

Таблица 4. Результаты FISH-анализа ЭФМ, гетерозиготных по дупликациям и делециям гена *Cntn6* в одном геноме

Линия ЭФМ, гетерозиготная по дупликациям и делециям <i>Cntn6</i>	Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в %	Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в %	Количество полиплоидных клеток, в %	Количество анеуплоидных клеток, в %	Число проанализированных метафаз
Л44№ 1	0	0.77	5.4	6.1	130
Л44№ 10	0	0	1.5	3.8	130
Л44№ 5	0	0	5.7	3.5	140
Л44№ 8	0	0	2.5	5.8	118

при изучении стабильности кариотипов на ранних пассажах в 32 эмбриональных стволовых (ЭС) линиях мыши, полученных из внутренней клеточной массы бластоцист, было обнаружено спонтанное возникновение трисомии по хромосомам 1, 6, 9, 11, 13, 14, 18 и 19 в некоторых клетках многих ЭС линий, а также моносомия по различным хромосомам в небольшой доле клеток разных ЭС линий.

Возможным объяснением отсутствия трисомии в ЭФМ, несущих дупликацию и делецию гена *Cntn6* в компаунде, является то, что доза гена *Cntn6* в геноме оказалась близкой к норме, в отличие от линий, в которых дупликация *Cntn6* была в гетеро- или гомозиготе. Таким образом, дупликация *Cntn6* и делеция *Cntn6* на разных гомологах в одном геноме оказались более стабильными для генома модификациями, чем когда доза гена *Cntn6* в геноме была выше в 1.5 или 2 раза.

Не исключено, что в клетках исследованных линий ЭФМ, несущих редактированный ген *Cntn6*, трисомия по хромосоме 6 возникает на более высоком уровне, но сопровождается быстрой элиминацией анеуплоидных клеток в раннем развитии эмбриона. Было показано, что, начиная с предимплантационного периода, анеуплоидные клетки элиминируются по мере развития эмбриона путем апоптоза. Эуплоидно-анеуплоидные мозаики, содержащие достаточное количество нормальных диплоидных клеток, имеют полный потенциал развития (Bolton et al., 2016). Недавнее исследование (Singla et al., 2020) подтверждает, что анеуплоидные клетки элиминируются на ранних этапах развития эмбриона путем апоптоза, а нормальные диплоидные клетки увеличивают скорость пролиферации, чтобы компенсировать недостаток в размере эмбриона из-за элиминированных клеток. Также возможно, что дупликация *Cntn6* в гетерозиготе может повышать вероятность трисомии, но не гарантировать ее появление. Так, среди факторов, влияющих на возникновение анеуплоидии, помимо изменений в центромерных районах и динамики митотического веретена выделяют дупликации и изменения хромосомной конденсации и когезии (Goepfert et al., 2000; Cleveland et al., 2003; Kalitsis et al., 2005).

Проведенное исследование показало, что полученные в ходе редактирования генома в зиготе мышей с помощью CRISPR/Cas9 делеция, инверсия и

дупликация гена *Cntn6* приводят к дестабилизации кариотипа. Это выражается в повышенном уровне полиплоидии и анеуплоидии, в частности в появлении трисомии хромосомы 6 в некоторых исследованных линиях ЭФМ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20-04-00463А) и бюджетного проекта № FWNR-2022-0019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры были проведены в соответствии с постановлением совета ЕС (24 ноября 1966, 86/609/ЕЕС) и одобрены комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики (разрешение № 24 от 24.10.2014).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bolton H., Graham S.J.L., Niels V.D.A., Kumar P., Theunis K., Gallardo E.F., Voet T., Zernicka-Goetz M. 2016. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat. Commun.* V. 7. P. 11165.
- Boroviak K., Doe B., Banerjee R., Yang F., Bradley A. 2016. Chromosome engineering in zygotes with CRISPR/Cas9. *Genesis.* V. 54. P. 78.
- Ca L., Fisher A.L., Huang H., Xie Z. 2016. CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes & Diseases.* V. 3. P. 244.
- Canver M.C., Bauer D.E., Dass A., Yien Y.Y., Chung J., Masuda T., Maeda T., Paw B.H., Orkin S.H. 2017. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* V. 292. P. 2556.
- Cleveland D.W., Mao Y., Sullivan K.F. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* V. 112. P. 407.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. 2013. Multiplex

- genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. V. 339. P. 819.
- Cox D.B.T., Platt R.D., Zhang F. 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Rev. V. 21*. P. 121.
- Crasta K., Ganem N.J., Dagher R., Lantermann A.B., Ivanova E.V., Pan Y., Nezi L., Protopopov A., Chowdhury D., Pellman D. 2012. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*. V. 482. P. 53.
- Fujii W., Kawasaki K., Sugiura K., Naito K. 2013. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and Cas9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* V. 41: e187.
- Goepfert T.M., McCarthy M., Kittrell F.S., Stephens C., Ullrich R.L., Brinkley B.R., Medina D. 2000. Progesterone facilitates chromosome instability (aneuploidy) in p53 null normal mammary epithelial cells. *FASEB J.* V. 14. P. 2221.
- Hara S., Kato T., Goto Y., Kubota S., Tamano M., Terao M., Takada S. 2016. 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.* V. 62. P. 531.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. V. 157. P. 1262.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* V. 31. P. 827.
- Hussain W., Mahmood T., Hussain J., Alid N., Shahe T., Qayyum S., Khang I. 2019. CRISPR/Cas system: A game changing genome editing technology, to treat human genetic diseases. *Gene*. V. 685. P. 70.
- Janssen A., van der Burg M., Szuhai K., Kops G.J., Medema R.H. 2011. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*. V. 333. P. 1895.
- Kalitsis P., Fowler K.J., Griffiths B., Earle E., Chow C.W., Jamson K., Choo K.H.A. 2005. Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice. *Genes Chromosomes Cancer*. V. 44. P. 29.
- Korablev A.N., Serova I.A., Serov O.L. 2017. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the Contactin-6 gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. *BMC Genet.* V. 18. P. 112.
- Kosicki M., Tomberg K., Bradley R. 2018. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* V. 36. P. 765.
- Kraft K., Geuer S., Will A.J., Chan W.L., Paliou C., Borschiwer M., Harabula I., Wittler L., Franke M., Ibrahim D.M., Kragestein B.K., Spielmann M., Mundlos S., Lupianez D.G., Andrey G. 2015. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep.* V. 10. P. 833.
- Lin S.R., Yang H.C., Kuo Yi.T., Sung K.C., Lin Y.Y., Wang H.Y., Wang C.C., Shen Y.C., Wu F.Y., Kao J.H., Chen D.S., Chen P.J. 2014. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. V. 3: e186.
- Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Disteche C.M., Bornstein P., Jaenisch R. 1997. Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* V. 209. P. 85.
- Mehravar M., Shirazi A., Nazari M., Banan M. 2019. Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Development. Biology*. V. 445. P. 156.
- Menzorov A., Pristiyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O.L. 2016. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cytotechnology*. V. 68. P. 61.
- Minina Yu.M., Zhdanova N.S., Shilov A.G., Tolkunova E.N., Liskovych M.A., Tomilin A.N. 2010. Chromosomal instability of mouse pluripotent cells cultured *in vitro*. *Cell and Tissue Biology*. V. 4. P. 223.
- Mollanoori H., Shahraki H., Rahmati Y., Teimourian S. 2018. CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human Immunology*. V. 79. P. 876.
- Pankowicz F.P., Barzi M., Legras X., Hubert L., Mi T., Tomolonis J.A., Ravishankar M., Sun Q., Yang D., Borowiak M., Sumazin P., Elesa S.H., Bissig-Choisat B., Bissig K.D. 2016. Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat. Commun.* V. 7. P. 1.
- Podryadchikova O.L., Pristiyazhnyuk I.E., Matveeva N.M., Serov O.L. 2009. FISH analysis of regional replication of homologous chromosomes in hybrid cells obtained by fusion of embryonic stem cells with somatic cells. *Tsitologiya*. V. 51. P. 500.
- Pristiyazhnyuk I.E., Minina J., Korablev A., Serova I., Fishman V., Gridina M., Rozhdestvensky T.S., Gubar L., Skryabin B.V., Serov O.L. 2019. Time origin and structural analysis of the induced CRISPR/cas9 megabase-sized deletions and duplications involving the Cntn6 gene in mice. *Sci. Rep.* V. 9. P. 14161.
- Sakuma T., Masaki K., Abe-Chayama H., Mochida K., Yamamoto T., Chayama K. 2016. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*. V. 21. P. 1253.
- Santaguida S., Richardson A., Iyer D.R., M'Saad O., Zasadil L., Knouse K.A., Wong Y.L., Rhind N., Desai A., Amon A. 2017. Chromosome mis-segregation generates cell cycle-arrested cells with complex karyotypes that are eliminated by the immune system. *Dev. Cell*. V. 41. P. 638.
- Singla S., Iwamoto-Stohl L.K., Zhu M., Zernicka-Goetz M. 2020. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. *Nat. Commun.* V. 11. P. 2958.
- Telenius H., Palmear A.H., Tunnacliffe A., Carter N.P., Behmel A., Ferguson-Smith M.A., Nordenskjold M., Pfragner R., Ponder B.A. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer*. V. 4. P. 226.
- Thompson S.L., Compton D.A. 2011. Chromosomes and cancer cells. *Chromosome Res.* V. 19. P. 433.
- Vetchinova A.S., Simonova V.V., Novosadova E.V., Manuilova E.S., Nenasheva V.V., Tarantul V.Z., Grivennikov I.A., Khaspekov L.G., Illarionov S.N. 2018. Cytogenetic analysis of the results of genome editing on the cell model of Parkinson's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* V. 165. P. 355.

