

## ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/Cas9 В ЗИГОТАХ МЫШЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДУПЛИКАЦИЙ, ДЕЛЕЦИЙ И ИНВЕРСИЙ ВЛИЯЕТ НА СТАБИЛЬНОСТЬ КАРИОТИПА

© 2023 г. Ю. М. Минина<sup>1</sup> \*, А. Б. Сорока<sup>2</sup>, Т. В. Карамышева<sup>1</sup>, Н. А. Сердюкова<sup>3</sup>, О. Л. Серов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

<sup>3</sup>Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

\*E-mail: minina\_jul@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2022 г.

После доработки 26.12.2022 г.

Принята к публикации 29.12.2022 г.

В современной молекулярной и клеточной биологии CRISPR/Cas9 технология получила широкое применение для адресной модификации геномов человека и животных. В настоящей работе с помощью методов молекулярной цитогенетики был проведен анализ кариотипа в 18 линиях фибробластов мыши (ФМ), в геноме которых ген *Cntn6* был отредактирован с помощью CRISPR/Cas9. Модификации гена *Cntn6* представляли собой дупликации размером 2374 т.п.о., делеции 1137 т.п.о. и инверсии сходного размера. Кроме того, был проведен цитогенетический анализ для контрольных 5 линий эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ), несущих интактный аллель гена *Cntn6*. Проведенное исследование показало наличие высокого уровня полиплоидии для гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6* и гомозиготных и гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ФМ (20–46%), а также наличие моносомии (1–9%) и трисомии по хромосоме 6 (1–8%). Важно отметить, что в 4 линиях ЭФМ, несущих делецию и дупликацию гена *Cntn6* в комплаунде, трисомии обнаружено не было, а доля полиплоидных клеток была минимальна (1.5–5.7%). Таким образом, полученные данные указывают на дестабилизацию кариотипа клеточных линий, претерпевших редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, дупликация, делеция, анеуплоидия, трисомия, *Cntn6*

**DOI:** 10.31857/S0041377123030057, **EDN:** VDNBOE

CRISPR/Cas9 (the clustered regularly interspaced repeat associated protein 9) технология является одной из самых эффективных систем для адресной модификации геномов соматических клеток и зигот разных видов. Технология позволяет создавать двунитевой разрыв ДНК в заданном участке генома для замены, включения или вырезания последовательности ДНК. Высокая эффективность CRISPR/Cas9 обусловлена слаженной работой двух компонентов системы: так называемой направляющей РНК, которая с большой точностью узнает целевой участок ДНК, и белка Cas9, который создает разрыв в этом участке (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Hussain et al., 2019). Несомненным преимуществом CRISPR/Cas9 техно-

логии является ценовая доступность и простота в исполнении, поэтому она широко используется во многих исследованиях, связанных с изучением функции генов, а также при создании моделей различных заболеваний с использованием экспериментальных животных (Hsu et al., 2014; Cai et al., 2016). В клинической медицине с помощью CRISPR/Cas9 активно осваиваются новые подходы в лечении многих тяжелых моногенных заболеваний, таких как гемофилия, дефициты ферментов, комбинированные иммунодефициты (Cox et al., 2015; Cai et al., 2016; Pankowicz et al., 2016), а также некоторых видов рака (Mollanoori et al., 2018) и вирусных заболеваний (Lin et al., 2014; Zhen et al., 2014; Sakuma et al., 2016).

Несмотря на высокую эффективность редактирования CRISPR/Cas9 заданного участка ДНК, появляется все больше данных о возникающих спонтанных мутациях генов не только вдали от участка редактирования генома, но и вблизи него. Так, в исследованиях с использованием парных направляющих РНК для индуцирования целевых делеций сообщалось о возникновении инверсий, эндогенных и

**Принятые сокращения:** BSA (bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин; CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) – короткие палиндромные кластерные повторы/ассоциированный с CRISPR белок 9; FISH (fluorescent *in situ* hybridization) – флуоресцентная *in situ* гибридизация; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЭФМ – эмбриональные фибробласты мыши; ФМ – фибробласты мыши.

