР-продукты с использованием пар праймеров FWD1.1+REV1 и FWD2.1+REV для линии C57BL/6J, и одной парой праймеров FWD1.1+REV1 для линии CBA/J.

ПЦР-продукты с парой праймеров FWD2.1+REV, а также с дополнительной парой праймеров FWD2.2+REV2 для линии CBA/J получить не удалось. Далее, ПЦР-продукты были секвенированы по Сенгеру, а полученные последовательности были выравнены на аннотированный геном мыши (GRCm38/mm10).

Результаты проведенных тестов показали совпадение полученных последовательностей для обоих районов целевых сайтов хнРНК у мышей C57BL/6/J с аннотированными последовательностями. Тесты для мышей CBA/J показали соответствие полученных последовательностей сайта первой хнРНК аннотированным последовательностям. Однако, нам не удалось получить ПЦР-продукты с использованием пар праймеров для сайтов FWD2.1+REV2 и FWD2.2+REV2, что позволяет сделать предположение о том, что в выбранном районе 6-ой хромосомы произошли мутационные события, изменившие последовательности у мышей CBA/J. Стоит отметить, что для генома линии CBA/J изменения ДНК в этом районе не были описаны ранее.

Эксперименты по получению целевых делеций проводились на зиготах, полученных от самок-гибридов F1 CBA/J x C57BL/6J, покрытых самцами линии C57BL/6J. Также, небольшая часть эксперимента была проведена на зиготах, которые были получены от самок линии C57BL/6J, покрытых самцами линии C57BL/6J. Нами был выбран вариант микроинъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 (пара хнРНК и мРНК-Cas9) и ssODN в цитоплазму зигот, как более эффективный и менее травматичный по сравнению с микроинъекциями в пронуклеус. Всего нами было проведено 599 микроинъекций в зиготы и после кратковременного культивирования 256 из них были трансплантированы (от 10 до 17 зигот на мыш) в воронку яйцевода псевдобеременным (суррогатным) самкам линии CD-1. В результате, мы наблюдали рождение 41-го потомка (Таблица 5).

ПЦР анализ (с последующим секвенированием ПЦР-продуктов) 41-го потомка показал, что 11 из них были носителями ожидаемых генетических модификаций района гена *Cntn6* (Рисунки 1 и 2; Таблица 5):

- 5 мышей-носителей целевой делеции 1137 т.п.о.;
- 2 мыши-носители делеции и дупликации 2274 т.п.о. одновременно;
- 4 мыши-носители инверсии.

Таблица 5. Данные по микроинъекциям компонентов CRISPR/Cas9 и рождаемости мышей, несущих целевые делеции, инверсии и дупликации

Кол-во опытных зигот	Кол-во трансплантированных зигот	Кол-во живых потомков	Кол-во родившихся мышей с делецией	Кол-во родившихся мышей с инверсией	Кол-во родившихся мышей с дупликацией
599	256	41	7	4	2

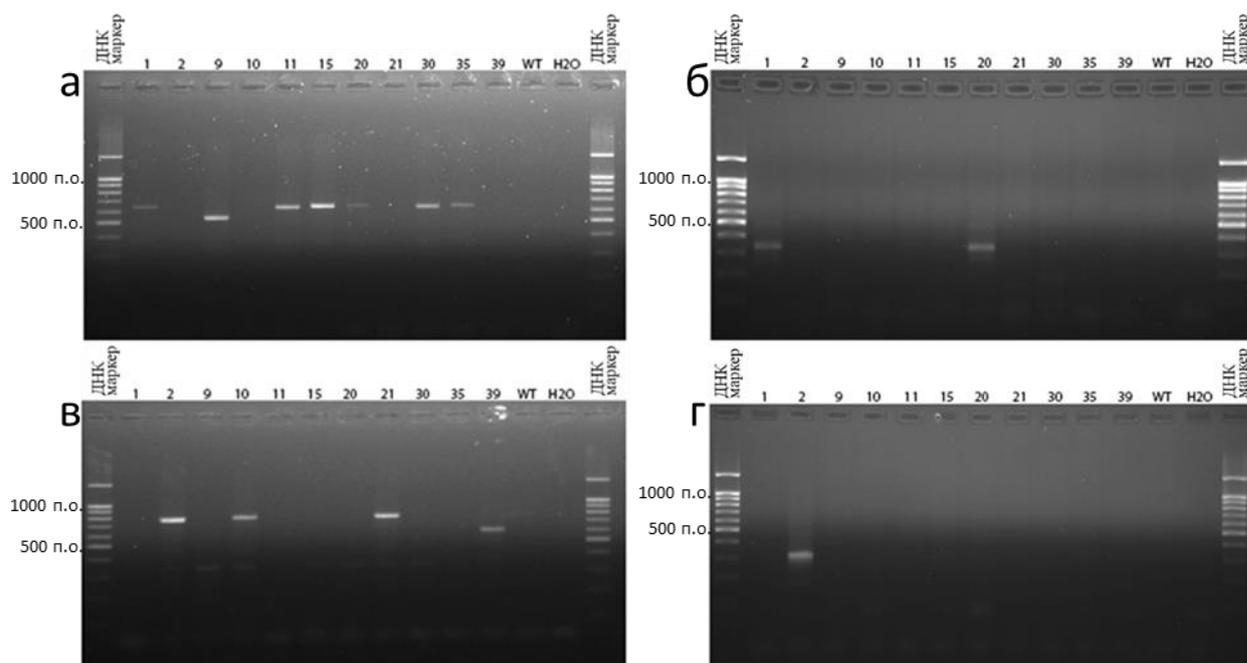


Рисунок 1. Результаты ПЦР-анализа 11 мышей F0 по идентификации делеции (а), дупликации (б), правой границы инверсии (в) и левой границы инверсии (г). Используются следующие праймеры для определения: делеция - FWD1.1 + REV2, дупликация - FWD2.1 + REV1, инверсия - REV1 + REV2 для правой границы и FWD1.1 + FWD2.2 для левой границы. Ожидаемые размеры продуктов: делеция 636 п.о., дупликация 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 (линия C57BL/6J), 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.).

Все 11 мышей F0 были фертильными и стали основателями (фаундерами) линий мышей: 7 линий мышей с делецией, 4 линии мышей с инверсией и 2 линии мышей с дупликацией. Учитывая, что дизайн эксперимента был нацелен на получение адресных 1137 т.п.о. делеций, а дупликации и инверсии являются «побочными» модификациями при выбранном дизайне эксперимента, эффективность индуцированных целевых модификаций (делеций) составила 17%.

Что касается рождения носителей инверсий и дупликаций в экспериментах по индукции масштабных делеций – это нередко встречающаяся ситуация, сопровождающая процессы репарации двунитевых разрывов ДНК, разделенных значительными расстояниями [Birling и др., 2017; Boroviak и др., 2016; Zhang и др., 2015].

Важнейшим параметром при применении системы CRISPR/Cas9 является точность адресных геномных модификаций, что оценивается по корректности формирования «стыков» (joints) между концами ДНК после делеции. В использованном нами дизайне, инъекционная смесь дополнительно содержала одноцепочечный олигонуклеотид (ssODN), который выступает в качестве матрицы при образовании делеционного стыка, если использовался механизм HDR (homology directed repair, механизм репарации по пути гомологичной рекомбинации). Однако, кроме механизма HDR существует, как правило, более распространенный механизм восстановления двуцепочечных разрывов ДНК – NHEJ (non-homology end joining, негомологичное соединение концов), при котором нередко происходит потеря нуклеотидов в местах стыка. Таким образом, по результатам секвенирования ПЦР продуктов сайтов «стыков» концов ДНК, мы имели возможность судить о том, какой был задействован механизм репарации двунитевого разрыва – HDR или NHEJ.

Анализ секвенирования «стыковочных» сайтов у семи носителей делеции показал, что у трех основателей №15, №20 и №35 нуклеотидные последовательности совпадают с последовательностью ssODN, что означает о формировании «стыка» по механизму HDR (Рисунок 2д). 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 (Рисунок 2д). 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 у семи животных. 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 разрывов ДНК по пути HDR.

Как отмечалось выше, среди семи основателей-носителей делеций у двух (№1 и №20) наряду с делецией была идентифицирована дупликация размером 2274 т.п.о. (Рисунки 1 и 2д; Таблица 5). Образование дупликаций является «побочным» событием с точки зрения дизайна, направленного на получение делеций [Biriling и др., 2017; Boroviak и др., 2016; Zhang и др., 2015]. При таком дизайне, стыки между копиями могут образовываться только при участии механизма негомологичного соединения концов (NHEJ), так как потенциальная матрица для гомологичной репарации отсутствует. Ожидаемо, по результатам секвенирования сайтов «стыков» между двумя копиями была обнаружена потеря 5 п.о. и 13 п.о. у основателей №1 и №20 соответственно (Рисунок 2д). Однако, несмотря на то что дупликации являются «побочным» явлением выбранного нами дизайна получения делеций, рождение мышей-носителей дупликаций можно рассматривать как «счастливый случай», поскольку «воспроизводятся» дупликации гена *CNTN6*, которые были ранее описаны у человека [Kashevarova и др., 2014].

Так же, как и дупликации, инверсии являются «побочным» событием в использованном нами дизайне, направленном на получение делеций [Biriling и др., 2017; Boroviak и др., 2016; Zhang и др., 2015]. При помощи ПЦР-анализа, у всех четырех основателей-носителей инверсий удалось определить их правую границу. Последовательности стыков были установлены в результате секвенирования ПЦР-продуктов и представлены на Рисунке 2д. 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) (Рисунок 2д). Попытка установления левой границы инверсий удалась только у двух носителей №2 и №21 и у этих же животных наблюдалась потеря 14 п.о. и 83 п.о. в сайте соединения соответственно (Рисунок 2д). Эти данные свидетельствуют о том, что при формировании инверсий, как и дупликаций, происходят потери нуклеотидов в местах образующихся стыков, которые не всегда возможно установить при помощи стандартного метода ПЦР. Именно такую ситуацию мы наблюдали при анализе левой границы у основателей №10 и №39. Эти предварительные данные согласуются с тем, что при образовании крупных перестроек могут возникать локальные изменения в местах стыков [Boroviak и др., 2017].

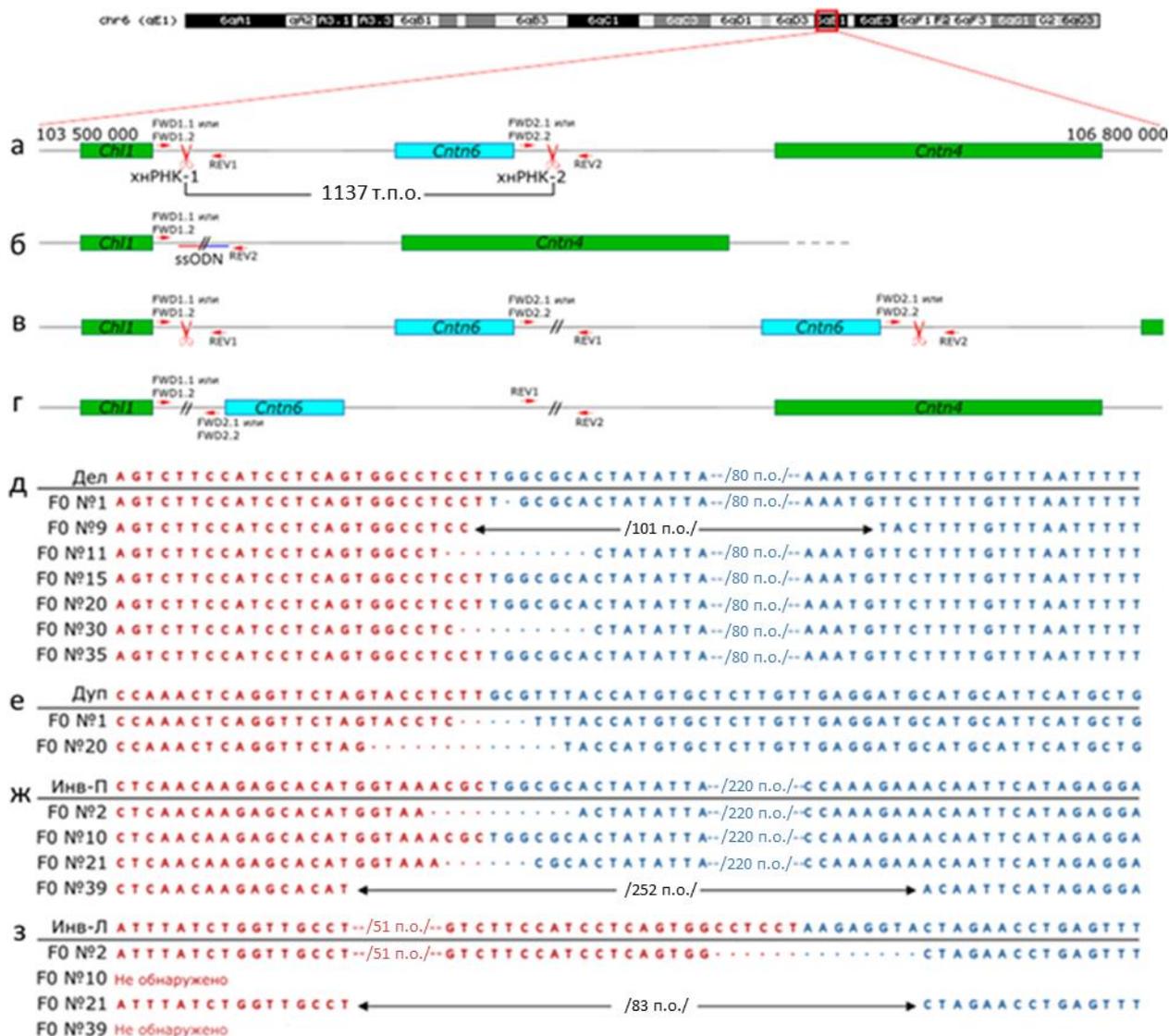


Рисунок 2. Схема целевого локуса у мышей дикого типа и мышей с целевыми модификациями. «а». Схема организации региона от 103 500 000 до 106 800 000 на 6-ой хромосоме мыши, содержащего гены *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4*. Красными стрелками изображены позиции для праймеров: FWD1.1 или FWD1.2, REV1, FWD2.1 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. Ожидаемые последовательности «д» делеции (Дел), «е» дупликации (Дуп), «ж» левой границы инверсии (Инв-Л) и «з» правой границы инверсии (Инв-П) с учетом рестрикции ДНК Cas9-нуклеазой между 3 и 4 нуклеотидами после PAM. Представлены последовательности для 7 мышей F0 с делецией: №1, №9, №15, №20, №30 и №35; двух мышей F0 с дупликацией: №1 и №20; и четырех мышей F0 с инверсией (правая и левая границы): №2, №10, №21 и №39.

Наследование индуцированных CRISPR/Cas9 хромосомных перестроек среди потомства F1

Рисунки 3, 4 и 5 иллюстрируют результаты ПЦР-анализа потомков F1, полученных от скрещивания основателей с мышами линии C57BL/6J. Хорошо видно, что ПЦР-анализ надежно идентифицирует у потомков F1 индуцированные CRISPR/Cas9 делеции (Рисунок 3), дупликации (Рисунок 4) и инверсии (исследовалась только правая граница) (Рисунок 5).

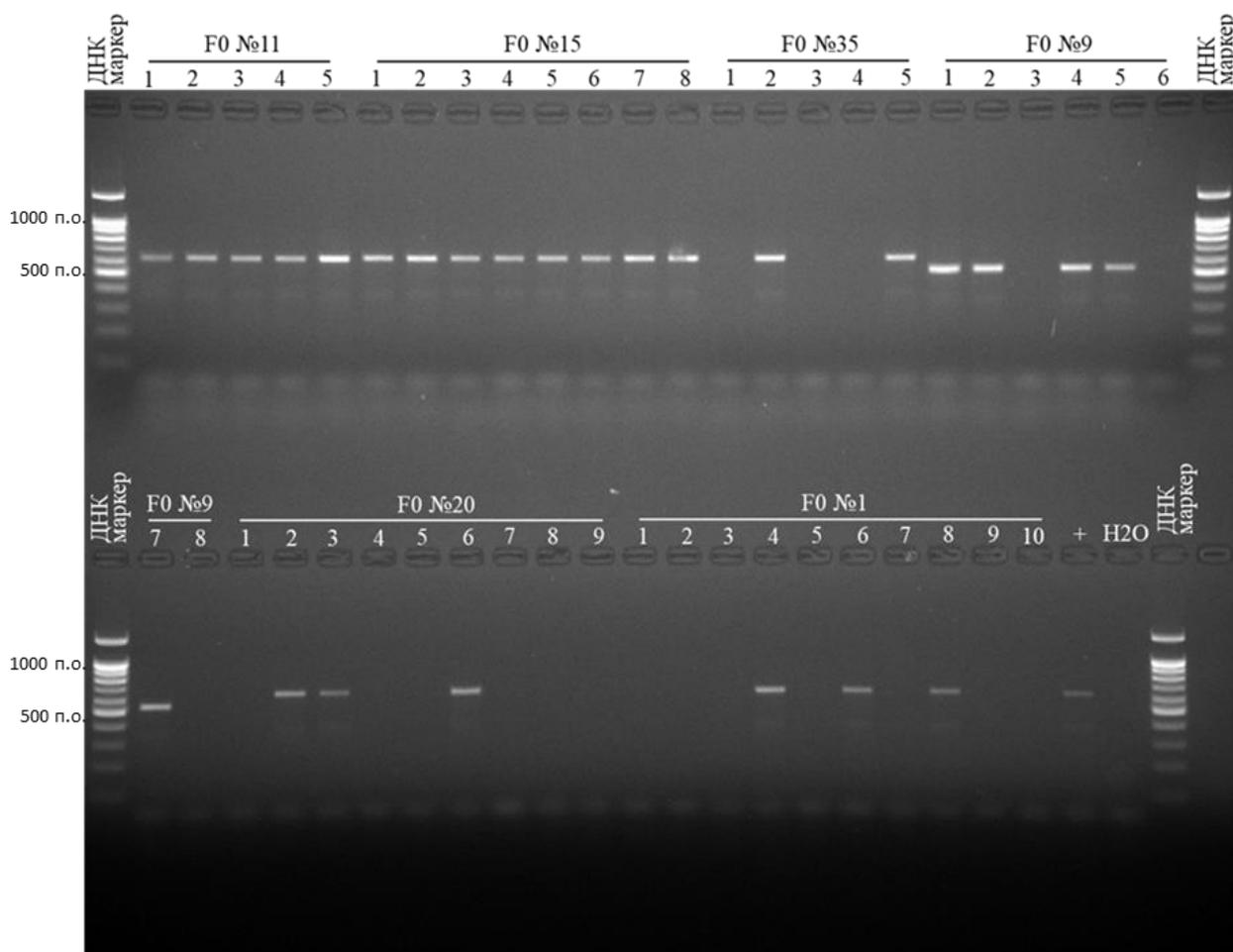


Рисунок 3. ПЦР-анализ делеции (праймеры: FWD1.1 + REV2) у потомков F1, полученных от основателей №11, №15, №35, №9, №20 и №1. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.).

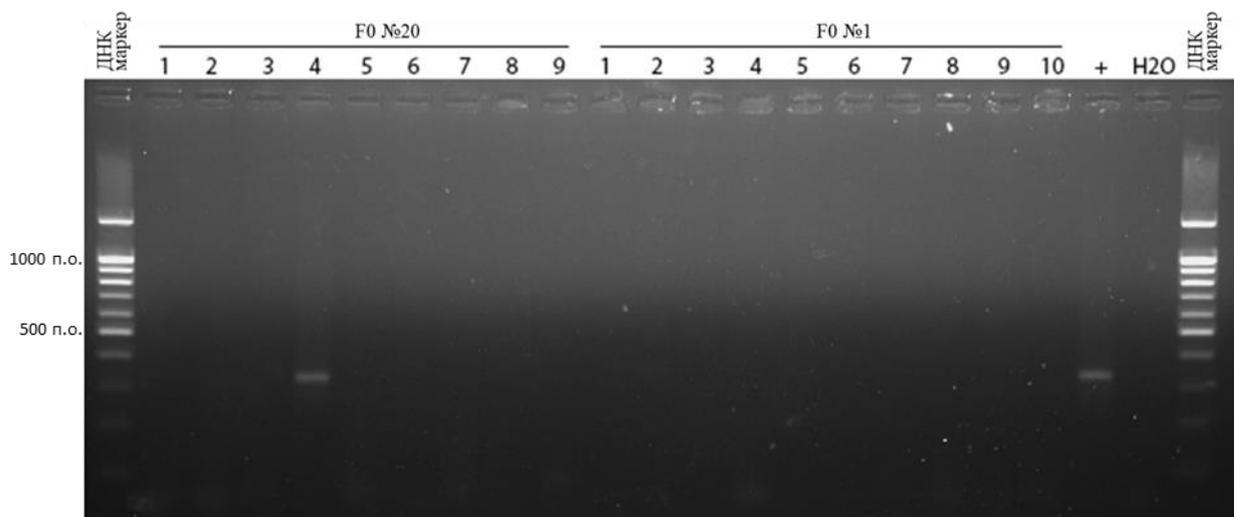


Рисунок 4. ПЦР-анализ (праймеры: FWD2.1 + REV1) дупликации у потомков F1, полученных от основателей №20 и №1. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.).