- Yang E., O'Brien P.C.M., Ferguson-Smith M.A. 2000. Comparative chromosome map of the laboratory mouse and chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting. *Chromosome Res.* V. 8. P. 219.
- 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. 2015. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One.* V. 10: e0120396.
- Zhen S., Lu J.J., Wang L.J., Sun X.M., Zhang J.Q., Li X., Luo W.J., Zhao L. 2016. In vitro and in vivo synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on cervical cancer cell line. *Transl. Oncology.* V. 9. P. 498.

CRISPR/Cas9 Induced Duplications, Deletions and Inversions in Mouse Zygotes Lead to Karyotype Instability

J. M. Minina^{a, *}, A. B. Soroka^b, T. V. Karamysheva^a, N. A. Serdyukova^c, and O. L. Serov^a

^a*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia*

^c*Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: minina_jul@mail.ru

CRISPR/Cas9 technology has been widely used for targeted modification of the mammalian genomes. We have analyzed the karyotype of 18 mouse fibroblast cell lines with *Cntn6* gene rearrangements introduced by CRISPR/Cas9. We have produced cell lines with 2374 kb *Cntn6* gene duplications, 1137 kb deletions and inversions of similar size. In addition, we have performed cytogenetic analysis for five control mouse embryonic fibroblasts with the intact *Cntn6* gene alleles. The cell lines heterozygous for *Cntn6* gene inversion and homozygous and heterozygous for *Cntn6* gene duplication had a high level of polyploidy (20–46%), as well as chromosome 6 monosomy (1–9%) and trisomy (1–8%). No trisomy was detected in the four cell lines with the deletion and duplication of the *Cntn6* gene in the compound, and the proportion of polyploid cells was minimal (1.5–5.7%). Thus, we have shown the karyotype destabilization in the cell lines that have undergone genome editing using CRISPR/Cas9 system.

Keywords: CRISPR/Cas9, duplication, deletion, aneuploidy, trisomy, *Cntn6*