экзогенных вставок ДНК и более крупных, чем ожидалось, делеций (Zhang et al., 2015; Boroviak et al., 2016; Nara et al., 2016; Korablev et al., 2017; Kosicki et al., 2018). В настоящий момент имеются лишь ограниченные данные о непредсказуемых изменениях ДНК и дальнейшей судьбе удаленных фрагментов ДНК (Fujii et al., 2013; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015; Canver et al., 2017). Проблемой применения CRISPR/Cas9 в зиготах может стать мозаичность распределения хромосомных модификаций в соматических клетках животного-основателя, поскольку CRISPR/Cas9 может “сработать” на более поздних стадиях развития, когда уже произошло одно или более деление зиготы (Mehravar et al., 2018).

Ранее, с применением технологии CRISPR/Cas9 на зиготах в качестве экспериментальной модели для изучения вариаций числа копий (CNV) гена *CNTN6* нами были получены мыши, несущие дубликации около 2374 т.п.о., делеции размером 1137 т.п.о. и инверсии сходного размера, затрагивающие единственный ген *Cntn6* (кодирует контактин-6) в хромосоме 6 (Korablev et al., 2017). При изучении эффектов адресных модификаций гена после CRISPR/Cas9 с помощью FISH была замечена трисомия по хромосоме 6 в 3.5–4.3% фибробластов, полученных от двух взрослых мышей-основателей (№ 1 и № 20). Интригующим явился тот факт, что трисомия затрагивала именно ту хромосому, в которой производилась модификация ДНК. Фаундеры № 1 и № 20 являлись мозаиками по перестройке, наряду с делецией у них была обнаружена дубликация гена *Cntn6* (Pristyazhnyuk et al., 2019). При FISH анализе невозможно было различить дикий тип и дублированные аллели, поэтому происхождение каждого гомолога в этих трисомных клетках не определялось. Среди немногочисленных данных о дальнейшей судьбе удаленных фрагментов ДНК или изменениях ДНК, сопровождающих перестройки при использовании технологии CRISPR/Cas9 (Fujii et al., 2013; Canver et al., 2017; Kraft et al., 2015; Zhang et al., 2015) ни разу не упоминалось о возникновении трисомии. Учитывая, что это первое описание феномена трисомии в соматических клетках животных с CRISPR/Cas9 индуцированными хромосомными перестройками, мы предположили, что возможным фактором, провоцирующим возникновение трисомии, явилась гетерозиготная масштабная дубликация гена *Cntn6* в геноме. Было показано, что неправильная репарация разрывов в ДНК и неправильная репликация могут приводить к анеуплоидии (Janssen et al., 2011; Thompson, Compton, 2011; Crasta et al., 2012). Возможно, разница в “размере” генного материала на гомологах хромосомы 6 мышей, несущих дубликацию гена *Cntn6* в гетерозиготном состоянии, могла способствовать асинхронности или/и неправильной репликации гомологов в районе встройки и, как следствие, возникновению трисомии. С другой стороны, было показано, что асинхронность репликации имеет место у носителей трисомий. Например, в гибридах эмбриональных стволовых и соматических

клеток мышей при увеличении копий индивидуальных хромосом (1, 3 и 6) происходила асинхронность их репликации в 46–57% клеток (Podryadchikova et al., 2008).

Целью данного исследования было изучить, как наследуется трисомия у потомков основателей № 1 и № 20, несущих дубликацию гена *Cntn6*, сравнить стабильность кариотипов в гомозиготных и гетерозиготных по дубликации гена *Cntn6* линиях ЭФМ. Кроме того, мы включили в исследование две линии фибробластов (№ 21 и № 2), полученные из кожи взрослых мышей-основателей, несущих гетерозиготную инверсию *Cntn6*, полученную при геномном редактировании в зиготе технологией CRISPR/Cas9.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Получение клеточных линий.** 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).