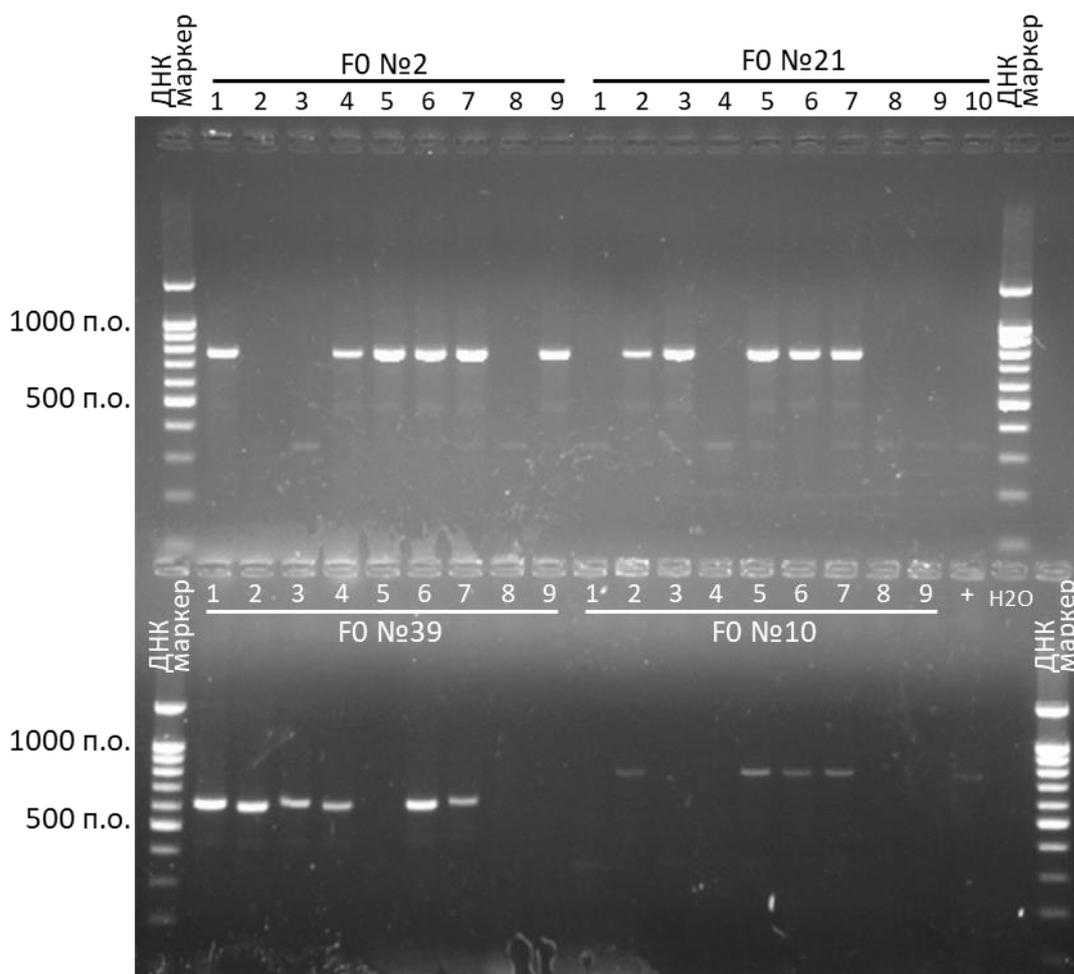


Рисунок 5. ПЦР-анализ инверсии (праймеры: REV1 + REV2) у F1 потомков, полученных от основателей №2, №21, №39 и №10. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.).

Результаты наследования делеций у потомков F1 приведены в Таблице 6. Из этих данных следует, что среди потомков от четырех основателей (№9, №11, №30 и №35) присутствуют как носители-делеций, так и животные дикого типа, что указывает на гетерозиготность тестируемых основателей. Более того, соотношение носителей делеций и животных дикого генотипа среди потомков F1 от основателей №9, №30 и №35 близко к 1:1, несмотря на небольшую выборку (Таблица 6). Среди 12 потомков основателя №11 девять были носителями делеции, а трое животных были дикого типа (Таблица 6). Такое отклонение от ожидаемого соотношения 1:1 может свидетельствовать либо о том, что основатель №11 был мозаик (подробнее ниже) или это результат статистической погрешности из-за небольшого числа потомков.

Таблица 6. Наследование хромосомных перестроек у потомков F1 от основателей-носителей 1137 т.п.о. делеции

Основатель	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

Важно отметить, что все 17 потомков F1 от основателя №15 (Таблица 6) унаследовали делецию, что указывает на его гомозиготный статус по делеции. В связи с этим, нами был проведен дополнительный ПЦР-анализ основателя №15 с целью детекции удаляемого фрагмента (праймеры: FWD-SNP+REV-SNP) и на границы делетируемого фрагмента (праймеры: FWD1+REV1, FWD2+REV2), который не выявил ПЦР-продуктов. Это дополнительно 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.

В Таблице 7 приведены данные по наследованию индуцированных CRISPR/Cas9 инверсий у потомков F1, полученных от скрещивания основателей

№2, №10, №21 и №39 с мышами C57BL/6J. Видно, что среди потомков F1 идентифицируются носители инверсий и животные дикого типа, причем в соотношении близком к 1:1 (Таблица 7). Полученные результаты предполагают, что все основатели были гетерозиготными по инверсии, а их гаметы были двух типов – одни несли инверсию, а другие имели нормальный генотип.

Известно, что использование технологии CRISPR/Cas9, с целью адресных модификаций в геноме оплодотворенных яйцеклеток, нередко сопровождается возникновением мозаицизма среди соматических клеток у основателей. Это важный аспект при использовании технологии CRISPR/Cas9 на экспериментальных гаметах. Основной причиной мозаицизма является то, что целевые изменения в геноме могут происходить, как правило, в одном из гомологов на разных стадиях развития – от одноклеточной до 4-клеточной или последующих стадий развития эмбриона. Как результат, доля соматических и половых клеток-носителей адресных модификаций будет варьировать у основателей в зависимости от стадии развития, на которой произошла эта модификация. Например, если CRISPR/Cas9 индуцированная модификация произошла в одном из гомологов на двухклеточной стадии, то около 50% клеток основателя будут носителями этой целевой модификации, а другие 50% являются клетками дикого типа. При индукции модификаций на последующих стадиях развития эмбриона доля клеток у основателя с целевой модификацией будет уменьшаться в арифметической прогрессии, таким образом формируя мозаицизм различной степени выраженности.

Выше приведены результаты об отсутствии заметных отклонений от 1:1 при анализе наследования делеций у потомков F1 от основателей-носителей делеций №9, №30, №35 и основателей-носителей инверсий №2, №10, №21, №39 (Таблицы 6, 7). Это указывает на примерно равное соотношение гамет, несущих делеции или инверсии, и гамет дикого типа у исследованных основателей. Эти данные предполагают, что образование делеций или инверсий произошло на одноклеточной стадии развития эмбриона только в одном из гомологов.

Сложнее складывается ситуация при наследовании делеций и дупликаций от основателей №1 и №20. Как видно из Таблицы 8, среди потомков выявляются как особи дикого типа, так и особи с делециями или дупликациями, но в разных соотношениях. Обращает на себя внимание, что суммарное соотношение

потомков-носителей делеции или дупликации относительно потомков дикого типа, полученных от основателей №1 и №20, составляет 19:11 и 12:8 соответственно (Таблица 8). То есть потомки с перестройками формируют группу, отдельную от животных дикого типа, причем вторая несколько превалирует над первой. Несомненно, эти результаты свидетельствуют о мозаицизме среди гамет у обоих основателей и, что важно, независимой сегрегации делеции и дупликации.

Таблица 7. Наследование хромосомных перестроек у потомков F1 от четырех основателей с инверсиями

Основатель	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

Таблица 8. Наследование хромосомных перестроек у потомков F1 от основателей-носителей одновременно делеции и дупликации

Основатель	Количество пометов	Количество потомков	Дикий тип	Делеции и	Дупликации
№1	4	30	19	4	7
№20	2	20	12	6	2

Саузерн-блот анализ основателей и их потомков F1

Саузерн-блот гибридизация является одним из эффективных способов исследования структуры геномной ДНК. Нами был проведен анализ геномной ДНК всех основателей-носителей делеций (включая двух носителей делеций и дупликаций) и их потомков F1, полученных скрещиванием F0 с мышами дикого типа. Также был проведен анализ для основателей-носителей инверсий. 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.

На Рисунке 6 показана схема фрагментов, ожидаемых при Саузерн-блот анализе с использованием эндонуклеазы *EcoRV* для левой и правой границ аллеля дикого типа гена *Cntn6* (а, б), вновь образовавшейся границы после делеции (в), дупликации (г), левой (д) и правой (е) границ инверсии. Согласно этой схеме, при использовании меченого зонда к 5'-концу, ожидается детекция рестрикционных фрагментов ДНК размерами: 6601 п.о. у носителей аллеля дикого типа (а), 4250 п.о. у носителей делеции (в), 8238 п.о. у носителей дупликации (г), 3869 п.о. (левая граница) (д) и 8619 п.о. (правая граница) (е) у носителей инверсий. При использовании меченого зонда к 3'-концу ожидается появление фрагментов ДНК размерами: 5887 п.о. у носителей дикого аллеля (б), 4250 п.о. у носителей делеции (в), 8619 п.о. у носителей инсерции (е) (Рисунок 6).

Рисунок 7 иллюстрирует результаты Саузерн-блот анализа геномной ДНК (с использованием меченого зонда к 5'-концу) всех основателей-носителей делеций и некоторых их потомков F1 от скрещивания F0 с мышами линии C57BL/6J. Хорошо видно, что у четырех основателей №11, №30, №9, №35 и их потомков F1 выявляются два фрагмента ДНК ожидаемого размера (Рисунки 6 и 7). Один из фрагментов представляет аллель дикого типа (размером 6600 п.о.), а второй, размером 4250 п.о., представляет аллель с делецией. Важно отметить, что у основателя №9 и у его потомка F1 №43 (F0 №9) фрагмент ДНК от делетированного аллеля имеет более высокую электрофоретическую подвижность (Рисунок 7, слева). Причиной изменения электрофоретической подвижности у этих животных является, описанная выше, потеря 101 п.о. в сайте стыков концов ДНК после делеции (Рисунок 2). Уместно отметить, что этот вывод подкрепляется также данными (изложенными ниже) с использованием меченого 3'-зонда (Рисунок 7, справа). Этот пример показывает неплохую чувствительность Саузерн-блот гибридизации для анализа изменения структуры ДНК.

Не меньший интерес представляют данные анализа геномной ДНК основателя №15 и его потомка F1 №8 (F0 №15) (Рисунок 7). При использовании меченого зонда к 5'-концу (Рисунок 7, слева) можно видеть, что у этого животного присутствует только один фрагмент ДНК размером 4250 п.о., представляющий делеционный аллель, но отсутствует фрагмент, представляющий аллель дикого типа. Как отмечалось выше, результаты наследования 1137 т.п.о. делеции у потомков F1

этого основателя (Таблица 2) указывали на его гомозиготный статус. Таким образом, результаты Саузерн-блот анализа подтвердили независимо гомозиготный статус основателя №15.

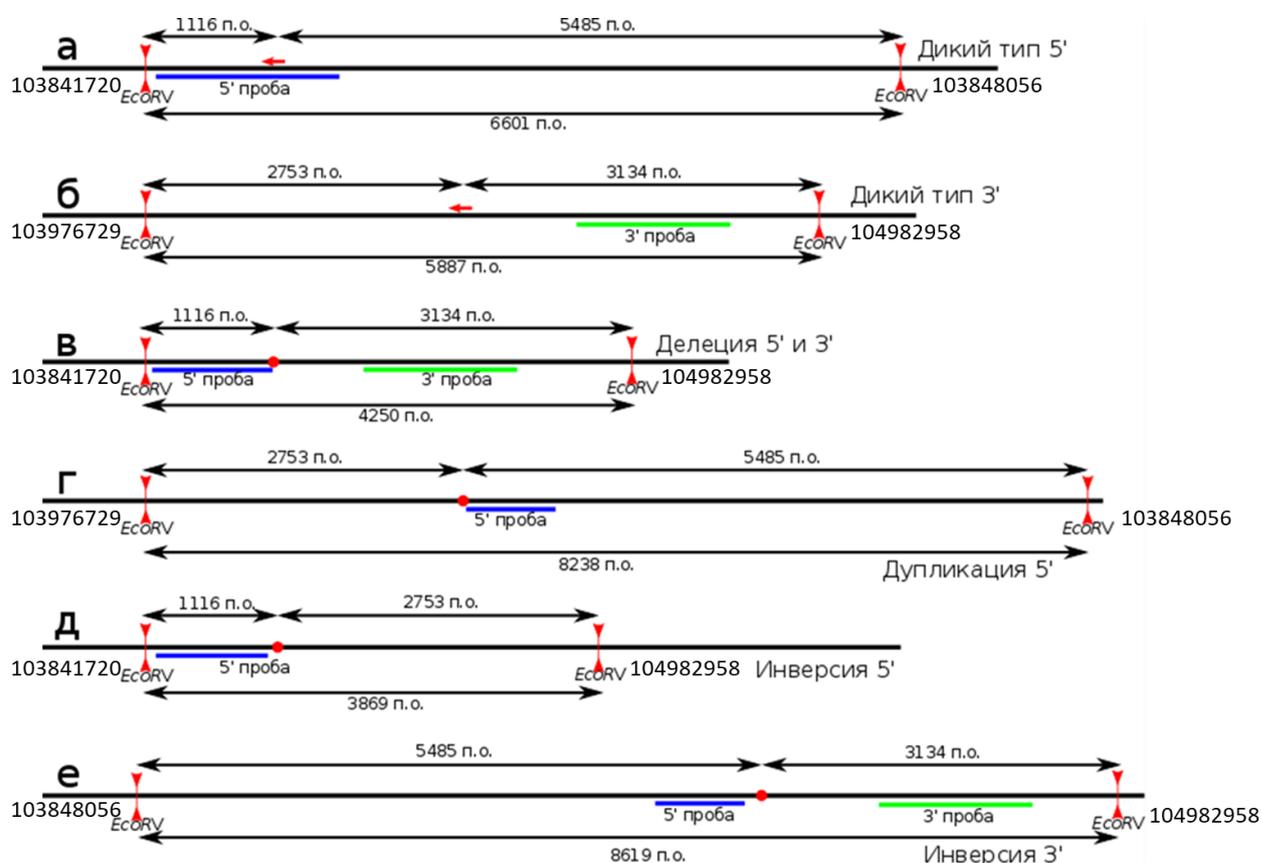


Рисунок 6. Схема ожидаемых фрагментов при детекции перестроек методом Саузерн-блот гибридизации. Красными горизонтальными стрелками изображены позиции целевых сайтов системы CRISPR/Cas9; красной точкой отмечены места стыков; красными вертикальными скобками обозначены сайты рестрикции для *EcoRV*-рестриктазы; синей и зеленой горизонтальной линией изображены 5'- и 3'- проб соответственно; черными стрелками обозначены размеры рестрикционных фрагментов. Возле каждого сайта рестрикции *EcoRV* указаны геномные координаты (версия генома мыши mm10).

а – схема рестрикции для генома дикого типа правой границы (позиция хнРНК-1);

б – схема рестрикции для генома дикого типа левой границы (позиция хнРНК-2);

в – схема рестрикции для стыка делеции;

г – схема рестрикции для стыка дупликации;

д, е – схема рестрикции для правой и левой границ инверсии.

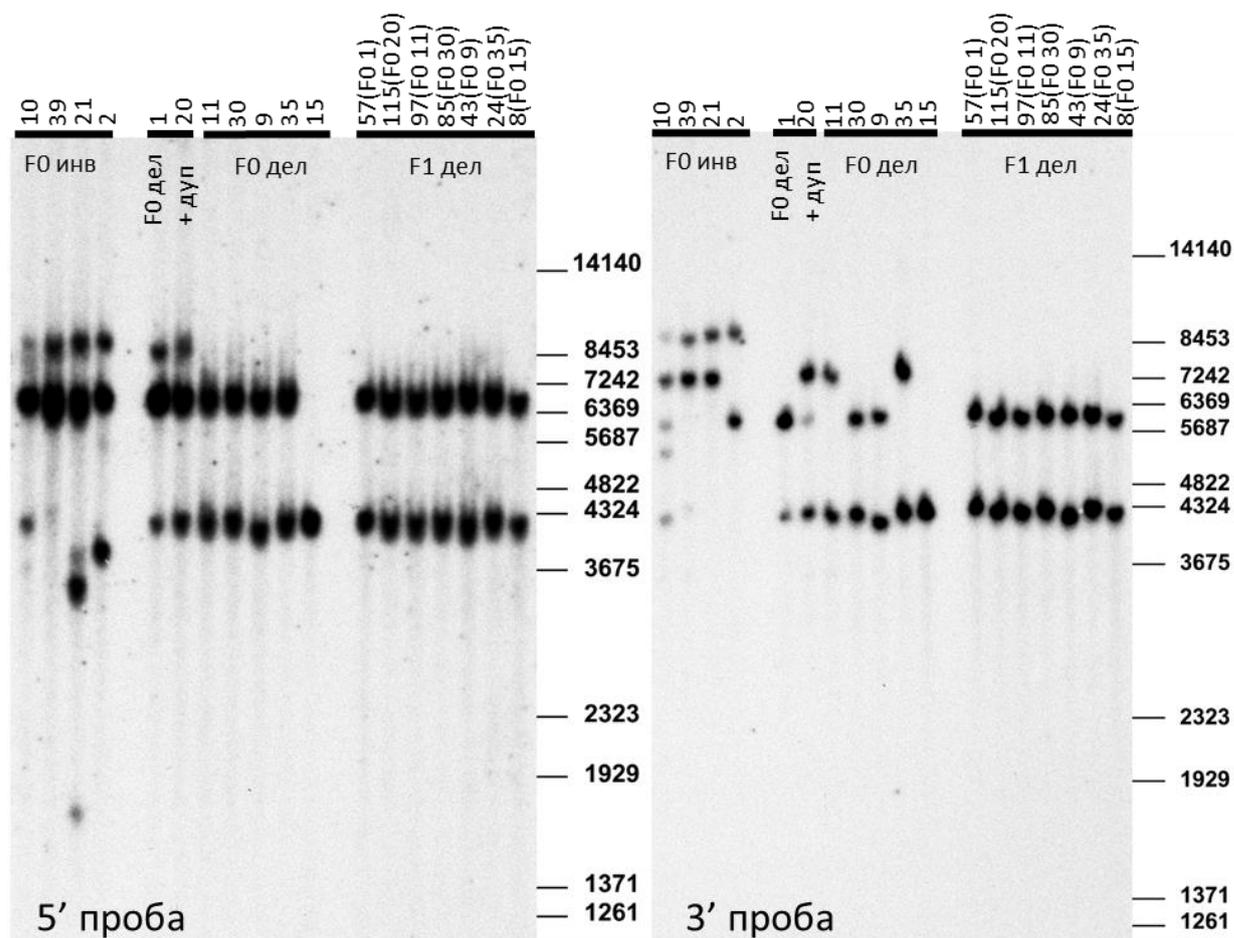


Рисунок 7. Результаты Саузерн блот анализа геномной ДНК (с использованием меченых 5'- и 3' – зондов левая и правая стороны соответственно):

- основателей-носителей делеций №11, №30, №9, №35 и №15 их F1 потомков №97 (F0 №11), №85 (F0 №30), №43 (F0 №9), №24 (F0 №35) и №8 (F0 №15);
- основателей-носителей дупликации №1 и №20 и их F1 потомков №57 (F0 №1) и №115 (F0 №20);
- основателей-носителей инверсий №10, №39, №21 и №2.