Линии ЭФМ были получены из индивидуальных 13–15 дневных эмбрионов. Эмбрионов освобождали от окружающих тканей, промывали PBS и затем измельчали тела в отдельных чашках Петри в 0.25%-ном растворе трипсина. После инкубирования суспензий 30 мин при 37°C действие трипсина инактивировали добавлением 3 мл культуральной среды DMEM с 10% телячьей сывороткой и 50 мг/мл пенициллина/стрептомицина. Далее образцы центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин, аккуратно сливали супернатант, а осадок переносили в культуральные матрасы со средой. Генотипирование каждой линии проводили с помощью ПЦР-анализа ДНК, выделенной из головы каждого эмбриона (Korablev et al., 2017). Для линии № 1 было выбрано 4 гетерозиготных, 3 гомозиготных по дубликации *Cntn6* линий и 3 линии с интактным аллелем *Cntn6* для дальнейшего культивирования и получения клеточных суспензий. Для линии № 20 для анализа было выбрано 4 гетерозиготных, 2 гомозиготных по дубликации *Cntn6* линий и 2 линии с интактным аллелем *Cntn6*. Кроме того, для исследования было отобрано четыре линии ЭФМ, полученных от компаундных эмбрионов, несущих дубликацию и делецию *Cntn6* в одном геноме и две линии фибробластов: № 2 и № 21, несущих инверсию гена *Cntn6*, полученные из кожи взрослых мышей-основателей. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей сыворотки и 50 мг/мл пенициллина/стрептомицина в CO<sub>2</sub> инкубаторе при pH 7.4 и 37°C. По достижении монослоя клетки снимали с поверхности культурального матраса смесью 0.25%-ного трипсина и 0.1 М ЭДТА (10 : 1) и переносили в нужном разведении в новый культуральный сосуд, содержащий ростовую среду.

**Получение суспензий фиксированных метафазных клеток.** Суспензии фиксированных клеток получали

на 2–4 пассаже по протоколу, описанному ранее (Minina et al., 2010), с некоторыми модификациями. Кратко: к клеточным культурам добавляли коллечид в концентрации 0.5 мкг/мл и выдерживали 2.5 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при pH 7.4 и 37°C. Затем клетки снимали трипсином (0.25% в 0.1 М ЭДТА) в пробирки с последующим центрифугированием 5 мин при 1300 об./мин. Гипотоническую обработку проводили раствором 0.075 М KCl в течение 20 мин при 37°C, затем добавляли раствор Карнуа (3 части метанола, 1 часть ледяной уксусной кислоты) для предфиксации, аккуратно перемешивали и центрифугировали 5 мин при 1300 об./мин. Осадок растворяли в охлажденном растворе Карнуа. Для получения препаратов с метафазными клетками 70–80 мкл клеточной суспензии раскапывали на охлажденное влажное предметное стекло с высоты 15–20 см.

**Флуоресцентная *in situ* гибридизация.** FISH проводили по протоколу, описанному ранее (Pristyazhnyuk et al., 2019) с небольшими модификациями. Кратко: препараты инкубировали 50 мин в растворе РНКзы А (100 мкг/мл) при 37°C, промывали в буфере 2×SSC и выдерживали в растворе пепсина (0.02% в 10 mM HCl) в течение 5 мин при 37°C. Затем препараты фиксировали в 1%-ном формальдегиде в PBS 10 мин и денатурировали в 70%-ном формамиде в 2×SSC 2 мин при 75°C. Зонд, специфичный для хромосомы 6 мыши, был любезно предоставлен Сердюковой Н.А. Зонд был получен путем сортинга и амплификации хромосомы 6 с помощью DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) (Telenius et al., 1992; Yang et al., 2000). Затем библиотека хромосомы 6 мыши была реамплифицирована с помощью ПЦР. Хромосомоспецифичный зонд денатурировали при 95°C в течение 5 мин с последующей предгибридизацией в присутствии Cot1 ДНК в течение 50 мин при 37°C. Гибридизация длилась 24 ч во влажной камере при 37°C. После этого препараты отмывали трижды по 5 мин в растворе 50%-ного формамида (в 2×SSC), затем трижды в 2×SSC при 37°C и один раз в 0.1×SSC при 65°C. Меченый дигоксигенином хромосомоспецифичный зонд выявляли с помощью мышиных антител против дигоксигенина, конъюгированных с Cy3 (красный флуорохром) (1 : 100), и усиливали сигнал специфичными к мышиным антителам антителами овцы, конъюгированными с Cy3 (1 : 100). Хромосомы окрашивали раствором DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндола).

**Анализ данных.** Анализ и съемку результатов гибридизации проводили на микроскопе Axioplan 2 (Zeiss, Germany), оснащенном камерой CV-M300 CCD (JAI Corporation, Япония) в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Института цитологии и генетики СО РАН. Обработку результатов проводили с помощью программы для обработки изображения “ISIS 5” (MetaSystemsGroup, Inc., США). Для каждой линии было проанализировано как минимум по 100 метафазных пластинок. Для оценки различий

между независимыми выборками использовали тест Манна–Уитни и программное обеспечение STATISTICA 10.