Справа – маркеры молекулярных весов в п.о.

Результаты Саузерн-блот анализа, с использованием меченого зонда к 3'-концу у основателей-носителей делеций №30 и №9 и их потомков F1, показали присутствие фрагментов ДНК ожидаемых размеров (Рисунки 6 и 7): выявляются фрагменты ДНК, соответствующие аллелю дикого типа размер 5887 п.о.) и аллелю с делецией (размер 4250 п.о.) (Рисунок 7, справа). Что касается результатов Саузерн-блот анализа основателей №11 и №35, необходимы дополнительные пояснения. У обоих основателей выявляются по два фрагмента, один из которых

совпадает по длине с ожидаемым для аллеля с делецией, а второй фрагмент размером около 7500 п.о., наиболее вероятно, соответствует фрагменту ДНК, характерному для аллеля дикого типа специфичного линии СВА/Ј (Рисунок 7, справа). Важно также отметить, что результаты Саузерн-блот анализа с использованием меченого зонда к 3`-концу у основателя №15 подтвердили его гомозиготный статус, поскольку был выявлен только один рестрикционный *EcoRV* фрагмент, который соответствует аллелю с делецией (Рисунок 7, справа).

Набор фрагментов ДНК, выявленный с помощью Саузерн-блот анализа, с мечеными зондами к 5` и 3`-концам, основателя №1 и его потомка F1 №57 (F0 №1) совпадают с ожидаемыми (Рисунок 6): выявляются фрагменты ДНК размером 4250 п.о. аллеля с делецией, фрагмент 8238 п.о. аллеля с дупликацией и фрагмент 5887 п.о. аллеля дикого типа линии мышей С57BL/6Ј (Рисунок 7, справа и слева).

По данным Саузерн-блот анализа (с меченым зондом к 5`-концу) у основателя №20 и его потомка F1 №115 (F0 №20) выявляются ожидаемые фрагменты ДНК: 4250 п.о. аллеля с делецией, 8238 п.о. аллеля с дупликацией, и 5887 п.о. аллеля дикого типа (Рисунок 7 слева). Однако, при гибридизации меченого зонда с 3`-концом, выявляется два фрагмента, один из которых 4250 п.о. совпадает с ожидаемым для аллеля с делецией, а второй, наиболее вероятно, соответствует фрагменту характерному для аллеля дикого типа линии СВА/Ј (фрагмент длиной около 7500 п.о.) (Рисунок 7, справа).

По данным Саузерн-блот анализа с зондом к 3`-концу, у основателей №10, №39, №21, №20, №11 и №35 был обнаружен одинаковый фрагмент длиной около 7500 п.о., но при этом не выявлялся фрагмент размером 5887 п.о., который должен соответствовать аллелю дикого типа (Рисунок 7, справа). Этот результат может быть объяснен особенностью дизайна эксперимента: так как зиготы были получены от самок-гибридов первого поколения СВА/Ј x С57BL/6Ј, покрытые самцами линии С57BL/6Ј, у половины животных будет присутствовать в гетерозиготном состоянии locus, унаследованный от линии СВА/Ј. Как было установлено ранее, на стадии подбора праймеров для генотипирования, у линии СВА/Ј присутствует невыявленный ранее полиморфизм в районе целевого сайта второй хРНК. По этой причине, выявленный фрагмент длиной около 7500 п.о., наиболее вероятно, соответствует аллелю дикого типа, унаследованного от мышей линии СВА/Ј.

Данные гибридизации с обеими пробами для основателя №2 с инверсией полностью совпадают с ожидаемыми: выявляются аллели дикого типа и аллели, которые соответствуют правой и левой границам инверсии (Рисунок 7). У основателей №10, №39 и №21 по данным Саузерн-блот анализа, с использованием 5`-зонда, выявляются фрагменты ожидаемой длины, которые соответствуют аллелю дикого типа и правой границы инверсии, но не обнаруживается фрагмент, который должен соответствовать левой границе (Рисунок 7). Однако, у основателя №10 выявляется фрагмент длиной около 4200 п.о., у основателя №39 дополнительных фрагментов не выявляется, а у основателя №21 выявляется фрагмент длиной около 3400 п.о. (рисунок 7). По данным гибридизации с 3`-пробой у основателей №10, №39 и №21 выявляются фрагменты, соответствующие правой границе инверсии и фрагменты длиной около 7500 п.о., а у основателя №10 дополнительно выявляется три слабых сигнала длиной около 6600 п.о., 5500 п.о. и 4200 п.о. (Рисунок 7).

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 не предсказанные 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

Как отмечалось выше, секвенирование ПЦР-продуктов 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 (Рисунок 2). Кроме сайта стыков двух копий у дупликации (или средняя граница дупликации) есть еще левая и правая границы, которые фактически являются местами сайтов для хНРНК-1 и хНРНК-2 соответственно. В связи с этим, для определения левой и правой границ дупликации у гомозиготного носителя дупликации F2 №5 (потомка основателя №1) был проведен ПЦР анализ (с последующим секвенированием ПЦР-продуктов) с использованием праймеров FWD1.1+REV1 и FWD2.1+REV2 соответственно. В результате было установлено, что у гомозиготы F2 №5 имеется потеря 18 п.о. у левой границы дупликации, 5 п.о. в стыке двух копий и 1 п.о. у правой границы дупликации (Рисунок 8). Кроме того, две нуклеотидные замены были идентифицированы вблизи сайта соединения обеих копий: С в позиции chr6:104 979 804 заменилась на А, а С в позиции chr6:104 979 805 на Т (Рисунок 13).

Сходный по дизайну эксперимент по определению границ дупликации у другого гомозиготного животного F3 №22 (потомка основателя №20), но с использованием другой пары праймеров для определения левой границы: FWD1.2+REV1. В результате было установлено, что у гомозиготного животного F3 №22 имеется потеря 172 п.о. у левой границы, 13 п.о. в сайте стыка двух копий и 4 п.о. у правой границы дупликации (Рисунок 8). Кроме того, была выявлена замена последовательности GTTT на CCCA вблизи делеции 172 п.о. (Рисунок 8).

Данные об изменении последовательностей левой и правой границ дупликаций у обоих основателей свидетельствуют о том, что в целевых сайтах хНРНК произошли двунитевые разрывы, которые были репарированы по пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Кроме того, это позволило нам быстро и достоверно, при помощи метода ПЦР, определять гомозиготных носителей дупликаций.

Полногеномное секвенирование двух гомозиготных по дупликации животных F2 №5 и F3 №22 полностью подтвердило данные секвенирования по Сенгеру левой и

правой границ дупликаций, при этом дополнительных геномных аномалий обнаружено не было.

Важно также отметить, что полногеномное секвенирование не выявило перестроек в дублицированной фрагменте и в прилежащих районах, от начала гена *Chl1* до конца гена *Cntn4*, а примененный протокол не нарушил целостность обеих копий и, в целом, района локализации генов *Chl1-Cntn6-Cntn4* 6-ой хромосомы у основателей №1 и №20.

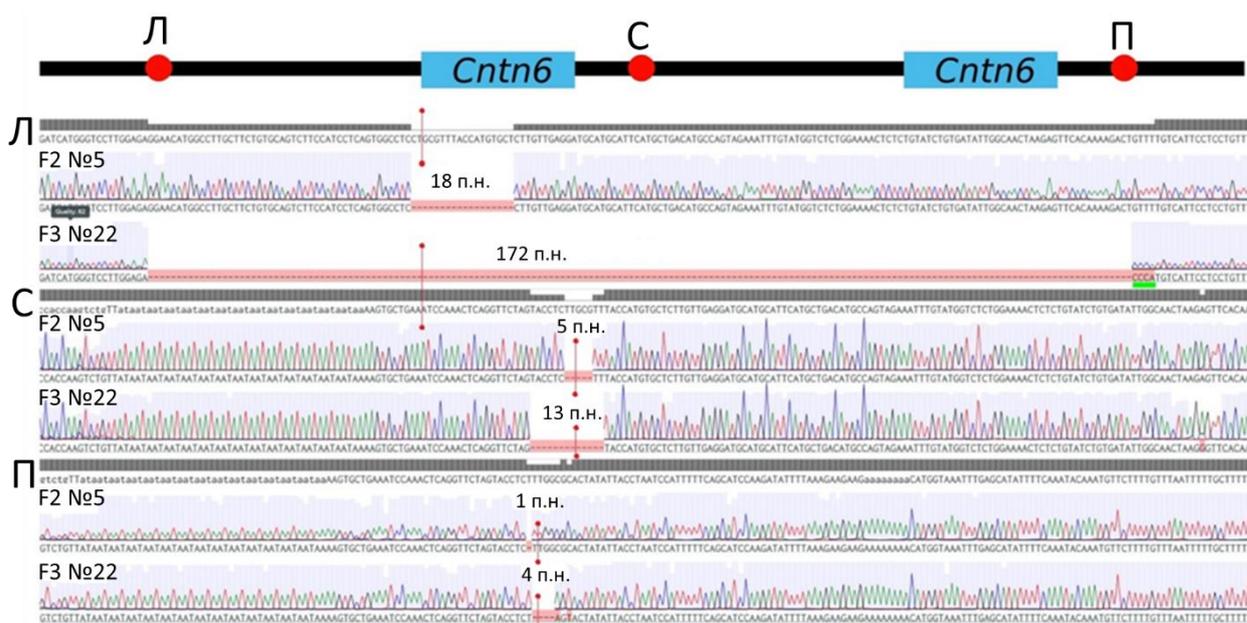


Рисунок 8. Схема левой (Л), правой (П) границ 2274 т.п.о. копий дупликации и сайта их соединения (С) (вверху); ниже последовательности ДНК левой и правой границ и сайта соединения двух копий у гомозиготных мышей F2 №5 и F3 №22 по индуцированной CRISPR/Cas9 дупликации: F2 №5 (потомок основателя №1) и F3 №22 (потомок основателя №20).

SNP анализ основателей-носителей дупликаций

Как было отмечено выше, эксперимент по получению мышей, несущих целевые хромосомные перестройки, был проведен на зиготах, которые были получены от самок-гибридов первого поколения C57BL/6J x CBA/J, которые были покрыты самцами линии C57BL/6J. Использование такой схемы предполагает, что половина мышей, развившихся из таких зигот будет иметь один аллель *Cntn6*, специфичный для линии C57BL/6J, а другой аллель для линии CBA/J. Для гена *Cntn6* в базе данных «Jaxon Laboratory» (www.informatics.jax.org) описан SNP в

20-ом экзоне в позиции chr6: 104848175 (mm10): у линии C57BL/6J – T, у линии CBA/J – C.

Для мышей-основателей №1 и №20 был проведен ПЦР-анализ с парами праймеров FWD-SNP + REV-SNP (Таблица 1), после чего ПЦР-продукты были секвенированы. Было установлено, что у основателя №1 оба аллеля *Cntn6* происходят от линии C57BL/6J, а у основателя №20 один аллель от линии C57BL/6J, а второй от линии CBA/J. Затем, был проведен анализ SNP в позиции chr6:104848175 (mm10) у потомков F1 с дупликацией, которые были получены от скрещивания основателя №20 с мышами линии C57BL/6J. Этот анализ SNP показал, что все три аллеля *Cntn6* были специфичны для мышей линии C57BL/6J. Из этого анализа следует, что дублицированный аллель у основателя №20 произошел от гомолога 6-ой хромосомы линии C57BL/6J. В результате можно предположить, что дублицированный аллель у основателя №20 произошел из одной хромосомы линии C57BL/6J. Таким образом, наиболее вероятным механизмом образования дубликаций является межхроматидный обмен, а не обмен между хромосомами.

FISH анализ метафазных хромосом основателей-носителей, индуцированных CRISPR/Cas9 делеций

Как уже упоминалось выше, применение технологии CRISPR/Cas9 на зиготах нередко сопровождается мозаицизмом среди соматических клеток, поскольку целевые изменения в геноме могут происходить на разных стадиях развития эмбриона – от одноклеточной до 4-клеточной или последующих стадиях. Таким образом, соотношение соматических и половых клеток-носителей адресных модификаций будет варьировать у основателей в зависимости от стадии развития – от отсутствия мозаицизма при модификации генома на одноклеточной стадии до прогрессивно снижающейся доли модифицированных клеток относительно немодифицированных.

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

Одним из прямых методов исследования этих двух аспектов при адресных хромосомных перестройках является FISH анализ. Ниже приведены данные FISH анализа метафазных хромосом в культивируемых клетках пяти основателей-носителей делеции и двух основателей-носителей одновременно делеции и дупликации.

FISH был проведен на препаратах митотических хромосом культур первичных фибробластов, которые были получены от пяти взрослых основателей-носителей делеций №11, №15, №30 и №35 и двух взрослых основателей-носителей делеций и дупликаций №1 и №20. Для проведения FISH (схема представлена на Рисунке 9) было выбрано четыре ВАС клона, которые были использованы для приготовления меченых зондов: J8, E20, I15 и K19. Зонды J8, E20 и I15 (Рисунок 9, зеленый цвет) суммарным размером 574732 п.о. маркируют делетируемый фрагмент (размер 1137 т.п.о.), а зонд K19 (Рисунок 9, выделен красным) выступает в качестве маркера 6-ой хромосомы мыши и расположен за 10 000 т.п.о. от делеции.

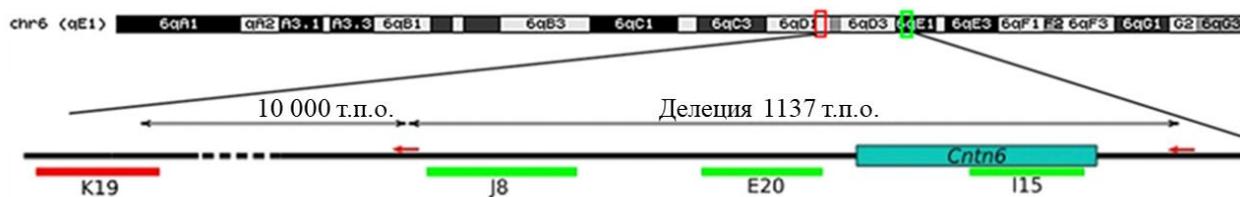


Рисунок 9. Схема расположения зондов при FISH-анализе. Зонд K19 маркирует 6-ую хромосому и располагается за 10 000 т.п.о. от района целевой делеции, обозначен на схеме красным цветом. Зонды J8, E20 и I15 маркируют делетируемый фрагмент, обозначены на схеме зеленым цветом.

В Таблице 9 и на Рисунке 10 приведены результаты FISH анализа метафазных пластинок клеток, полученных от основателей №1, №9, №11, №15, №20, №30 и №35. В зависимости от количества выявляемых зеленых сигналов от зонда, маркирующего район 1137 т.п.о. делеции, и красный, маркирующий 6-ую хромосому, можно выделить четыре типа метафазных пластинок:

- метафазные пластинки с красным и зеленым сигналами на обоих гомологах – соответствуют клеткам дикого типа или клеткам с дупликацией (Рисунок 10г);

- метафазные пластинки с красным сигналом на обоих гомологах и зеленым сигналом только на одном из гомологов хромосомы 6 – соответствуют клеткам гетерозиготным по делеции (Рисунок 10а, б);
- метафазные пластинки только с красным сигналом на обоих гомологах, но негативные по зеленому сигналу – соответствуют клеткам гомозиготным по делеции (Рисунок 10б);
- метафазные пластинки с красным и зеленым сигналами на трех гомологах – соответствуют клеткам с трисомией по 6-ой хромосоме.

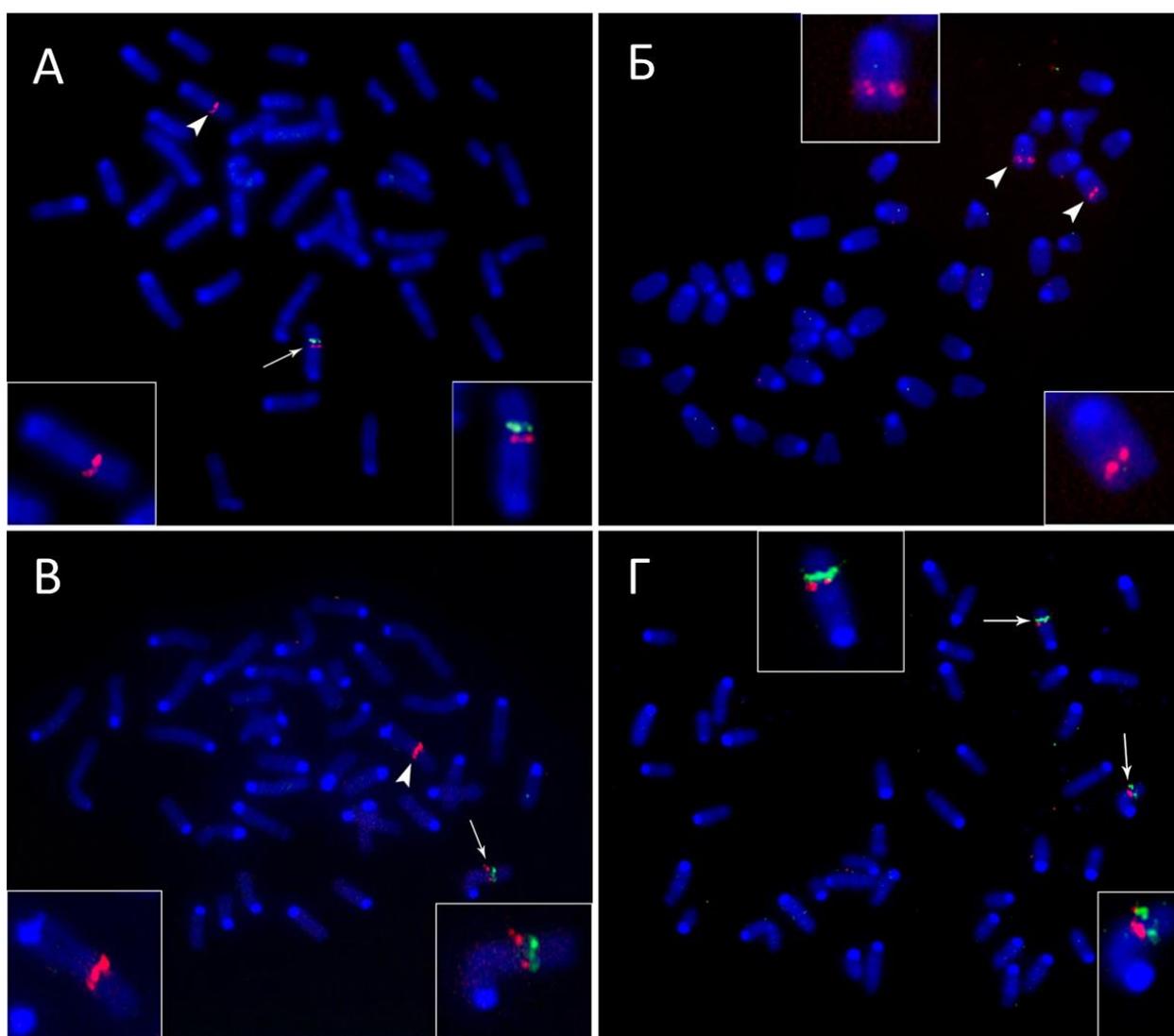


Рисунок 10. Примеры FISH-анализа клеток основателей: гетерозиготных (а и в), гомозиготного по делеции (б) и гетерозиготного по дупликации гена *Cntn6* (г). Проба К19, маркирующая регион 6 хромосомы за 10000 т.п.о. от района гена *Cntn6* детектируется красным цветом. Проба I15, маркирующая делетируемый фрагмент детектируется зеленым цветом.

По данным FISH анализа (Таблица 9, Рисунок 10а) 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. Эти данные согласуются с данными наследования делеции у потомков F1 основателей №30 и №35 (Таблица 6). Отсутствие мозаицизма в исследованных клетках обоих основателей предполагает, что делеция 1137 т.п.о. возникла у них на одноклеточной стадии в одном из пронуклеусов.