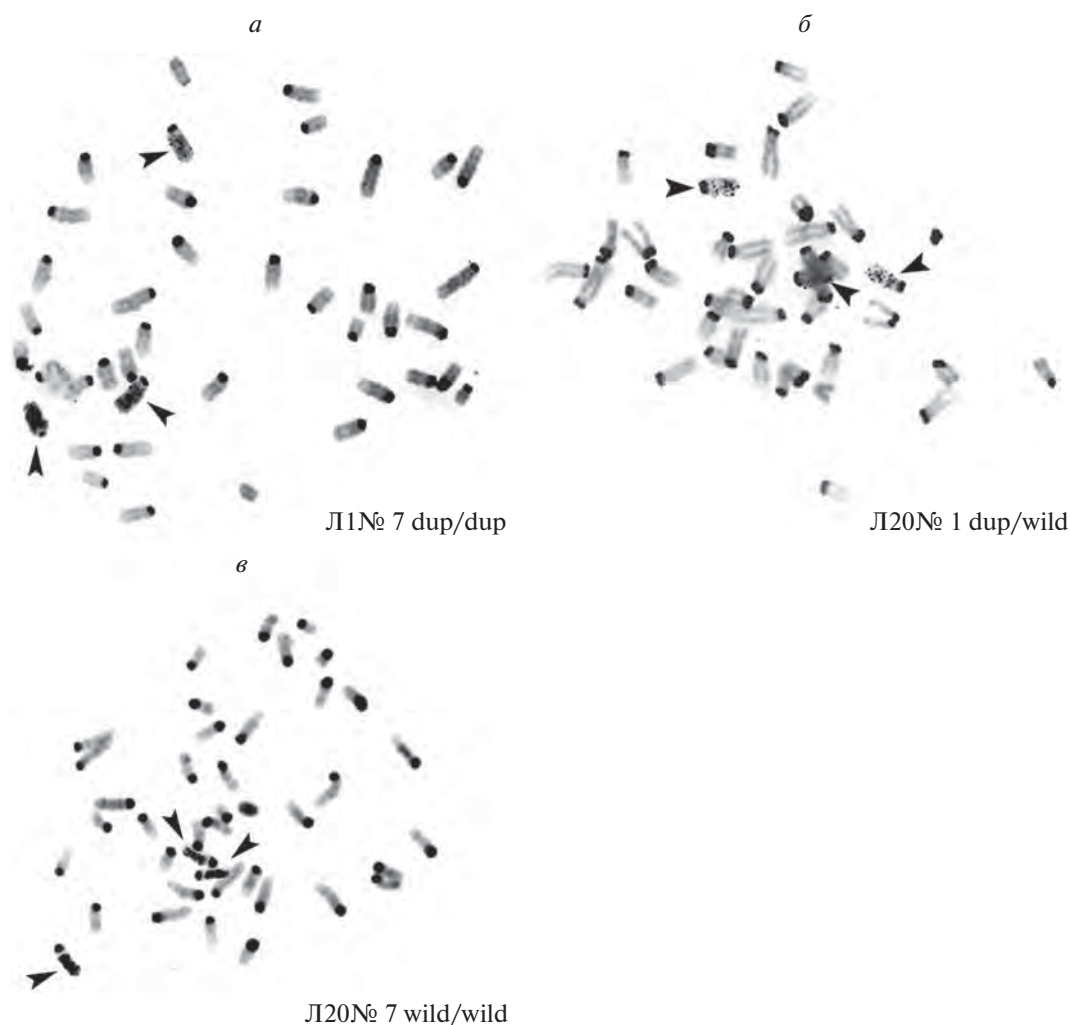
**Использованные реактивы:** 4,6-диамино-2-фенилиндола (DAPI), антифейд (Vector, США); PBS (Медиген, Россия), коллечид, пепсин, пенициллин/стрептомицин и полиоксиэтиленсорбитан монолаурат (Tween 20), РНКза А, формальдегид и деионизованный формамид, NaCl, цитрат натрия C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Sigma, США); конъюгированные с Cy3 антитела мыши к дигоксигенину и конъюгированные с Cy3 антитела овцы к мыши (Jackson ImmunoResearch, Англия); культуральная среда DMEM (Gibco, Termo Fisher Scientific Inc, США); метанол 100% (Химмед, Россия); уксусная кислота (Реахим, Россия); трипсин (Termo Fisher Scientific Inc, США); хлорид калия KCl (Biochem, Франция); хлорид магния MgCl<sub>2</sub> (Amresco, США); эмбриональная сыворотка (Hyclone, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**FISH-анализ гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ЭФМ.** С помощью FISH было проанализировано 8 линий ЭФМ, гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6*: 4 линии ЭФ, несущих дупликацию гена *Cntn6* основателя № 1 и 4 линии с дупликацией гена *Cntn6* от основателя № 20. Поскольку мы использовали ДНК зонд, окрашивающий всю хромосому 6 мыши, то могли легко идентифицировать эти хромосомы на метафазных пластинках (рис. 1а). Трисомия хромосомы 6 в этих линиях была выявлена с разной частотой, от 1 до 8% (табл. 1). В одной линии (Л20№ 2) трисомии хромосомы 6 выявлено не было. Наряду с оценкой уровня трисомии мы исследовали уровень моносомии по этой хромосоме и долю полиплоидных клеток. Моносомия в гетерозиготных по дупликации *Cntn6* линиях выявлена в 1–9% клеток, а полиплоидные клетки составляли 21–44% (табл. 1).