Что касается результатов FISH анализа клеток основателей №9 и №11 – гетерозиготных носителей делеции (Таблица 6), 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 9), то есть имели фенотип дикого типа. Наличие незначительного количества клеток может указывать на клеточный мозаицизм у основателей №9 и №11 при допущении существенного селективного преимущества клеток-носителей делеции относительно клеток дикого генотипа, что маловероятно. В связи с этим, наиболее вероятным объяснением единичных клеток дикого генотипа у этих основателей следует рассматривать погрешность метода FISH. Эти данные также согласуются с данными наследования делеции у потомков F1 основателей №9 и №11 (Таблица 6).

Согласно данным по наследованию делеции у потомков F1 основателя №15 (Таблица 6), его статус был определен как гомозиготный по делеции. FISH анализ (Таблица 9) показал, что 100% исследованных клеток основателя №15 позитивны по красному сигналу на обоих гомологах и демонстрируют полное отсутствие клеток позитивных по зеленому сигналу (Рисунок 10 б). Эти данные подтверждают независимо гомозиготность основателя №15 по делеции и, как следствие, предполагает возникновение индуцированной делеции на одноклеточной стадии, причем одновременно в обоих пронуклеусах.

Важно отметить, что по результатам FISH анализа хромосом культивируемых клеток от пяти основателей-носителей 1137 т.п.о. делеции 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.

FISH-анализ хромосом основателей №1 и №20 выявил мозаицизм среди исследованных клеток: 34,4% и 58,5% были идентифицированы как гетерозиготные по делеции у этих основателей соответственно. Остальные исследованные клетки у основателей №1 и №20 – 66,3% и 39,0% соответственно представлены двумя типами: они либо имеют фенотип дикого типа, либо являются носителями дупликации (Таблица 9). Используемый метод FISH не позволяет надежно дискриминировать клетки, гомозиготные по аллелю дикого типа, и клетки, несущие одновременно дупликацию и аллель дикого типа. Интересно, что у обоих основателей №1 и №20 были идентифицированы 2,3% и 2,5% метафазных пластинок с трисомией по 6-ой хромосоме соответственно (Таблица 9).

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 (схематично механизм представлен на рисунке 11) [Reams, Roth, 2015]. Ниже, в разделе «Заключение» будет рассмотрена схема (Рисунок 16) предполагаемого механизма межхроматидного обмена.

Таблица 9. Результаты FISH анализа метафазных хромосом в культивируемых клетках от основателей-носителей делеции и дупликации

Основатель	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%)

Интегральная оценка внутриутробного и постнатального развития гомо- и гетерозиготных носителей делеций 1137 т.п.о. и дупликаций 2374 т.п.о. относительно генотипа дикого типа

В обзоре литературы отмечалось, что у гетерозиготных носителей хромосомных перестроек в районе 3p26 человека, затрагивающие ген *CNTN6*, проявляется комплекс психоневрологических нарушений, включая умственную отсталость, и морфозы. Важно также отметить, что у человека не описаны случаи гомозиготного носительства таких перестроек, что возможно связано с их летальным эффектом в период внутриутробного развития. В связи с этим, представляется актуальным исследовать этот аспект у экспериментальных мышей, носителей, индуцированных CRISPR/Cas9, делеций 1137 т.п.о. и дупликаций 2374 т.п.о., вовлекающих ген *Cntn6*. Для реализации этих замыслов необходимо было получить потомков гомо- и гетерозиготных носителей делеций и дупликаций, а затем дать интегральную оценку их эффектов на внутриутробное развитие в сравнении с развитием мышей дикого типа по уровню рождения потомков исследуемых генотипов.

А. Генотипирование гомо- и гетерозиготных потомков-носителей делеции 1137 т.п.о. и аллеля дикого типа, родившихся от скрещивания гетерозиготных потомков основателей №30 и №20

Оценить возможное отрицательное влияние гомо- или гетерозиготного носительства делеций во время внутриутробного развития возможно классическим способом оценки расщепления генотипов потомков, которые получены в результате скрещивания между собой 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 и мышей дикого типа нами были выбраны потомки основателя №30, поскольку он развился из экспериментальных гамет линии C57BL/6J, то есть имеет генетический фон инбредной линии. При получении этих животных были проведены скрещивания между гетерозиготными самцами и самками F2 и F3 поколения от основателя №30. В результате скрещивания шести гетерозиготных пар родилось 44 потомка,

со средним уровнем плодовитости 7,3 потомка на помет, что является характерным для линии C57BL/6J (Таблица 10).

Кроме линии мышей, полученной от основателя №30, для оценки внутриутробного развития также были использованы потомки от основателя №20. Для получения гомо- и гетерозиготных по делеции и мышей дикого типа было проведено 10 скрещиваний между гетерозиготными носителями делеций между потомками 4-5 поколения. В этом эксперименте наблюдалось рождение 104 потомков (средний уровень плодовитости свыше 10 потомков на помет). Увеличение рождаемости в данном случае можно объяснить частичным гибридным генотипом использованной линии.

Идентификация гомо-, гетерозиготных по делеции и дикого типа мышей в однодневном возрасте была основана на присутствии и отсутствии ПЦР-продуктов (Рисунок 11):

- 1) У мышей дикого типа при помощи ПЦР определялись сохраненные сайты обеих хнРНК (пары праймеров: FWD1.1/FWD1.2 + REV1; FWD2.1/FWD2.2 + REV1), а также детектировался делелируемый фрагмент ДНК (пара праймеров FWD-SNP + REV-SNP). При этом ПЦР на делеционный стык (пара праймеров FWD1.1+REV1 или FWD1.2+REV1) был отрицательным;
- 2) У гомозиготных по делеции мышей по результатам ПЦР определялся только делеционный стык (пара праймеров FWD1.1+REV1 или FWD1.2+REV1). ПЦР-продукты с использованием других пар праймеров не детектировались;
- 3) Гетерозиготные по делеции мыши выявлялись по присутствию всех ПЦР-продуктов.

Результаты генотипирования родившихся 44 потомков (линия основателя №30) показали, что 14 из них имели генотип дикого типа, 22 – гетерозиготный и 9 – гомозиготный (Таблица 10). Из данных Таблицы 10 следует, что характер наследования трех генотипов близок к ожидаемому при равенстве их внутриутробной выживаемости ($p > 0,5$, критерий χ^2), что свидетельствует об отсутствии негативного влияния гомо- и гетерозиготного носительства делеции в период внутриутробного развития эмбрионов.

Результаты ПЦР анализа 104 потомков, представленные в Таблице 10, показывают, что распределение генотипов потомков соответствуют ожидаемым при равенстве их вклада в выживаемость исследованных генотипов. В целом, эти результаты свидетельствуют об отсутствии заметного негативного эффекта на внутриутробное развитие эмбрионов как гомозиготных, так и гетерозиготных по делеции по сравнению с эмбрионами дикого типа у потомков основателя №20 ($p > 0,25$, критерий χ^2).

В целом, эти результаты свидетельствуют об отсутствии заметного негативного эффекта на внутриутробное развитие эмбрионов как гомозиготных, так и гетерозиготных по делеции по сравнению с эмбрионами дикого типа у потомков основателей №20 и №30.

Таблица 10. Наследование делеции 1137 т.п.о. у потомков, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных потомков основателей №20 и №30.

Линия основателя	Всего потомков	Генотип потомков		
		Дикий тип	Гетерозиготы	Гомозиготы
№20, фактическое	104	22	60	22
№20, ожидаемое	104	26	52	26
№30, фактическое	44	14	21	9
№30, ожидаемое	44	11	22	11
Суммарные данные	148	36	81	31
Ожидаемые данные	148	37	74	37

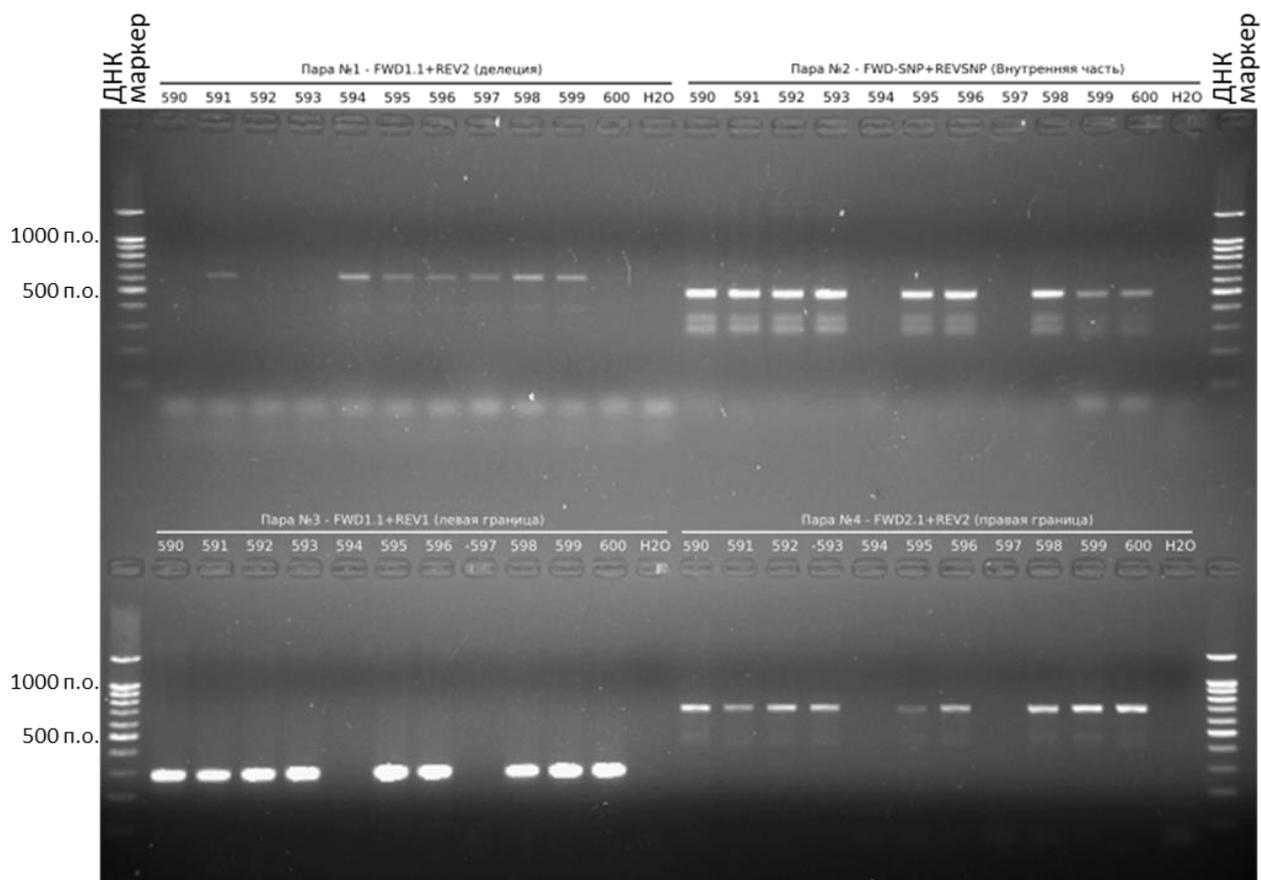


Рисунок 11. Анализ потомков от скрещивания гетерозиготных мышей, потомков основателя №30-носителя делеции. Ниже сплошной линии указаны индивидуальные номера животных, а выше ее, использованные праймеры для генотипирования. Пара праймеров №1 (FWD1.1+REV2) была использована для определения делеционного аллеля, пара праймеров №2 (FWD-SNP+REV-SNP) была использована для определения удаляемого фрагмента, пары праймеров №3 (FWD1.1+REV) и №4 (FWD2.1+REV2) были использованы для определения сохранности сайтов для хнРНК-1 и хнРНК-2 соответственно. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.). Например, животное №590 имеет генотип дикого типа, животное №591 является гетерозиготой, а животное №594 – гомозигота по делеции.

Б. Генотипирование гомо- и гетерозиготных носителей дупликации 2374 т.п.о. и аллелей дикого типа, родившихся от скрещивания гетерозиготных потомков основателей №1 и №20

Как отмечалось выше (раздел: «Характеристика границ дупликаций 2374 т.п.о. и полногеномное секвенирование гомозиготных животных-носителей дупликации»), левые границы делеций у потомков основателей №1 и №20, несущих одновременно делецию и дупликацию, различаются: делеция у потомков основателя №1 сопровождается потерей 18 п.о. (chr6:103842569-103842586, GRCm38/mm10), тогда как делеция потомка основателя №20 имеет потерю 172 п.о. (chr6: 103842523-103842694, GRCm38/mm10). Примеры генотипирования гомо- и гетерозиготных носителей дупликации, и животных дикого типа среди потомков, полученных при скрещивании между собой гетерозигот-потомков основателей №1 и №20 представлены на Рисунках 12 и 13 соответственно.

В эксперименте по скрещиванию мышей первого поколения основателя №1 было использовано три пары гетерозиготных животных по дупликации, от которых было получено 54 потомка в шести пометах (Таблица 11). Как следует из Таблицы 11, средний уровень плодовитости экспериментальных животных составил девять потомков на помет, что заметно выше, чем у мышей C57BL/6J, но характерно для гибридов C57BL/6J x CBA/J. Генотипирование однодневных животных показало, что среди 54 потомков 14 имели генотип дикого типа, а 23 и 17 были идентифицированы как гетеро- и гомозиготы соответственно (Таблица 11).

Таблица 11. Наследование дупликации 2374 т.п.о у потомков, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных потомков основателей №1 и №20.

Линия основателя	Всего потомков	Генотип потомков		
		Дикий тип	Гетерозиготы	Гомозиготы
№1, фактическое	54	14	23	17
№1, ожидаемое	54	13,25	26,5	13,25
№20, фактическое	34	7	15	12
№20, ожидаемое	34	8,25	16,5	8,25
Суммарные данные	88	21	38	29
Ожидаемые данные	88	22	44	22

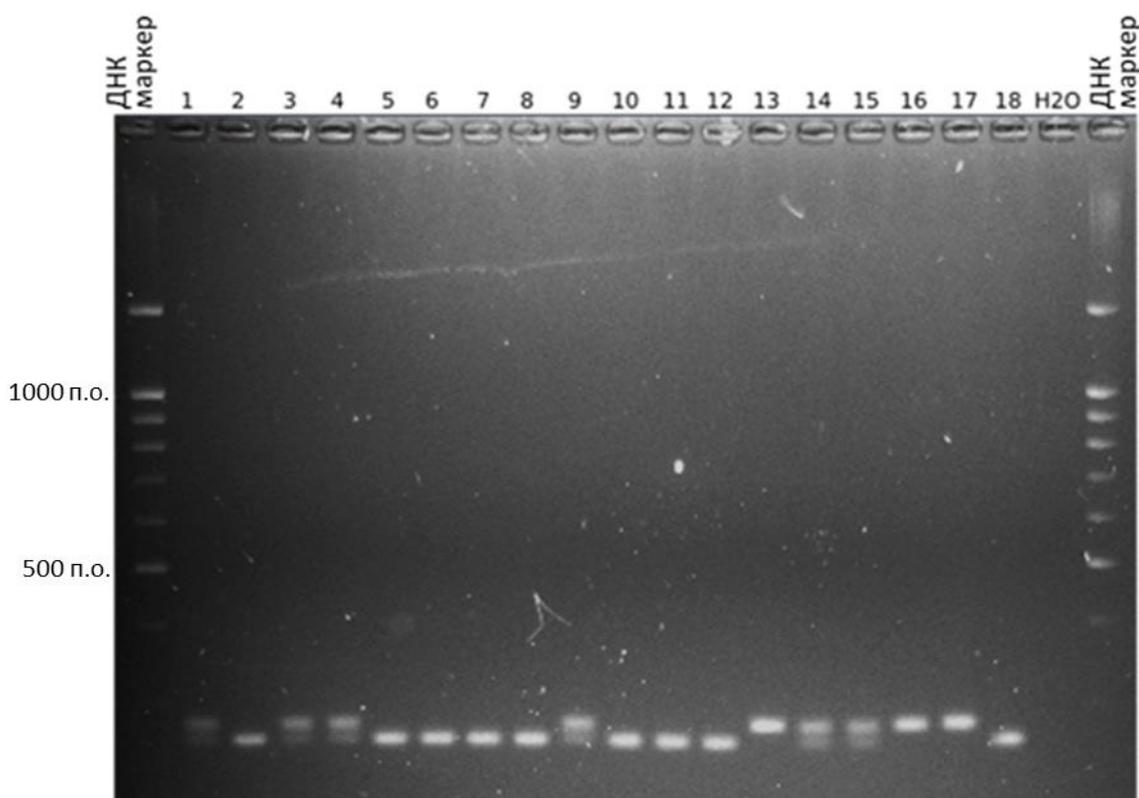


Рисунок 12. Гель-электрофорез ПЦР продуктов (праймеры FWD1.1+REV1) животных, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных мышей-потомков основателя №1. «Тяжелый бэнд» (278 п.о.) соответствует аллелю дикого типа, «легкий бэнд» (260 п.о.) – аллелю с дупликацией. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.). Например, животное №1 – гетерозигота, №2 – гомозигота по дупликации, а №13 имеет генотип дикого типа.

В эксперименте по скрещиванию мышей второго поколения основателя №20 были использованы три пары гетерозиготных по дупликации животных, от которых было получено четыре помета – 34 потомков, то есть средний уровень плодовитости был 8,25 потомков на помет (Таблица 11). Результаты генотипирования однодневных животных показали, что среди 34 потомков было выявлено 7 генотипов дикого типа, 15 гетерозиготных и 12 гомозиготных носителей дупликации соответственно (Таблица 11).

Из результатов Таблицы 11 следует, что распределение генотипов у потомков основателей №1 и №20, носителей дупликации, соответствуют ожидаемым при равной внутриутробной выживаемости эмбрионов исследованных генотипов ($p > 0,35$, критерий χ^2). Небольшое превышение гомозиготных и незначительный

дефицит гетерозигот по дупликации потомков относительно ожидаемого в обеих линиях основателей предположительно объясняется недостаточностью выборки. Суммированные результаты по наследованию дупликации в линиях основателей №1 и №20 (Таблица 11) подтверждает это предположение ($p > 0,2$, критерий χ^2).

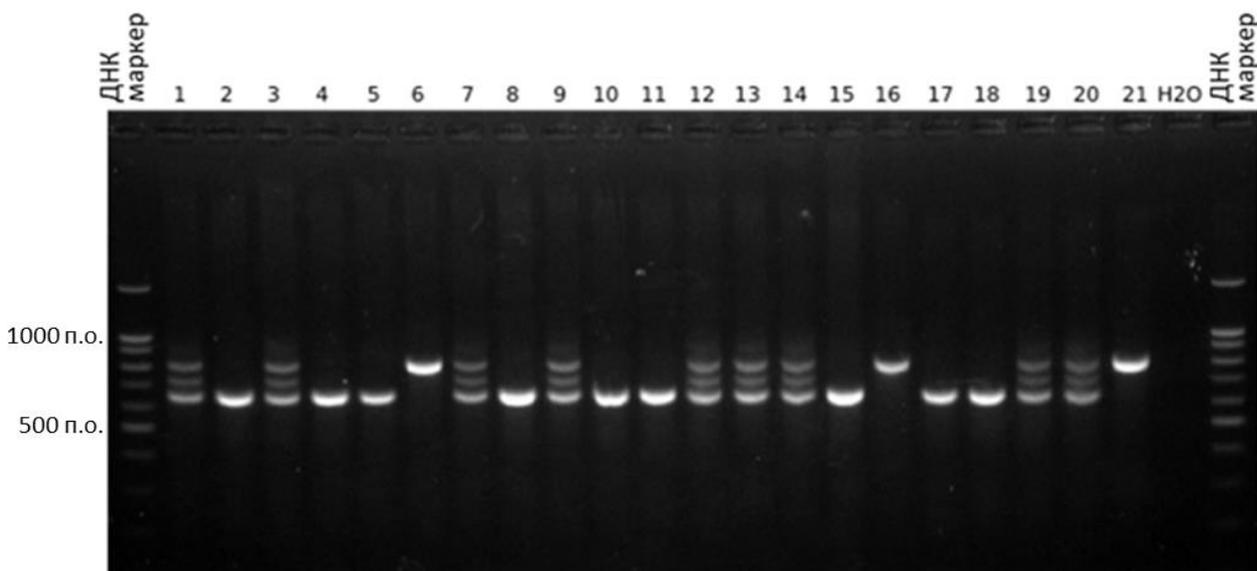


Рисунок 13. Гель-электрофорез ПЦР продуктов (праймеры FWD1.2+REV1) потомков, полученных от скрещивания гетерозиготных мышей-потомков основателя №20. «Тяжелый бэнд» (819 п.о.) соответствует аллелю дикого типа, «легкий бэнд» (674 п.о.) – аллелю с дупликацией. Бэнд средней длины – гетеродуплекс от отжига легкой и тяжелой цепей. Справа и слева нанесен ДНК-маркер (от 100 п.о. до 1000 п.о. с шагом 100 п.о. и 1500 п.о.). Например, животное №1 – гетерозигота, №2 – гомозигота, №6 – дикий тип.

В целом, эти результаты свидетельствуют об отсутствии заметного негативного эффекта на внутриутробное развитие эмбрионов гомозиготных и гетерозиготных по дупликации в исследованных линиях основателей №1 и №20.

В. Динамика массы тела в постнатального период развития гетерозиготных по делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. относительно мышей генотипа дикого типа в постнатальный период развития

Для анализа развития гомозиготных и гетерозиготных носителей были получены потомки от скрещивания гетерозиготных пар, имеющих модификацию – от двух линий с делецией, полученных от основателей №20 и №30 и от линии с дупликацией, полученной от основателя №1.

Измерение массы тела мышей производилось ежедневно. Наблюдение за потомками гетерозиготных пар линии №20 с делецией осуществлялось с первого дня рождения до возраста 40 дней, а за потомками гетерозиготных родителей линии с делецией №30 и линии №1 с первого дня рождения до 27-дневного возраста. Все животные получали индивидуальные метки (нумерацию) на животе при помощи перманентного маркера с 1 по 12 день, а после этого животные получали постоянные индивидуальные метки на ухе. Взятие материала для генотипирования производили на 18 день. По достижению возраста 28 дней, животных отсаживали от матерей и разделяли по полу. Кроме взвешивания, субъективно оценивался внешний вид на предмет наличия грубых морфологических отклонений в развитии.

В результате скрещивания гетерозиготных пар, потомков основателя с делецией №20 было получено 104 животных. В результате аналогичных скрещиваний для линии с делецией №30 было получено 79 потомков, а для линии с дупликацией №1 было получено 82 потомка. Все потомки были генотипированы, расщепления по генотипам представлено в Таблице 12.

Таблица 12. Распределение генотипов потомков для двух линий с делециями и одной линии с дупликацией.

Линия основателя	Всего потомков	Генотип потомков		
		Дикий тип	Гетерозиготы	Гомозиготы
№20, делеция	104	34	45	25
№30, делеция	79	24	32	23
№1, дупликация	82	22	41	19

Как видно из данных Таблицы 12, распределение генотипов в потомстве основателей №20, №30 и №1 соответствует ожидаемому менделевскому наследованию ($p > 0,15$, $p > 0,2$, $p > 0,85$ соответственно, критерий χ^2).

На Рисунках 13 и 14 приведены данные о динамике веса тела самцов и самок разных генотипов среди потомков основателя №20 с делецией от момента рождения и до 40-дневного возраста. На Рисунках 1П и 2П (см. Приложение) представлена динамика массы тела мышей с разными генотипами среди потомков основателя-носителя делеции №30. Хорошо видно выраженное сходство динамики изменения массы тела в постнатальном развитии у гомо- и гетерозиготных по делеции животных как между собой, так и в сравнении с сибсами дикого типа (как для самок, так и для самцов).

На Рисунках 3П и 4П (см. Приложение) представлены данные по динамике массы тела самцов и самок разных генотипов от момента рождения и до 27-дневного возраста у потомков основателя №1 носителя дупликации. Так же, как и для линий с делециями, в случае с дупликацией наблюдается выраженное сходство динамики изменения веса в постнатальном развитии среди гомо- и гетерозиготных по дупликации животных как между собой, так и в сравнении с сибсами, имеющими генотип дикого типа.

В целом, полученные данные свидетельствует о том, что делеции и дупликации гена *Cntnb* у мышей, как в гетеро- так и в гомозиготном состоянии не приводят к нарушению развития, судя по сходству динамики изменения массы тела в постнатальном развитии.

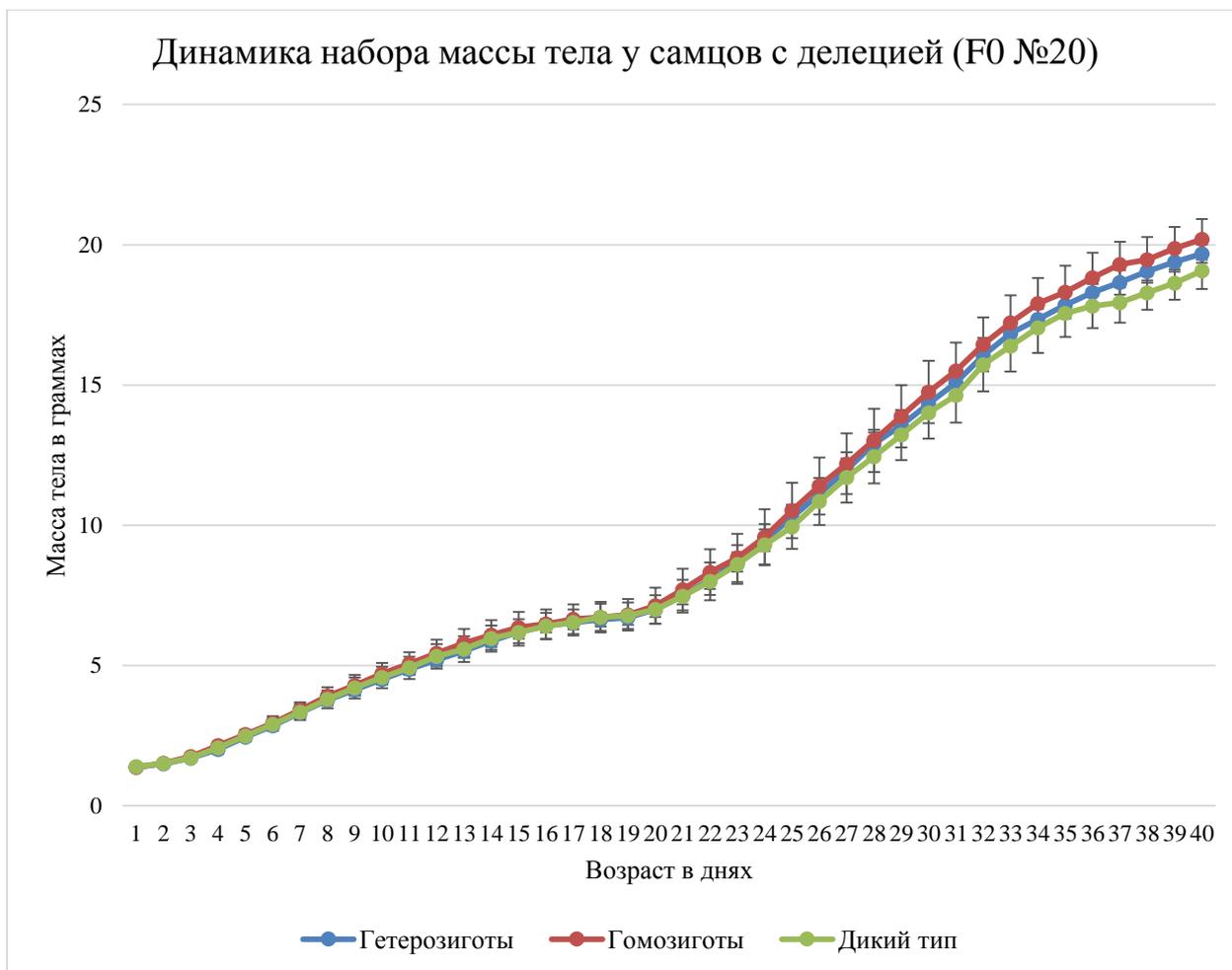


Рисунок 13. Динамика набора массы тела у самцов трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 40-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (красный цвет) и мыши дикого типа (зеленый цвет) были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с делецией (от основателя №20). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

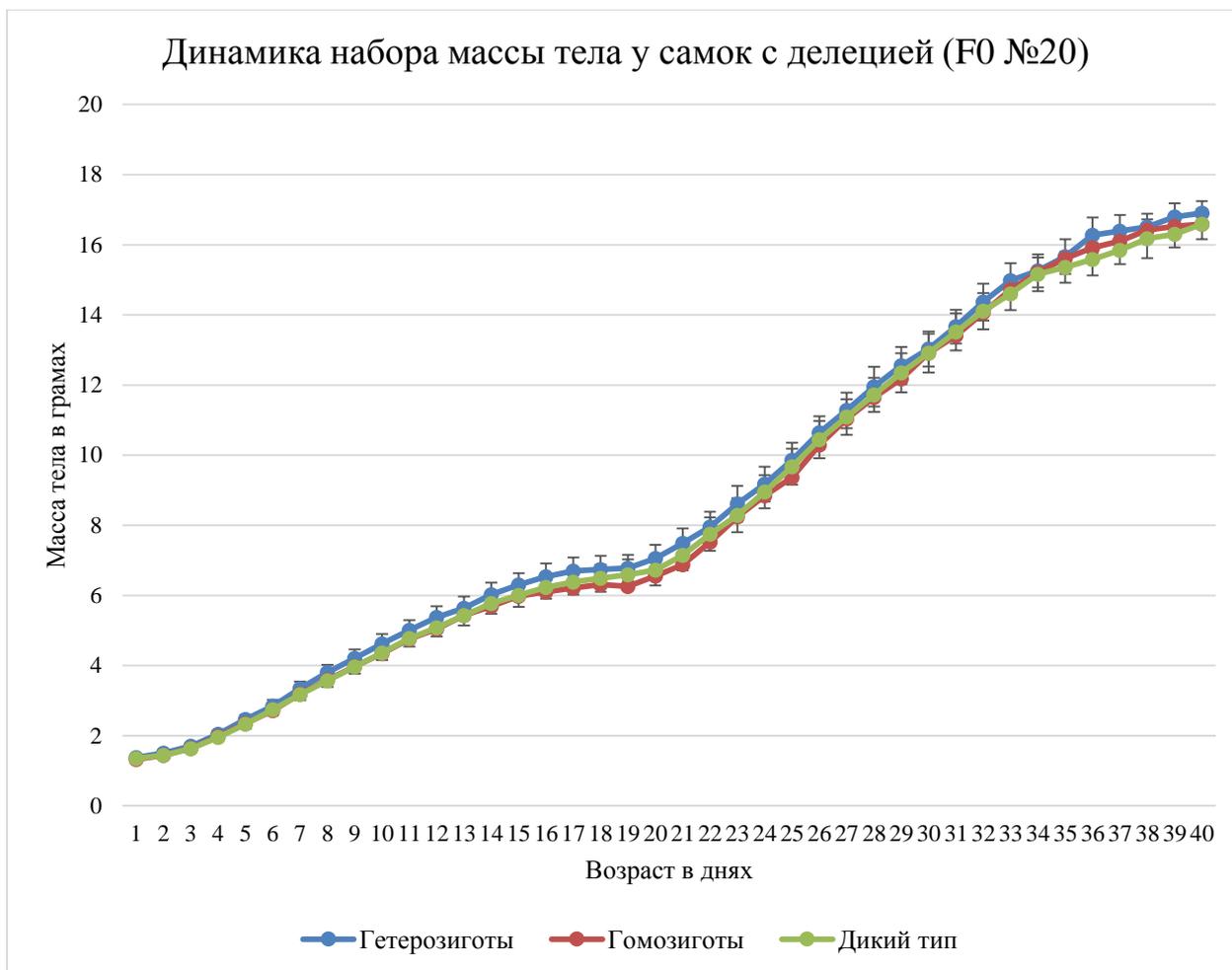


Рисунок 14. Динамика набора массы тела у самок трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 40-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (красный цвет) и мыши дикого типа (зеленый цвет) были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с делецией (от основателя №20). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

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 была проведена оценка уровня экспрессии гена *Cntn6*, а также двух соседних генов – *Chl1* и *Cntn4* у животных-носителей делеции и дупликации. С этой целью были проведены скрещивания гетерозиготных пар по делеции и гетерозиготных пар по дупликации, в результате чего в одном помете были животные трех генотипов: гомозиготные, гетерозиготные и животные дикого типа. Для оценки уровня экспрессии был использован мозжечок 7-дневных мышат, как отдел мозга, 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*. Для измерения экспрессии генов при помощи цифрового количественного ПЦР (ddPCR, droplet digital PCR) было использовано 11 животных дикого типа, 7 гетерозигот по делеции, 15 гомозигот по делеции, 3 гетерозиготы по дупликации и 4 гомозиготы по дупликации. Данные об экспрессии индивидуально для каждого животного представлены в Таблице 1П (Приложение).

Результаты исследования уровня экспрессии генов *Cntn6*, *Chl1* и *Cntn4* показаны на Рисунке 15. Из полученных данных следует, что у гомозиготных по делеции животных экспрессия гена *Cntn6* полностью отсутствует, а у гетерозиготных носителей делеции уровень экспрессии снижен в два раза по сравнению с мышами дикого типа. Также видно, что у гетеро- и гомозиготных мышей по дупликации уровень экспрессии гена *Cntn6* отличается от такой у мышей дикого типа, а именно увеличен в 1,5 и 2 раза соответственно (Рисунок 15). Иными словами, экспрессия гена *Cntn6* полностью соответствует дозе гена у носителей масштабных хромосомных перестроек.

Важно отметить, что экспрессия соседних генов - *Chl1* и *Cntn4* у гетеро- и гомозиготных носителей делеции или дупликации находится на таком же уровне что и у мышей дикого типа (Рисунок 15).

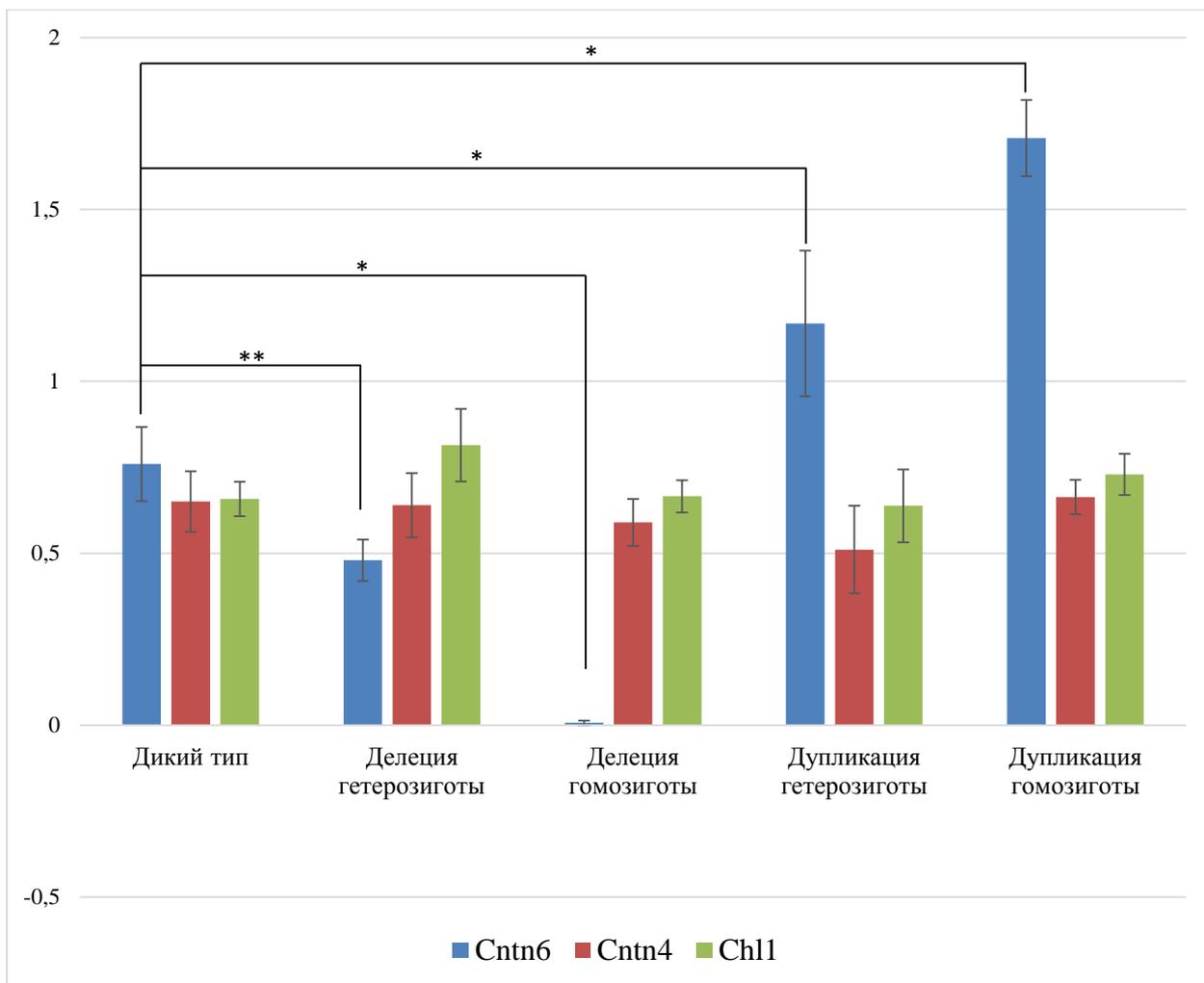


Рисунок 15. Уровень экспрессии генов *Cntn6* (синий цвет), *Cntn4* (красный цвет) и *Chl1* (зеленый цвет), в мозжечке мышей дикого типа, гетеро- и гомозиготных мышей по делеции, гетеро- и гомозиготных мышей по дупликации. Экспрессия была измерена относительно уровня экспрессии гена *Hprt*. На графике 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 *Cntnb* с эффективностью около 25%. Так как дизайн генетических модификаций был направлен на получение делеций, наиболее эффективно удалось получить именно целевые делеции 1137 т.п.о. – 7 носителей среди 41 родившихся F0-потомков (17%), причем два из них были носителями не только делеции, но и дупликации 2274 т.п.о. одновременно. Более того, нами впервые наблюдалось рождение основателя, гомозиготного по делеции, то есть использованный метод позволил индуцировать делецию в обоих родительских гомологах. Инверсии и дупликации в выбранном дизайне являются «побочными» модификациями, что соответственно отразилось на эффективности их возникновения – было обнаружено четыре носителя инверсий и два носителя дупликаций. Возникновение инверсий и дупликаций наряду с делециями нередкое событие и является естественным процессом при репарации двунитевых разрывов ДНК, разделенных значительными расстояниями [Birling и др., 2017; Vogoviak и др., 2016; Zhang и др., 2015].

Одним из важнейших и недостаточно исследованных аспектов является время и стадия происхождения масштабных хромосомных перестроек (размерами от 100 т.п.о. до 1000 т.п.о. и выше), индуцированных системой CRISPR/Cas9. Анализ наследования делеций 1137 т.п.о. у потомков F1, полученных скрещиванием трех основателей №9, №30 и №35 с мышами дикого типа, показал расщепление в соотношении близком 1:1 (Таблица 4), что предполагает возникновение делеции на одноклеточной стадии. Более того, наиболее вероятно возникновение делеции происходило на стадии PN3-PN4 согласно распространенной номенклатуре [Adenot и др., 1997], в период репликации ДНК хроматид перед кариогамией.

Это заключение подкрепляется данными FISH анализа основателей №9, №11, №30 и №35, у которых в ~100% исследованных клеток один из гомологов 6-ой хромосомы содержал делецию (Таблица 9). Отсутствие мозаицизма среди исследованных соматических клеток свидетельствует о том, что делеция у этих основателей действительно произошла на одноклеточной стадии и в дальнейшем

наследовалась при митотическом делении клеток. 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; Wogoniak и др., 2016].

Важно отметить, что нами впервые наблюдалось рождение основателя №15 гомозиготного по делеции, то есть использованный протокол CRISPR/Cas9 обеспечил формирование делеции в обоих родительских гомологах и, как следствие, все его соматические (по данным FISH анализа) и половые клетки (по данным наследования делеции у потомков F1 основателя №15) содержали оба гомолога 6-ой хромосомы. Более того, гомозиготный статус подтверждается также данными Саузерн-блот анализа (Рисунок 7). Таким образом, использованный протокол инъекции компонентов системы CRISPR/Cas9 обеспечил высокую эффективность возникновения индуцированных адресных делеций 1137 т.п.о. на одноклеточной стадии.