**FISH-анализ гомозиготных по дупликации гена *Cntn6* линий ЭФМ.** Для оценки уровня трисомии хромосомы 6 в гомозиготных по дупликации *Cntn6* клетках было проанализировано 5 линий ЭФМ: 3 линии, несущих дупликацию гена *Cntn6* основателя № 1, и 2 линии с дупликацией гена *Cntn6* основателя № 20. Трисомия хромосомы 6 в этих линиях ЭФМ встречалась в 2–6% клеток (табл. 2, рис. 1б). При этом моносомия по хромосоме 6 выявлена в 1–3% клеток. Доля полиплоидных клеток составляла 36–46%.

**FISH-анализ линий ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*.** В качестве контроля были проанализированы 4 линии ЭФМ, несущие интактный (дикий) аллель гена *Cntn6* и полученные из эмбрионов одного помета с исследуемыми гетерозиготными и гомозиготными по дупликации гена *Cntn6* эмбрионами. В контрольных линиях трисомия, как и моносомия хромосомы 6 была выявлена в 1–2% клеток (табл. 3, рис. 1в). Доля полиплоидных клеток в контрольных линиях



**Рис. 1.** Метафазные хромосомы после FISH с хромосомоспецифичной пробой, окрашивающей всю хромосому 6 мыши, в гомозиготных по дупликации *Cntn6* ЭФМ (а), гетерозиготных по дупликации *Cntn6* ЭФМ (б) и в ЭФМ с интактным геном *Cntn6* (в). Стрелки указывают на хромосомы 6. Увел. об.: 100×.

ЭФМ была значительно меньше, чем в гетеро- и гомозиготных по дупликации *Cntn6* линиях, и составляла 18–26%.

**FISH-анализ линий ЭФМ, несущих дупликацию и делецию гена *Cntn6* в одном геноме.** FISH-анализ в четырех линиях ЭФМ, гетерозиготных по дупликации и делеции *Cntn6* в одном геноме (Л44№ 1, Л44№ 5, Л44№ 8 и Л44№ 10), не выявил трисомии по хромосоме 6. Все четыре линии ЭФ демонстрировали устойчивый кариотип, с незначительной долей анеуплоидных (3.8–6.1%) и полиплоидных (1.5–5.4%) клеток (табл. 4). Причем, анеуплоидия клеток представляла собой в основном потерю одной половой хромосомы.

**FISH-анализ гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6* линий ФМ.** Был проведен цитогенетический анализ двух линий фибробластов, кожи взрослых мышей-основателей, № 1 и № 2, гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6*, полученной при геномном ре-

дактировании в зиготе технологией CRISPR/Cas9 (Korablev et al., 2017). В обеих линиях была выявлена трисомия хромосомы 6 в 2% клеток, что сопоставимо с уровнем трисомии по этой хромосоме в контрольных линиях ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*. Доля полиплоидных клеток составляла 20 и 26%, а анеуплоидных 40 и 43% в исследованных линиях № 21 и № 2 соответственно.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что уровень трисомии по хромосоме 6 в гетерозиготных и гомозиготных по дупликации гена *Cntn6* линиях ЭФМ оказался в среднем одинаковым (1–8 и 2–6% соответственно, статистически достоверных различий найдено не было), уровень трисомии среди линий ЭФМ внутри каждой выборки варьировал значительно. По всей видимости, это обусловлено внутренними свойствами каж-