Анализ наследования инверсий у потомков F1, полученных от скрещивания четырех основателей №2, №10, №21 и №39 с мышами дикого типа, показал соотношение близкое 1:1 среди потомков с генотипом дикого типа и носителей инверсии (Таблица 7). Эти результаты указывают на то, что возникновение инверсий также происходило на одноклеточной стадии.

Одной из важных задач диссертационной работы было исследование судьбы делетированного 1137 т.п.о. фрагмента ДНК, индуцированного технологией CRISPR/Cas9. 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 в 6-ой хромосоме, ни на других хромосомах. Важно подчеркнуть, что не найдено признаков такого рода транслокации в клетках у гомозиготного основателя №15. Сходные данные были получены ранее при индукции масштабных, но единичных, делеций, с помощью технологии CRISPR/Cas9 [Birling и др., 2017; Hara и др., 2016; Kato и др., 2017; Wang и др., 2015]. Однако, следует отметить, что чувствительность FISH анализа имеет свои ограничения. В рутинной практике, меченые зонды способны надежно выявлять фрагменты ДНК размером от 2 т.п.о. и выше. Иными словами, транслоцированные делеционные фрагменты ДНК размерами ниже 2 т.п.о.

не могут быть надежно и воспроизводимо идентифицированы и, следовательно, вывод об элиминации делетированных фрагментов ДНК после возникновения масштабных делеций справедлив для крупных фрагментов, размером свыше 2 т.п.о.

При обсуждении судьбы делетированного фрагмента ДНК уместно отметить, что нами при использовании Саузерн-блот анализа (см. ниже) также не было обнаружено следов его транслокаций. Данное утверждение справедливо только для тех случаев, при которых не произошла потеря участков (концов образованного удаленного фрагмента), которые являются комплементарными использованным 3'- и 5'- зондам. Другими словами, если бы транслокация произошла без укорочения концов у делетированного фрагмента. Более того, у основателя №15 гомозиготного по делеции 1137 т.п.о., также не найдено признаков транслокации последовательностей фрагмента не только по данным Саузерн-блот анализа, но и по данным ПЦР-анализа – отсутствию ПЦР-продукта с делетированного фрагмента.

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. Соотношение трех генотипов среди потомков F1 основателей №1 и №20 (Таблица 8) предполагает:

- 1) независимую сегрегацию аллелей, несущих делецию и дупликацию, и аллеля дикого типа;
- 2) суммарное соотношение носителей делеции или дупликации относительно животных дикого типа несколько ниже, чем ожидаемое 1:1.

Как отмечалось выше, причиной такого отклонения могут быть как недостаточность выборки, так и селективное преимущество клеток дикого типа относительно клеток-носителей хромосомных перестроек при формировании гамет.

Совокупные данные анализа наследования перестроек, FISH-анализа и анализа SNP основателей №1 и №20, несущих делеции и дупликации свидетельствует о том, что:

- 1) примерно половина потомков от этих основателей наследует делецию или дупликацию, а вторая половина имеют генотип дикого типа;
- 2) при FISH-анализе, примерно половина клеток определяются как гетерозиготные по делеции, а вторая половина как клетки дикого типа (дуплицированный аллель невозможно отличить от аллеля дикого типа);
- 3) среди потомков F1 наблюдается сегрегация делеции и дупликации;
- 4) по данным SNP-анализа, у основателя №20 дупликация происходит из одной из родительских хромосомы.

Основываясь на этих данных, можно предположить, что образование делеции и дупликации — это связанное одномоментное событие. Оба гомолога в зиготе располагаются в разных компартментах (пронуклеусах) и не могут физически взаимодействовать. Однако, в процессе репликации происходит удвоение ДНК в одном пронуклеусе, в результате образуются две хроматиды, которые после первого деления-дробления разойдутся по разным бластомерам. Наиболее вероятным сценарием, который согласуется с полученными данными, является образование делеции и дупликации путем межхроматидного обмена после возникновения двуцепочечных разрывов, индуцированных системой CRISPR/Cas9 (Рисунок 16). Другим вариантом является интеграция удаляемого фрагмента ДНК в соседнюю хроматиду (Рисунок 16). Обе гипотезы хорошо согласуются предложенным механизмом, выдвинутым группой исследователей [Birling и др., 2017].

Также существует и другая точка зрения, которая предполагает возникновение дупликации путем межхромосомного обмена или реинтеграции удаляемого фрагмента в гомологичную хромосому во время слияния двух пронуклеусов [Wogoniak и др., 2016]. Однако, результаты нашего эксперимента не поддерживают такой механизм возникновения дупликации, поскольку обе копии гена *Cntn6* несут маркер SNP одной из родительских хромосом. Таким образом, полученные данные однозначно указывают на то, что дупликация возникла на стадии двух хроматид в одном из пронуклеусов после возникновения двунитевых разрывов, индуцированных системой CRISPR/Cas9.

На Рисунке 16 представлена предполагаемая схема одновременного образования делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. в одном из родительских пронуклеусов на стадии PN4-PN5 (по номенклатуре [Adenot и др., 1997]) или в

период поздней репликации ДНК хроматид. В результате обмена сестринскими хроматидами в одном из пронуклеусов образуются два гомолога – один несет делецию, а другой – дупликацию [Reams, Roth, 2015]. По подобному механизму межхроматидного обмена возникают делеции и дупликации при применении технологии Cre-loxP [Duchon и др., 2008; Herault и др., 2010]. Как отмечалось выше, альтернативным механизмом может являться реинтеграция удаленного (делетированного) фрагмента в соседнюю хроматиду в образованный двуцепочечный разрыв, внесенный системой CRISPR/Cas (Рисунок 16). Представленная схема предполагает, что после первого деления образуются два диплоидных бластомера – один гетерозиготный по делеции, а второй по дупликации. При дальнейшем развитии эти бластомеры становятся родоначальниками двух популяций соматических клеток в соотношении 1:1, но при условии их равных селективных возможностей. Что касается формирования гамет у основателей №1 и №20, то ожидаемо, что половина гамет будет нести аллель дикого типа, а другая половина будет носителями либо делеции, либо дупликации в равных соотношениях. Данные анализа потомков F1 от скрещивания основателей №1 и №20 с мышами дикого типа согласуются с ожидаемыми соотношениями между потомками дикого типа и носителями делеции или дупликации, с поправкой на недостаточность выборки и/или влияния неравного селективного преимущества среди этих трех генотипов.

Перспективы использования адресной модификация геномов с помощью CRISPR/Cas9 технологии в медицине широко обсуждается научной и околонаучной среде. Наибольшие опасения вызывают непредсказуемые нецелевые модификации ДНК в геномах при использовании технологии CRISPR/Cas9. Учитывая важность этой проблемы, мы использовали набор экспериментальных подходов для оценки масштабов непредсказуемых нецелевых модификаций ДНК на примере получения при помощи технологии CRISPR/Cas9 масштабных хромосомных перестроек, затрагивающих только один ген *Cntnb* локализованный в 6-ой хромосоме мыши.

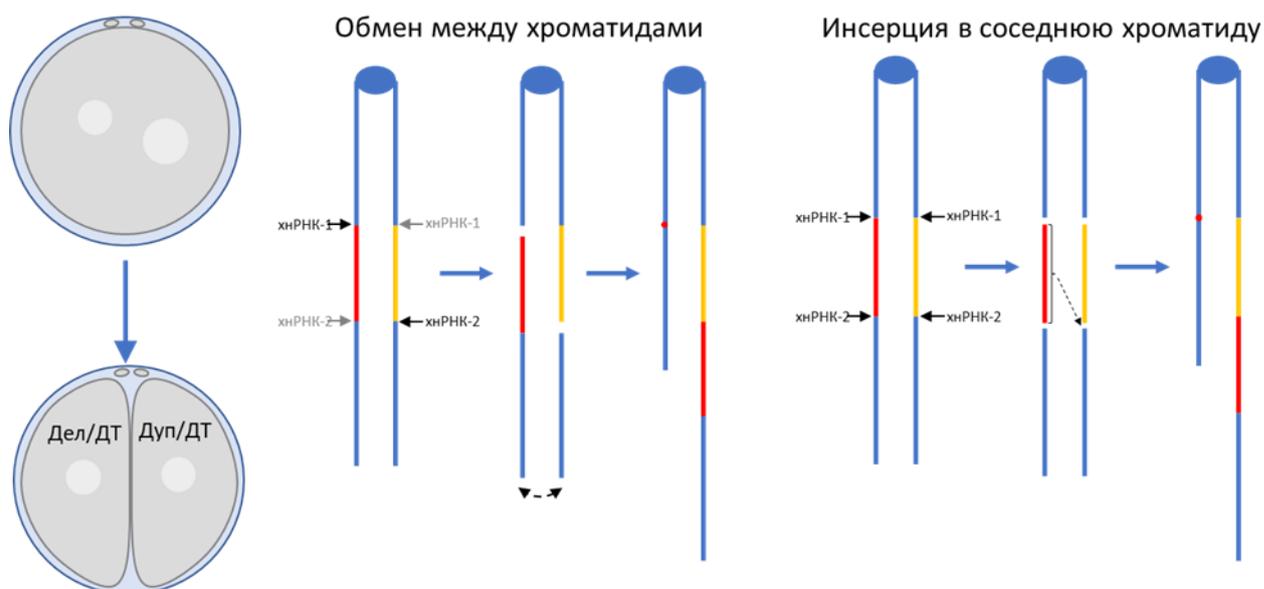


Рисунок 16. Схема возможного механизма образования делеции и дупликации у основателей №1 и №20. Слева схематично представлена зигота с пронуклеусами, из которой путем деления-дробления образуется два бластомера – один гетерозиготный по делеции, а второй по дупликации. В центре показана схема образования делеции и дупликации путем обмена между хроматидами. Справа представлена схема образования делеции и дупликации путем инсерции удаляемого фрагмента ДНК в соседнюю хроматиду. Желтым и красным изображены удаляемые фрагменты на разных хроматидах.

Секвенирование ПЦР продуктов в новых сайтах, образовавшихся после индуцированных технологией CRISPR/Cas9 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 1137 т.п.о. делеций, что предполагает репарацию ДНК по типу HDR (homology directed repair). У остальных четырех основателей-носителей делеции наблюдалась потеря нуклеотидов в сайтах «стыковки» ДНК в диапазоне от одного (у основателя №1) до 101 п.о. (у основателя №9), что указывает на репарацию ДНК после делеции по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ). Это широко распространенное явление при использовании технологии CRISPR/Cas9

при адресных модификациях ДНК в масштабах от единичных замен до масштабных хромосомных перестроек.

Данные Саузерн-блот анализа основателей с делециями и их потомков согласуются с данными ПЦР-анализа – размеры рестрикционных фрагментов ДНК при гибридизации с мечеными зондами к 5'- и 3'-концам соответствует ожидаемым. Все это позволяет заключить, что все полученные делеции не сопровождались нецелевыми модификациями последовательностей в сайтах стыка 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 часто встречаются незапланированные хромосомные перестройки [Bogoviak и др., 2017], а также отмечена высокая частота изменений последовательностей в районе 1-2 т.п.о. от места двунитевых разрывов ДНК [Kosicki, Tomberg, Bradley, 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 [Bogoviak и др., 2016; Bogoviak и др., 2017].

Согласно 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 инверсий. Эти данные предполагают, что образование индуцированных CRISPR/Cas9 инверсий может сопровождается незапланированными хромосомными перестройками в модифицируемом локусе [Bogoviak и др., 2017] или значительными укорочениями концов ДНК области двунитевых разрывов [Korablev и др., 2020; Kosicki, Tomberg, Bradley, 2018].

Детальный анализ мышей-носителей дупликаций показал, что обе копии дупликации являются полноценными, а границы дупликации имеют минимальные потери нуклеотидов не сопоставимые с масштабами самой дупликации. Кроме того, проведенный анализ экспрессии дополнительно подтверждает их целостность, так как каждая из копий функционирует независимо, что отражается в двукратном увеличении экспрессии гена *Cntn6* (Рисунок 15). Важно отметить, что

полногеномное секвенирование не выявило перестроек в дублированном фрагменте и в прилежащих районах, где локализованы соседние гены *Chl1* и *Cntn4*.

Интересно, что в нашем эксперименте только у основателей-носителей дубликаций было обнаружено наличие небольшой доли (2,3% и 2,5%) клеток с трисомией по 6-ой хромосоме. Поскольку трисомия наблюдается у двух независимо полученных основателей с делецией и дубликацией и отсутствует у носителей делеции, то можно предположить, что трисомия произошла под влиянием *de novo* образовавшейся дубликации (CNV).

В обзоре литературы были приведены многочисленные данные о клинических проявлениях масштабных делеций и дубликаций, затрагивающих ген *CNTN6* у человека, приводящих к развитию серьезных психоневрологических отклонений и дисморфозов лицевого черепа [Hu и др., 2015; Kashevarova и др., 2014; Tassano и др., 2018]. Уместно напомнить, что не описаны случаи гомозиготного носительства подобных хромосомных перестроек в районе 3p26.3 у человека, что возможно связано с их летальным эффектом. Одной из задач работы было получение перестроек гена *Cntn6* у мышей и исследование возможности использования их как потенциальных моделей патологий человека. Однако, анализ жизнеспособности и развития гомозиготных и гетерозиготных носителей делеций и дубликаций 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 *Cntn6* не могут служить адекватными моделями психоневрологических патологий человека.

В ходе исследования животных-носителей делеции 1137 т.п.о. или дубликации 2374 т.п.о. была показана дозово-зависимая экспрессия гена *Cntn6*, а именно, у носителей делеции экспрессия отсутствовала, а у носителей дубликации наблюдалась двукратное увеличение экспрессии гена *Cntn6* по сравнению с животными дикого типа. Интересно, что у некоторых пациентов-носителей дубликации гена *CNTN6* была установлена одна интересная особенность – резкое снижение экспрессии гена *CNTN6* с дублированным аллелем [Gridina и др., 2018]. Полученные нами данные при исследовании дубликации гена *Cntn6* у мышей не воспроизводят данную особенность дубликации этого гена у человека.

Развитие и функционирование нервной системы достаточно сложный процесс в особенности у человека. В научной практике использование животных в качестве генетических моделей заболеваний человека является распространенным экспериментальным подходом. Используемая нами технология CRISPR/Cas9 для индуцирования хромосомных перестроек в синтетическом районе мышей не привела к фенотипической манифестации психоневрологических патологий и морфозов характерных для гомологичных перестроек человека. Таким образом, полученные линии мышей с масштабными хромосомными перестройками гена *Cntnb* не могут служить адекватными моделями психоневрологических патологий человека. Возможно, данная ситуация связана с тем, что в ходе эволюции у гена *CNTN6* человека появились новые функции.

Несмотря на то, что полученные мыши с хромосомными перестройками гена *Cntnb* не воспроизводят клинические проявления гомологичных перестроек у человека, линии с дупликациями гена *Cntnb* могут стать интересными нейрофизиологическими моделями, так как у этих животных наблюдается двукратное увеличение экспрессии *Cntnb* по сравнению с животными дикого типа. Исходя из литературных данных, ген *Cntnb* экспрессируется в разных отделах головного мозга, а увеличение его экспрессии может привести к неожиданным последствиям у животных.

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 *Cntn6*. 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 *Cntn6* 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 – FISH и Саузерн-блот 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 дублицированных 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 *Cntn6* 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 *Chl1* и *Cntn4* у гомозиготных носителей делеций и дубликаций не отличается от животных дикого типа. У мутантных носителей делеции или дубликации гена *Cntn6* 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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – Олегу Леонидовичу Серову за ценные советы, помощь и поддержку при выполнении диссертационной работы, обсуждение научных результатов.

Автор отдельно и особенно благодарит Бориса Скрябина и сотрудников его лаборатории (лаборатория трансгенеза, Мюнстерский университет, Германия) – Тимофея Рождественского, Леонида Губаря, Елену Кайзер за обучение методам трансгенеза, а также за проведение Саузерн-блот анализа.

Автор благодарит коллектив Отдела молекулярных механизмов онтогенеза за дружескую атмосферу и помощь в проведении работы. Автор благодарен Ирине Александровне Серовой за помощь в получении и характеристике экспериментальных животных, Вениамину Семеновичу Фишману за помощь в биоинформационном анализе, Юлии Михайловне Мининой и Инне Евгеньевне Пристяжнюк за помощь в проведении FISH-анализа, Марии Михайловне Гридиной за помощь в анализе экспрессии генов.

Автор благодарен Л.Е. Завьялову, М.П. Мошкину и коллективу SPF-вивария ИЦиГ СО РАН за создание условий бесперебойной работы с лабораторными мышами и организацию структуры (совместно с Отделом молекулярных механизмов онтогенеза) для проведения исследовательских работ по адресной модификации генома.

Список литературы

1. Hu J., Liao J., Sathanoori M., Kochmar S., Sebastian J., Yatsenko S.A., Surti U. CNTN6 copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // *J. Neurodev. Disord.* 2015. Т. 7. № 1. С. 26.
2. Murdoch J.D., Gupta A.R., Sanders S.J., Walker M.F., Keaney J., Fernandez T. V., Murtha M.T., Anyanwu S., Ober G.T., Raubeson M.J., DiLullo N.M., Villa N., Waqar Z., Sullivan C., Gonzalez L., Willsey A.J., Choe S.-Y., Neale B.M., Daly M.J., и др. No evidence for association of autism with rare heterozygous point mutations in Contactin-Associated Protein-Like 2 (CNTNAP2), or in Other Contactin-Associated Proteins or Contactins. // *PLoS Genet.* 2015. Т. 11. № 1. С. e1004852.
3. Saus E., Brunet A., Armengol L., Alonso P., Crespo J.M., Fernández-Aranda F., Guitart M., Martín-Santos R., Menchón J.M., Navinés R., Soria V., Torrens M., Urretavizcaya M., Vallès V., Gratacòs M., Estivill X. Comprehensive copy number variant (CNV) analysis of neuronal pathways genes in psychiatric disorders identifies rare variants within patients // *J. Psychiatr. Res.* 2010. Т. 44. № 14. С. 971–978.
4. Shimoda Y., Watanabe K. Contactins: emerging key roles in the development and function of the nervous system. // *Cell Adh. Migr.* 2009. Т. 3. № 1. С. 64–70.
5. Takeda Y., Akasaka K., Lee S., Kobayashi S., Kawano H., Murayama S., Takahashi N., Hashimoto K., Kano M., Asano M., Sudo K., Iwakura Y., Watanabe K. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup // *J. Neurobiol.* 2003. Т. 56. № 3. С. 252–265.
6. Adenot P.G., Mercier Y., Renard J.P., Thompson E.M. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos // *Development.* 1997. Т. 124. № 22.
7. Adikusuma F., Piltz S., Corbett M.A., Turvey M., McColl S.R., Helbig K.J., Beard M.R., Hughes J., Pomerantz R.T., Thomas P.Q. Large deletions induced by Cas9 cleavage // *Nature.* 2018. Т. 560. № 7717. С. E8–E9.

8. Beneck D., Suhrland M.J., Dicker R., Greco M.A., Wolman S.R. Deletion of the short arm of chromosome 3: a case report with necropsy findings. // *J. Med. Genet.* 1984. T. 21. № 4. C. 307–10.
9. Birling M.C., Schaeffer L., André P., Lindner L., Maréchal D., Ayadi A., Sorg T., Pavlovic G., Héroult Y. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 1–11.
10. Bishop J.O., Smith P. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. // *Mol. Biol. Med.* 1989. T. 6. № 4. C. 283–98.
11. Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9 // *genesis.* 2016. T. 54. № 2. C. 78–85.
12. Boroviak K., Fu B., Yang F., Doe B., Bradley A. Revealing hidden complexities of genomic rearrangements generated with Cas9. // *Sci. Rep.* 2017. T. 7. № 1. C. 12867.
13. Bouyain S., Watkins D.J. The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. T. 107. № 6. C. 2443–2448.
14. Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. // *Nature.* 1984. T. 309. № 5965. C. 255–6.
15. Brandl C., Ortiz O., Röttig B., Wefers B., Wurst W., Kühn R. Creation of targeted genomic deletions using TALEN or CRISPR/Cas nuclease pairs in one-cell mouse embryos // *FEBS Open Bio.* 2015. T. 5. C. 26–35.
16. Carbery I.D., Ji D., Harrington A., Brown V., Weinstein E.J., Liaw L., Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. // *Genetics.* 2010. T. 186. № 2. C. 451–9.
17. Cervantes A., García-Delgado C., Fernández-Ramírez F., Galaz-Montoya C., Morales-Jiménez A.B., Nieto-Martínez K., Gómez-Laguna L., Villa-Morales J., Quintana-Palma M., Berúmen J., Kofman S., Morán-Barroso V.F. Trisomy 1q41-qter and monosomy 3p26.3-pter in a family with a translocation (1;3): further delineation of the

syndromes. // BMC Med. Genomics. 2014. T. 7. C. 55.

18. Chari R., Yeo N.C., Chavez A., Church G.M. sgRNA Scorer 2.0: A Species-Independent Model To Predict CRISPR/Cas9 Activity // ACS Synth. Biol. 2017. T. 6. № 5. C. 902–904.

19. Chu V.T., Weber T., Graf R., Sommermann T., Petsch K., Sack U., Volchkov P., Rajewsky K., Kühn R. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes // BMC Biotechnol. 2016. T. 16. № 1. C. 4.

20. Conlin L.K., Thiel B.D., Bonnemann C.G., Medne L., Ernst L.M., Zackai E.H., Deardorff M.A., Krantz I.D., Hakonarson H., Spinner N.B. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis // Hum. Mol. Genet. 2010. T. 19. № 7. C. 1263–1275.

21. Cui X.-Y., Hu Q.-D., Tekaya M., Shimoda Y., Ang B.-T., Nie D.-Y., Sun L., Hu W.-P., Karsak M., Duka T., Takeda Y., Ou L.-Y., Dawe G.S., Yu F.-G., Ahmed S., Jin L.-H., Schachner M., Watanabe K., Arsenijevic Y., и др. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. // J. Biol. Chem. 2004. T. 279. № 24. C. 25858–65.

22. Cullot G., Boutin J., Toutain J., Prat F., Pennamen P., Rooryck C., Teichmann M., Rousseau E., Lamrissi-Garcia I., Guyonnet-Duperat V., Bibeyran A., Lalanne M., Prouzet-Mauléon V., Turcq B., Ged C., Blouin J.-M., Richard E., Dabernat S., Moreau-Gaudry F., и др. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations // Nat. Commun. 2019. T. 10. № 1. C. 1136.

23. Cuoco C., Ronchetto P., Gimelli S., Béna F., Divizia M., Lerone M., Mirabelli-Badenier M., Mascaretti M., Gimelli G. Microarray based analysis of an inherited terminal 3p26.3 deletion, containing only the CHL1 gene, from a normal father to his two affected children // Orphanet J. Rare Dis. 2011. T. 6. № 1. C. 12.

24. Dijkhuizen T., Essen T. van, Vlies P. van der, Verheij J.B.G.M., Sikkema-Raddatz B., Veen A.Y. van der, Gerssen-Schoorl K.B.J., Buys C.H.C.M., Kok K. FISH and array-CGH analysis of a complex chromosome 3 aberration suggests that loss of CNTN4 and CRBN contributes to mental retardation in 3pter deletions // Am. J. Med. Genet. Part

- A. 2006. T. 140A. № 22. C. 2482–2487.
25. Duchon A., Besson V., Pereira P.L., Magnol L., Hérault Y. Inducing segmental aneuploid mosaicism in the mouse through targeted asymmetric sister chromatid event of recombination // *Genetics*. 2008. T. 180. № 1. C. 51–59.
26. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. T. 292. № 5819. C. 154–156.
27. Fernandez T., Morgan T., Davis N., Klin A., Morris A., Farhi A., Lifton R.P., State M.W. Disruption of Contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. T. 82. № 6. C. 1385.
28. Franke M., Ibrahim D.M., Andrey G., Schwarzer W., Heinrich V., Schöpflin R., Kraft K., Kempfer R., Jerković I., Chan W.L., Spielmann M., Timmermann B., Wittler L., Kurth I., Cambiaso P., Zuffardi O., Houge G., Lambie L., Brancati F., и др. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications // *Nature*. 2016. T. 538. № 7624. C. 265–269.
29. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nat. Biotechnol.* 2013. T. 31. № 9. C. 822–826.
30. Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease // *Nucleic Acids Res.* 2013. T. 41. № 20. C. e187–e187.
31. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980. T. 77. № 12. C. 7380–4.
32. Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986. T. 83. № 23. C. 9065–9069.
33. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S., Menzorov A.G., Kizilova H.A., Beregovoy N.A., Kovrigin I.I., Pristyazhnyuk I.E., Ocorbin I.P., Filipenko M.L.,

- Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Nikitina T. V., Sazhenova E.A., Nazarenko L.P., Lebedev I.N., Serov O.L. Allele-Specific Biased Expression of the CNTN6 Gene in iPSC Cell-Derived Neurons from a Patient with Intellectual Disability and 3p26.3 Microduplication Involving the CNTN6 Gene // *Mol. Neurobiol.* 2018. T. 55. № 8. C. 6533–6546.
34. Hamada T., Sasaki H., Seki R., Sakaki Y. Mechanism of chromosomal integration of transgenes in microinjected mouse eggs: sequence analysis of genome-transgene and transgene-transgene junctions at two loci // *Gene.* 1993. T. 128. № 2. C. 197–202.
35. Hara S., Kato T., Goto Y., Kubota S., Tamano M., Terao M., Takada S. Microinjection-based generation of mutant mice with a double mutation and a 0.5 Mb deletion in their genome by the CRISPR/Cas9 system // *J. Reprod. Dev.* 2016. T. 62. № 5. C. 531–536.
36. Herault Y., Duchon A., Marechal D., Raveau M., Pereira P., Dalloneau E., Brault V. Controlled Somatic and Germline Copy Number Variation in the Mouse Model // *Curr. Genomics.* 2010. T. 11. № 6. C. 470–480.
37. Hillenbrand R., Molthagen M., Montag D., Schachner M. The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions // *Eur. J. Neurosci.* 1999. T. 11. № 3. C. 813–826.
38. Hogan B., Beddington R., Costantini F. L.E. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual.* : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. Вып. 2nd.
39. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea // *Science (80-.).* 2010. T. 327. № 5962. C. 167–170.
40. Hou Z., Zhang Y., Propson N.E., Howden S.E., Chu L.F., Sontheimer E.J., Thomson J.A. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. T. 110. № 39. C. 15644–15649.
41. Huang A.Y., Yu D., Davis L.K., Sul J.H., Tsetsos F., Ramensky V., Zelaya I., Ramos E.M., Osiecki L., Chen J.A., McGrath L.M., Illmann C., Sandor P., Barr C.L., Grados M., Singer H.S., Nöthen M.M., Hebebrand J., King R.A., и др. Rare Copy Number

- Variants in NRXN1 and CNTN6 Increase Risk for Tourette Syndrome. // *Neuron*. 2017. T. 94. № 6. C. 1101- 1111.e7.
42. Iyer J., Girirajan S. Gene discovery and functional assessment of rare copy-number variants in neurodevelopmental disorders // *Brief. Funct. Genomics*. 2015. T. 14. № 5. C. 315–328.
43. Iyer V., Boroviak K., Thomas M., Doe B., Riva L., Ryder E., Adams D.J. No unexpected CRISPR-Cas9 off-target activity revealed by trio sequencing of gene-edited mice // *PLoS Genet*. 2018. T. 14. № 7.
44. Jin Y., Lee A., Oh J.H., Lee H.W., Ha S.J. The R229Q mutation of Rag2 does not characterize severe immunodeficiency in mice // *Sci. Rep*. 2019. T. 9. № 1. C. 1–13.
45. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science (80-.)*. 2012. T. 337. № 6096. C. 816–821.
46. Juan-Perez C., Farrand S., Velakoulis D. Schizophrenia and epilepsy as a result of maternally inherited CNTN6 copy number variant // *Schizophr. Res*. 2018.
47. Kamei Y., Tsutsumi O., Taketani Y., Watanabe K. cDNA cloning and chromosomal localization of neural adhesion molecule NB-3 in human. // *J. Neurosci. Res*. 1998. T. 51. № 3. C. 275–83.
48. Kaneko-Goto T., Yoshihara S., Miyazaki H., Yoshihara Y. BIG-2 Mediates Olfactory Axon Convergence to Target Glomeruli // *Neuron*. 2008. T. 57. № 6. C. 834–846.
49. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S., Skryabin N.A., Salyukova O.A., Chechetkina N.N., Tolmacheva E.N., Rudko A.A., Magini P., Graziano C., Romeo G., Joss S., Tümer Z., Lebedev I.N. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. // *Mol. Cytogenet*. 2014. T. 7. № 1. C. 97.
50. Kato T., Hara S., Goto Y., Ogawa Y., Okayasu H., Kubota S., Tamano M., Terao M., Takada S. Creation of mutant mice with megabase-sized deletions containing custom-designed breakpoints by means of the CRISPR/Cas9 system // *Sci. Rep*. 2017. T. 7. № 1.

C. 59.

51. Korablev A., Lukyanchikova V., Serova I., Battulin N. On-target CRISPR/CAS9 activity can cause undesigned large deletion in mouse zygotes // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. T. 21. № 10.

52. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements // *Nat. Biotechnol.* 2018. T. 36. № 8. C. 765–771.

53. Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W.L., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragesteen B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupiáñez D.G., Andrey G. Deletions, Inversions, Duplications: Engineering of Structural Variants using CRISPR/Cas in Mice // *Cell Rep.* 2015. T. 10. № 5. C. 833–839.

54. Kragesteen B.K., Spielmann M., Paliou C., Heinrich V., Schöpflin R., Esposito A., Annunziatella C., Bianco S., Chiariello A.M., Jerković I., Harabula I., Guckelberger P., Pechstein M., Wittler L., Chan W.-L., Franke M., Lupiáñez D.G., Kraft K., Timmermann B., и др. Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis // *Nat. Genet.* 2018. T. 50. № 10. C. 1463–1473.

55. Lee S., Takeda Y., Kawano H., Hosoya H., Nomoto M., Fujimoto D., Takahashi N., Watanabe K. Expression and regulation of a gene encoding neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup in mouse brain. // *Gene.* 2000. T. 245. № 2. C. 253–66.

56. Leeuw N. de, Hehir-Kwa J.Y., Simons A., Geurts van Kessel A., Smeets D.F., Faas B.H.W., Pfundt R. SNP Array Analysis in Constitutional and Cancer Genome Diagnostics – Copy Number Variants, Genotyping and Quality Control // *Cytogenet. Genome Res.* 2011. T. 135. № 3–4. C. 212–221.

57. Li C., Liu C., Zhou B., Hu C., Xu X. Novel microduplication of CHL1 gene in a patient with autism spectrum disorder: a case report and a brief literature review. // *Mol. Cytogenet.* 2016. T. 9. C. 51.

58. Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 1985. T. 82. № 5. C. 1391–5.

59. Lupiáñez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R., Santos-Simarro F., Gilbert-Dussardier B., Wittler L., Borschiwer M., Haas S.A., Osterwalder M., Franke M., Timmermann B., Hecht J., и др. Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions // *Cell*. 2015. T. 161. № 5. C. 1012–1025.

60. Maness P.F., Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration // *Nat. Neurosci*. 2007. T. 10. № 1. C. 19–26.

61. Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes // *Nature*. 1988. T. 336. № 6197. C. 348–352.

62. Martin C.L., Kirkpatrick B.E., Ledbetter D.H. Copy Number Variants, Aneuploidies, and Human Disease // *Clin. Perinatol*. 2015. T. 42. № 2. C. 227–242.

63. Mashiko D., Fujihara Y., Satouh Y., Miyata H., Isotani A., Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. // *Sci. Rep*. 2013. T. 3. C. 3355.

64. Mercati O., Danckaert A., Andre-Leroux G., Bellinzoni M., Gouder L., Watanabe K., Shimoda Y., Grailhe R., Chaumont F. De, Bourgeron T., Cloez-Tayarani I. Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites // *Biol. Open*. 2013. T. 2. № 3. C. 324–334.

65. Mercati O., Huguet G., Danckaert A., André-Leroux G., Maruani A., Bellinzoni M., Rolland T., Gouder L., Mathieu A., Buratti J., Amsellem F., Benabou M., Van-Gils J., Beggiato A., Konyukh M., Bourgeois J.-P., Gazzellone M.J., Yuen R.K.C., Walker S., и др. CNTN6 mutations are risk factors for abnormal auditory sensory perception in autism spectrum disorders // *Mol. Psychiatry*. 2017. T. 22. № 4. C. 625–633.

66. Molenhuis R.T., Bruining H., Rimmelink E., Visser L. de, Loos M., Burbach J.P.H., Kas M.J.H. Limited impact of Cntn4 mutation on autism-related traits in developing and adult C57BL/6J mice. // *J. Neurodev. Disord*. 2016. T. 8. C. 6.

67. Mu D., Xu Y., Zhao T., Watanabe K., Xiao Z.-C., Ye H. Cntn6 deficiency impairs allocentric navigation in mice. // *Brain Behav.* 2018. T. 8. № 6. C. e00969.
68. Müller M., Lee C.M., Gasiunas G., Davis T.H., Cradick T.J., Siksnys V., Bao G., Cathomen T., Mussolino C. *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome // *Mol. Ther.* 2016. T. 24. № 3. C. 636–644.
69. Murase S., Schuman E.M. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. T. 11. № 5. C. 549–53.
70. Nakanishi T., Kuroiwa A., Yamada S., Isotani A., Yamashita A., Tairaka A., Hayashi T., Takagi T., Ikawa M., Matsuda Y., Okabe M. Fish analysis of 142 EGFP transgene integration sites into the mouse genome // *Genomics.* 2002. T. 80. № 6. C. 564–574.
71. Niedermaier M., Schwabe G.C., Fees S., Helmrich A., Brieske N., Seemann P., Hecht J., Seitz V., Stricker S., Leschik G., Schrock E., Selby P.B., Mundlos S. An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression // *J. Clin. Invest.* 2005. T. 115. № 4. C. 900.
72. Palumbo O., Fischetto R., Palumbo P., Nicastro F., Papadia F., Zelante L., Carella M. De novo microduplication of *CHL1* in a patient with non-syndromic developmental phenotypes. // *Mol. Cytogenet.* 2015. T. 8. C. 66.
73. Panicker A.K., Buhusi M., Thelen K., Maness P.F. Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. // *Front. Biosci.* 2003. T. 8. C. d900-11.
74. Ramirez-Solis R., Liu P., Bradley A. Chromosome engineering in mice // *Nature.* 1995. T. 378. № 6558. C. 720–724.
75. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity // *Cell.* 2013. T. 154. № 6. C. 1380–1389.
76. Reams A.B., Roth J.R. Mechanisms of gene duplication and amplification // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. T. 7. № 2.
77. Repnikova E.A., Lyalin D.A., McDonald K., Astbury C., Hansen-Kiss E., Cooley L.D., Pfau R., Herman G.E., Pyatt R.E., Hickey S.E. CNTN6 copy number variations:

Uncertain clinical significance in individuals with neurodevelopmental disorders // Eur. J. Med. Genet. 2019.

78. Rohan R.M., King D., Frels W.I. Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated transgenes. // Nucleic Acids Res. 1990. T. 18. № 20. C. 6089–95.

79. Saito R., Koebis M., Nagai T., Shimizu K., Liao J., Wulaer B., Sugaya Y., Nagahama K., Uesaka N., Kushima I., Mori D., Maruyama K., Nakao K., Kurihara H., Yamada K., Kano M., Fukada Y., Ozaki N., Aiba A. Comprehensive analysis of a novel mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome: a model with the most common 3.0-Mb deletion at the human 22q11.2 locus // Transl. Psychiatry. 2020. T. 10. № 1. C. 1–13.

80. Sakurai K., Toyoshima M., Ueda H., Matsubara K., Takeda Y., Karagogeos D., Shimoda Y., Watanabe K. Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse // Dev. Neurobiol. 2009. T. 69. № 12. C. 811–824.

81. Schwyzer U., Binkert F., Caflisch U., Baumgartner B., Schinzel A. Terminal deletion of the short arm of chromosome 3, del(3pter-p25): a recognizable syndrome. // Helv. Paediatr. Acta. 1987. T. 42. № 4. C. 309–15.

82. Seoighe D.M., Gadancheva V., Regan R., McDaid J., Brenner C., Ennis S., Betts D.R., Eadie P.A., Lynch S.A. A chromosomal 5q31.1 gain involving *PITX1* causes Liebenberg syndrome // Am. J. Med. Genet. Part A. 2014. T. 164. № 11. C. 2958–2960.

83. Shaffer L.G., Bejjani B.A., Torchia B., Kirkpatrick S., Coppinger J., Ballif B.C. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future // Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet. 2007. T. 145C. № 4. C. 335–345.

84. Shoukier M., Fuchs S., Schwaibold E., Lingen M., Gärtner J., Brockmann K., Zirn B. Microduplication of 3p26.3 in Nonsyndromic Intellectual Disability Indicates an Important Role of CHL1 for Normal Cognitive Function // Neuropediatrics. 2013. T. 44. № 05. C. 268–271.

85. Spielmann M., Brancati F., Krawitz P.M., Robinson P.N., Ibrahim D.M., Franke M.,

- Hecht J., Lohan S., Dathe K., Nardone A.M., Ferrari P., Landi A., Wittler L., Timmermann B., Chan D., Mennen U., Klopocki E., Mundlos S. Homeotic arm-to-leg transformation associated with genomic rearrangements at the PITX1 locus. // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. T. 91. № 4. C. 629–35.
86. Stankiewicz P., Lupski J.R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease // *Annu. Rev. Med.* 2010. T. 61. № 1. C. 437–455.
87. Stoeckli E.T. Ig Superfamily Cell Adhesion Molecules in the Brain // *Handbook of experimental pharmacology.* , 2004. C. 373–401.
88. Sung Y.H., Baek I.-J., Kim D.H., Jeon J., Lee J., Lee K., Jeong D., Kim J.-S., Lee H.-W. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting // *Nat. Biotechnol.* 2013. T. 31. № 1. C. 23–24.
89. Takeo T., Nakagata N. In Vitro Fertilization in Mice // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018a. T. 2018. № 6. C. [pdb.prot094524](#).
90. Takeo T., Nakagata N. Mouse Sperm Cryopreservation Using Cryoprotectant Containing l-Glutamine // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018b. T. 2018. № 6. C. [pdb.prot094516](#).
91. Tassano E., Uccella S., Giacomini T., Severino M., Fiorio P., Gimelli G., Ronchetto P. Clinical and Molecular Characterization of Two Patients with CNTN6 Copy Number Variations. // *Cytogenet. Genome Res.* 2018. T. 156. № 3. C. 144–149.
92. Verjaal M., Nef M.B. De. A patient with a partial deletion of the short arm of chromosome 3. // *Am. J. Dis. Child.* 1978. T. 132. № 1. C. 43–5.
93. Wagner T.E., Hoppe P.C., Jollick J.D., Scholl D.R., Hodinka R.L., Gault J.B. Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1981. T. 78. № 10 I. C. 6376–6380.
94. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering // *Cell.* 2013. T. 153. № 4. C. 910–918.

95. Wang L., Shao Y., Guan Y., Li L., Wu L., Chen F., Liu M., Chen H., Ma Y., Ma X., Liu M., Li D. Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos // *Sci. Rep.* 2015. T. 5. № 1. C. 1–11.
96. Weehi L. Te, Maikoo R., Mc Cormack A., Mazzaschi R., Ashton F., Zhang L., George A.M., Love D.R. Microduplication of 3p26.3 implicated in cognitive development. // *Case Rep. Genet.* 2014. T. 2014. C. 295359.
97. Wilkie T.M., Palmiter R.D. Analysis of the integrant in MyK-103 transgenic mice in which males fail to transmit the integrant. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. T. 7. № 5. C. 1646–1655.
98. Yang H., Zhang W., Lu S., Lu G., Zhang H., Zhuang Y., Wang Y., Dong M., Zhang Y., Zhou X., Wang P., Yu L., Wang F., Chen L. Mup-knockout mice generated through CRISPR/Cas9-mediated deletion for use in urinary protein analysis // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2016. T. 48. № 5. C. 468–473.
99. Yang H., Wang H., Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Nat. Protoc.* 2014. T. 9. № 8. C. 1956–1968.
100. Yang J.J., Larsen C.M., Grattan D.R., Erskine M.S. Mating-Induced neuroendocrine responses during pseudopregnancy in the female mouse // *J. Neuroendocrinol.* 2009. T. 21. № 1. C. 30–39.
101. Yoshimi K., Kunihiro Y., Kaneko T., Nagahora H., Voigt B., Mashimo T. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. // *Nat. Commun.* 2016. T. 7. C. 10431.
102. Yu Y., Bradley A. Engineering chromosomal rearrangements in mice // *Nat. Rev. Genet.* 2001. T. 2. № 10. C. 780–790.
103. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., Oost J. Van Der, Regev A., Koonin E. V., Zhang F. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System // *Cell.* 2015. T. 163. № 3. C. 759–771.