**Таблица 1.** Результаты FISH-анализа ЭФМ, гетерозиготных по дупликации гена *Cntn6*

| Линия ЭФМ, гетерозиготная по дупликации гена <i>Cntn6</i> | Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в % | Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в % | Количество полиплоидных клеток, в % | Число проанализированных метафаз |
|---|---|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| Л1№ 4   | 8   | 4  | 44                                  | 100                              |
| Л1№ 8   | 3   | 0  | 40                                  | 100                              |
| Л1№ 7-2м  | 4   | 0  | 20                                  | 100                              |
| Л1№ 3-2м  | 1   | 1  | 28                                  | 100                              |
| Л20№ 1  | 4   | 9  | 34                                  | 100                              |
| Л20№ 2  | 0   | 0  | 21                                  | 100                              |
| Л20№ 5  | 3   | 1  | 34                                  | 100                              |
| Л20№ 6  | 3   | 2  | 25                                  | 100                              |

**Таблица 2.** Результаты FISH-анализа ЭФМ, гомозиготных по дупликации гена *Cntn6*

| Линия ЭФМ, гомозиготная по дупликации гена <i>Cntn6</i> | Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в % | Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в % | Количество полиплоидных клеток, в % | Число проанализированных метафаз |
|---|---|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| Л1№ 5   | 4   | 2  | 40                                  | 100                              |
| Л1№ 7   | 6   | 1  | 40                                  | 100                              |
| Л1№ 9   | 2   | 1  | 36                                  | 100                              |
| Л20№ 3  | 6   | 1  | 37                                  | 100                              |
| Л20№ 4  | 2   | 3  | 46                                  | 100                              |

дой отдельной линии. Ранее была показана зависимость скорости полиплоидизации, возникновения моносомий, трисомий по отдельным хромосомам и других хромосомных перестроек от индивидуальных свойств линий и условий культивирования (Liu et al., 1997). С другой стороны, для клеток со сложными анеуплоидными кариотипами характерно раннее старение, при котором они вырабатывают провоспалительные сигналы, приводящие к их элиминации естественными клетками-киллерами *in vitro* (Santaguida et al., 2017). Надо отметить, что в нашем исследовании некоторые линии ЭФМ, гетерозиготные и гомозиготные по дупликации гена *Cntn6*, останавливали свое деление уже после 2–4 пассажа. Поскольку условия культивирования в нашем исследовании у всех линий ЭФМ были идентичны, и анализ проводили в клетках на ранних пассажах, то высо-

кий уровень полиплоидии и анеуплоидии отражает, вероятно, проблемы в работе митотического аппарата клеток. В другом исследовании было отмечено появление тетраплоидных клеток (от 24 до 43%) в предшественниках нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с LRRK2-ассоциированной формой паркинсонизма после процедуры редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9. Кроме того, в некоторых клетках были обнаружены разрывы хромосом и транслокации (Vetchinova et al., 2018).

Трисомия хромосомы 6 в линиях ЭФМ, гетерозиготных по инверсии гена *Cntn6*, как и в контрольных линиях ЭФМ, несущих интактный аллель гена *Cntn6*, по всей видимости, возникла спонтанно в единичных культивируемых клетках. В исследовании Мензорова с соавторами (Menzorov et al., 2016)

**Таблица 3.** Результаты FISH-анализа контрольных линий ЭФМ с интактным аллелем *Cntn6*

| Линия ЭФМ с интактным аллелем гена <i>Cntn6</i> | Доля клеток с трисомией по хромосоме 6, в % | Доля клеток с моносомией по хромосоме 6, в % | Количество полиплоидных клеток, в % | Число проанализированных метафаз |
|---|---|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| Л1№ 1   | 0   | 2  | 26                                  | 100                              |
| Л1№ 1-2м  | 2   | 0  | 22                                  | 100                              |
| Л20№ 7  | 2   | 1  | 29                                  | 100                              |
| Л20№ 8  | 1   | 1  | 18                                  | 100                              |

**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 ФМ, 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. Clin. Oncol.* V. 11. 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., Distech 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*. V. 146. 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<sup>a, \*</sup>, A. B. Soroka<sup>b</sup>, T. V. Karamysheva<sup>a</sup>, N. A. Serdyukova<sup>c</sup>, and O. L. Serov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>b</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia*

<sup>c</sup>*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*