104. Zhang L., Jia R., Palange N.J., Satheka A.C., Togo J., An Y., Humphrey M., Ban L., Ji Y., Jin H., Feng X., Zheng Y. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. // PLoS One. 2015. T. 10. № 3. C. e0120396.

Приложение

Создание криобанка линий мышей, полученных от основателей-носителей хромосомных перестроек и их редеривация

Все линии мышей, несущие делеции, дупликации и инверсии гена *Cntnb* были получены на базе конвенционального виварии ИЦиГ СО РАН. Для создания криобанка мышей с целевыми хромосомными перестройками от каждой линии были использованы по 2-3 самца (в возрасте старше 3 месяцев) в качестве доноров сперматозоидов для дальнейшей их криоконсервации. Кроме того, криоконсервация линий мышей позволяет сократить содержание невостребованных животных, но при этом сохранить их. Детали криоконсервации описаны в разделе «Материалы и методы».

Известно, что при содержании в конвенциональных вивариях, мыши подвержены инфицированию патогенными инфекциями. Содержание мышей в условиях SPF-вивариев (specific pathogen free) предотвращает наличие условно-патогенных инфекций у мышей, что достигается благодаря специальным условиям содержания и постоянного мониторинга состояния здоровья.

Для проведения редеривации было выбрано 4 линии мышей-носителей делеции (от основателей №20 и №30) и дупликаций (от основателей №1 и №20). Используя криоконсервированные сперматозоиды отобранных линий, были проведены эксперименты по *in vitro* оплодотворению яйцеклеток от самок линии C57BL/6J криоконсервированными сперматозоидами. Оплодотворенные яйцеклетки культивировали до стадии 2-х клеточных эмбрионов, а затем трансплантировали их в яйцеводы псевдобеременных самок линии CD-1. Стоит заметить, что данная процедура является «золотым стандартом» редеривации и обеспечивает полное освобождение от патогенов мышей [Takeo, Nakagata, 2018a,b]. Таким образом, были успешно редеривированы 4 линии мышей в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН.

Динамика массы тела в постнатального период развития гетерозиготных по делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о. относительно мышей генотипа дикого типа в постнатальный период развития

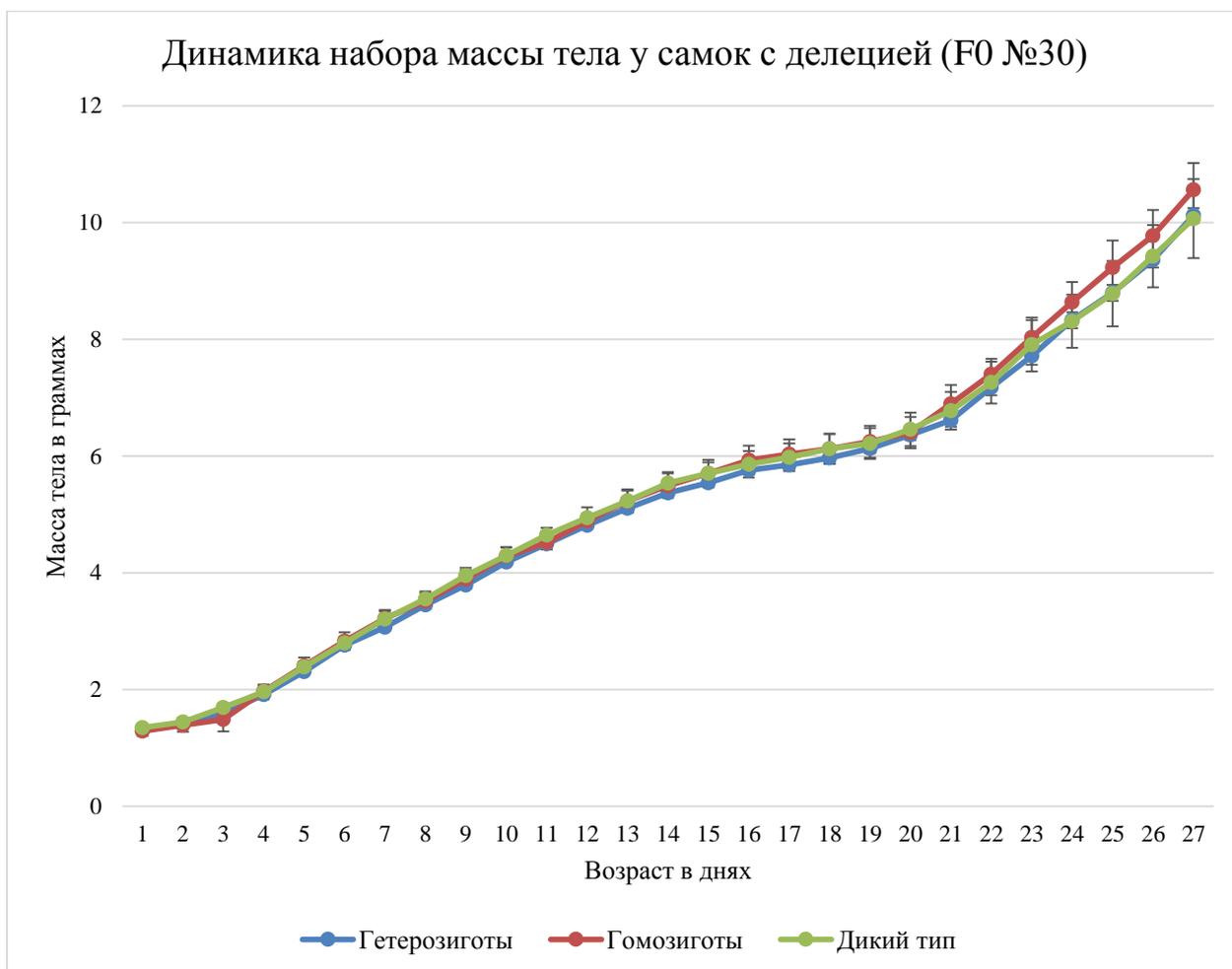


Рисунок 1П. Динамика набора массы тела у самок трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 27-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (оранжевый цвет) и мыши дикого типа были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с делецией (от основателя №30). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

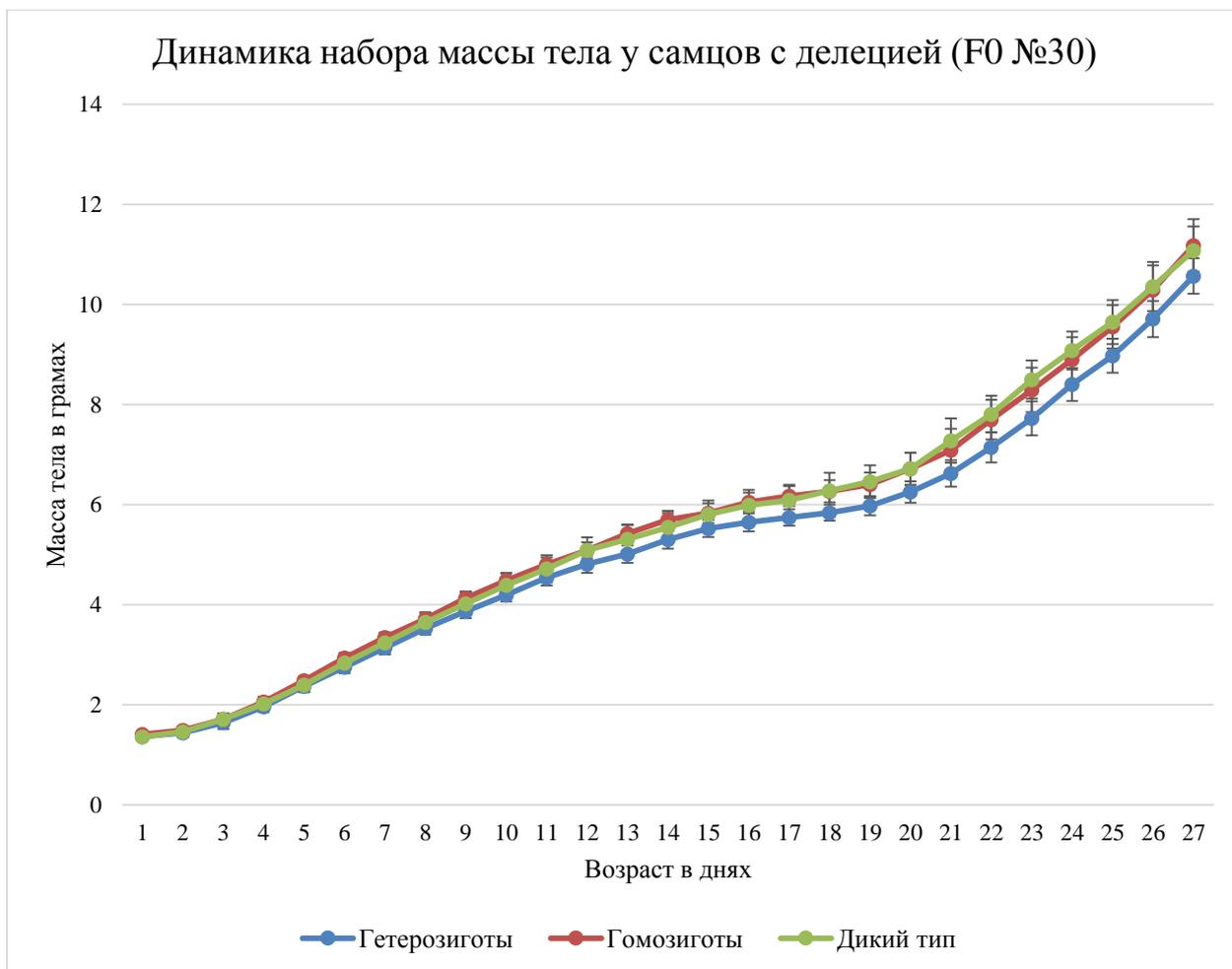


Рисунок 2П. Динамика набора массы тела у самцов трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 27-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (оранжевый цвет) и мыши дикого типа были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с делецией (от основателя №30). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

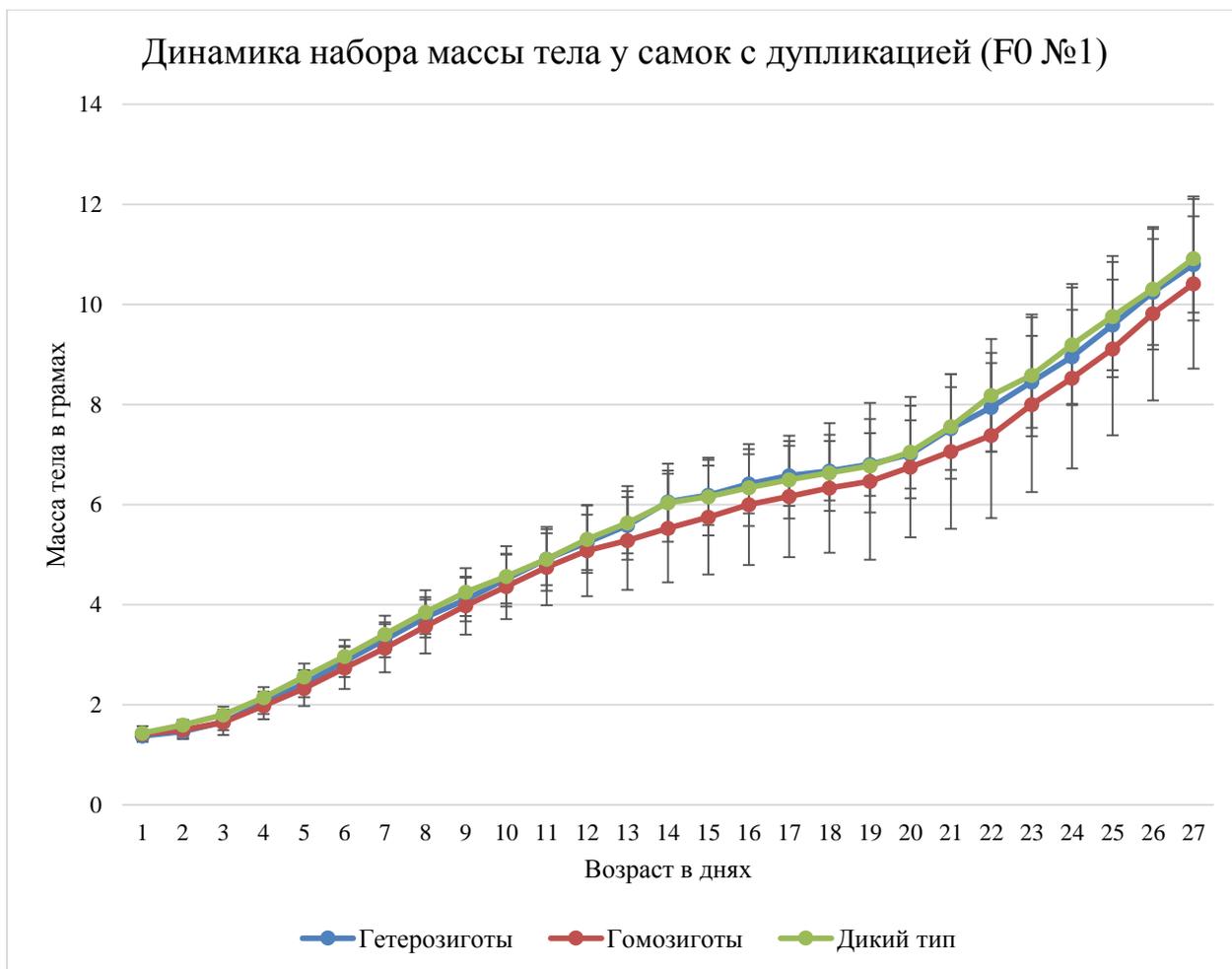


Рисунок 3П. Динамика набора массы тела у самок трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 27-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (оранжевый цвет) и мыши дикого типа были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с дупликацией (от основателя №1). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

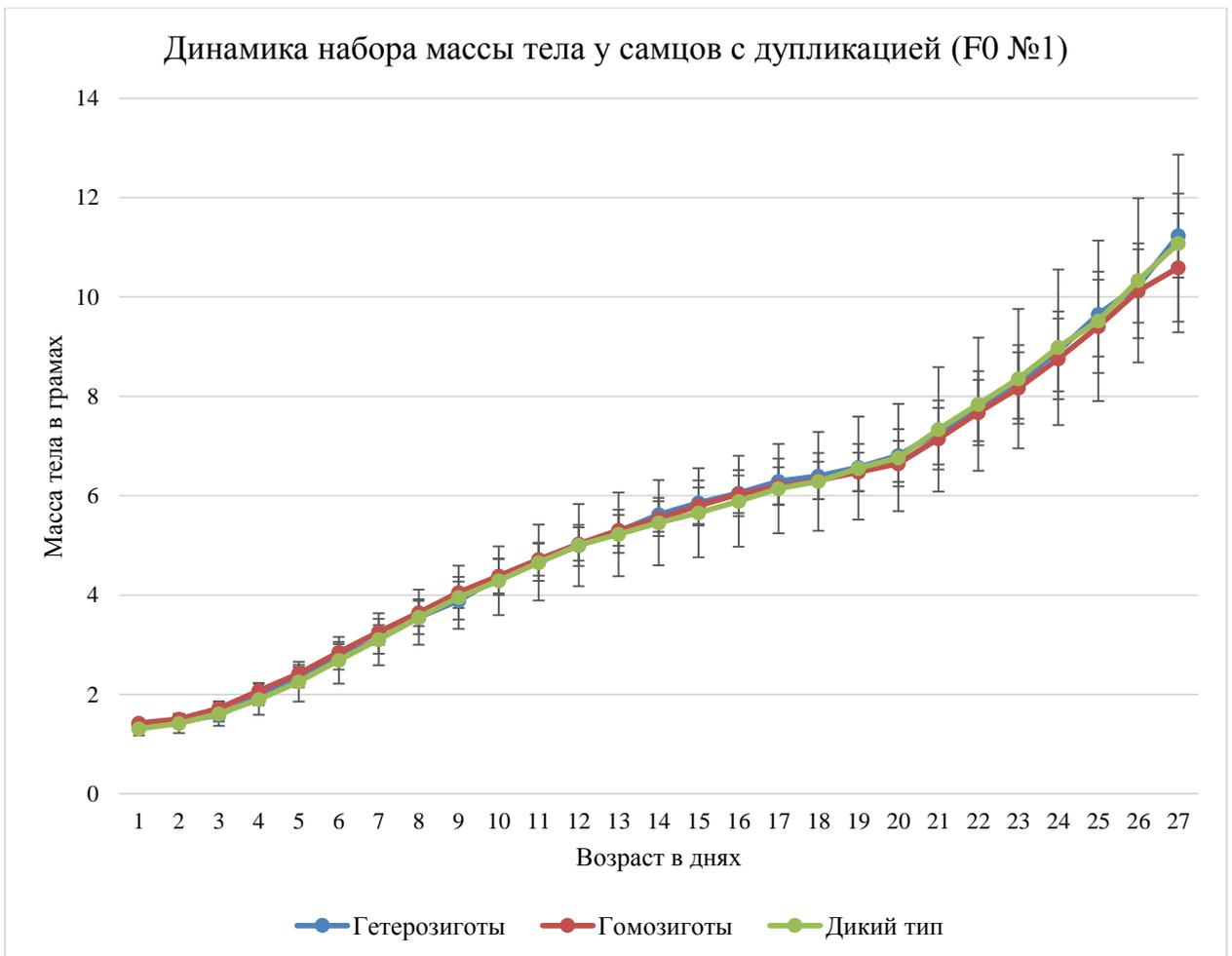


Рисунок 4П. Динамика набора массы тела у самцов трех генотипов в период постнатального развития с момента рождения до 27-дневного возраста. Гетерозиготы (синий цвет), гомозиготы (оранжевый цвет) и мыши дикого типа были получены путем скрещивания гетерозиготных пар с дупликацией (от основателя №1). На графике представлены средние значения со стандартным отклонением.

Экспрессия генов *Chl1*, *Cntn6*, *Cntn4* у гомо- и гетерозиготных носителей делеции 1137 т.п.о. и дупликации 2374 т.п.о.

№	<i>Cntn6</i>	<i>Chl1</i>	<i>Cntn4</i>	№	<i>Cntn6</i>	<i>Chl1</i>	<i>Cntn4</i>
Гетерозиготы по делеции				Гетерозиготы по дупликации			
1	0,483	0,82	0,698	23	1,36	0,729	0,623
2	0,572	0,80	0,621	24	0,986	0,542	0,398
3	0,465	0,82	0,675	25	1,16	0,643	0,511
4	0,339	0,70	0,456	Гомозиготы по дупликации			
5	0,565	1,03	0,748	26	1,66	0,683	0,664
6	0,425	0,60	0,49	27	1,69	0,716	0,597
7	0,509	0,94	0,79	28	1,61	0,7	0,671
Гомозиготы по делеции				29	1,87	0,819	0,722
8	0,0335	0,856	0,577	Мыши дикого типа			
9	0	0,619	0,691	30	0,857	0,70	0,717
10	0,0436	0,675	0,557	31	1,19	0,75	0,806
11	0	0,731	0,534	32	0,947	0,76	0,615
12	0,00176	0,6		33	0,632	0,60	0,485
13	0	0,621		34	0,703	0,71	0,602
14	0,00164	0,732		35	0,767	0,74	0,678
15	0,00233	0,563		36	0,72	0,63	
16	0,0115	0,593		37	0,56	0,54	
17	0	0,622		38	0,676	0,57	
18	0	0,839		39	0,723	0,69	
19	0	0,596		40	0,579	0,54	
20	0,00187	0,703					
21	0,00227	0,686					
22	0,00108	0,55					

Таблица 1П. Экспрессия генов *Cntn6*, *Cntn4* и *Chl1* 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*.