

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-59

## СОЗДАНИЕ ИЗОГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИИ ИОННОГО КАНАЛА CFTR

### GENERATION OF AN ISOGENIC CELL MODEL USING CRISPR/CAS9 TO STUDY CFTR ION CHANNEL FUNCTIONALITY

А. А. Борисова<sup>1,2</sup>, И. Ю. Иванов<sup>1,2</sup>, О. Н. Козлов<sup>1,2</sup>, А. В. Творогова<sup>1</sup>, Т. В. Егорова<sup>1,2</sup>, А. В. Панова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт биологии гена РАН, Москва*

<sup>2</sup>*ООО «Марлин Биотех», Сочи*

A.A. Borisova<sup>1,2</sup>, I.Y. Ivanov<sup>1,2</sup>, O.N. Kozlov<sup>1,2</sup>, A.V. Tvorogova<sup>1</sup>, T.V. Egorova<sup>1,2</sup>, A.V. Panova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Gene Biology RAS, Moscow*

<sup>2</sup>*Marlin Biotech LLC, Sochi*

 boriso08@yandex.ru

#### **Аннотация**

На основе клеток аденокарциномы кишечника Caco-2 была создана изогенная клеточная линия с биаллельным нокаутом по гену *CFTR*, Caco-2-CFTR-KO. Был разработан протокол 3D-культивирования клеток и показано, что полное отсутствие функционального белка CFTR приводит к развитию патологического фенотипа в форсколин-индуцируемом тесте.

#### **Abstract**

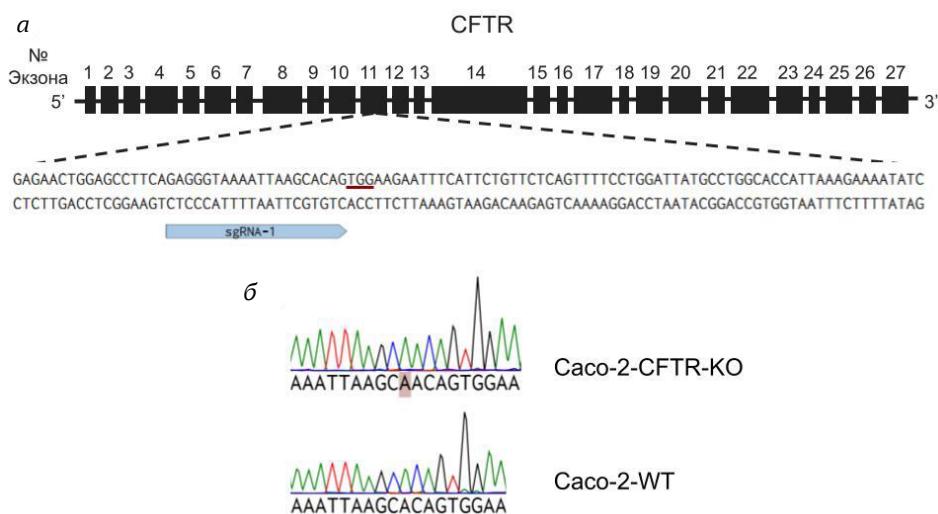
An isogenic *in vitro* model was developed based on intestinal adenocarcinoma Caco-2 cells using the CRISPR/Cas9 system to assess ion channel function. The model demonstrates complete absence of functional CFTR protein and exhibits a pathological phenotype in 3D culture.

Муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR) — это ионный канал, регулирующий транспорт  $\text{Cl}^-$  и  $\text{HCO}_3^-$  через мембрану эпителиальных клеток. Экспрессия CFTR наблюдается в легких, кишечнике, поджелудочной, потовых и других железах. Мутации в гене *CFTR* приводят к муковисцидозу — тяжелому аутосомно-рецессивному заболеванию, для которого не существует универсального лечения. Наиболее физиологичной *in vitro* моделью для оценки функции ионного канала CFTR являются ректальные органоиды, полученные из биоптатов кишечника пациентов. Они позволяют проводить персонализированный подбор лечения с помощью форсколинового теста. Однако высокая стоимость, трудоемкость культивирования и вариабельность, обусловленная генетическими различиями доноров, ограничивают их использование. Целью данной работы являлось создание универсальной *in vitro* модели муковисцидоза на основе стабильной клеточной линии.

С использованием системы CRISPR/Cas9 мы нокаутирували ген *CFTR* в клетках аденокарциномы кишечника Caco-2, эндогенно экспрессирующих CFTR. Для этого специфичную гидовую РНК, нацеленную на область рядом с кодоном F508, делеция которого является наиболее частой мутацией при муковисцидозе, а также нуклеазу SpCas9 доставляли с помощью вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP. GFP-положительные клетки отбирали на клеточном сортере с последующим клонированием. Для подтверждения успешного редактирования проводили ПЦР-амплификацию целевого локуса *CFTR* с последующим секвенированием по Сэнгеру. Из 17 полученных клонов был выявлен 1 клон с биаллельной нокаутирующей мутацией — вставкой A, приводящей к сдвигу рамки считывания (рис. 1). Кроме того, обнаружены 5 клонов с последовательностью гена *CFTR* дикого типа, 11 клонов с гетерозиготными делециями.

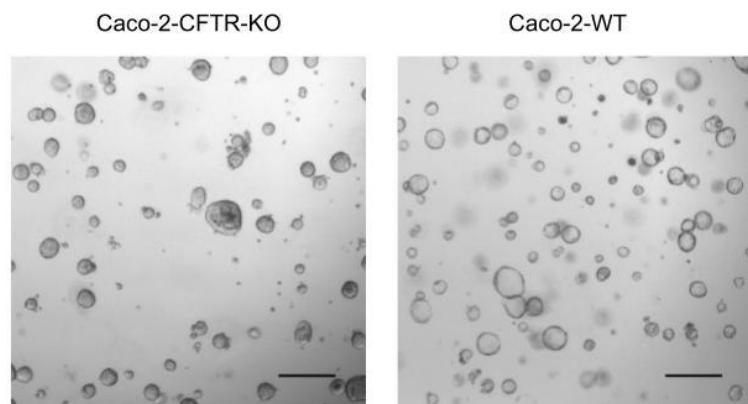
Последующая оценка экспрессии с использованием количественной ОТ-ПЦР показала, что в клетках с биаллельным нокаутом (Caco-2-CFTR-KO) уровень мРНК *CFTR* не изменился. Однако по данным вестерн-блоттинга в клетках Caco-2-CFTR-KO отсутствовал полноразмерный белок CFTR.

При культивировании обеих клеточных линий в матригеле, аналогично кишечным органоидам пациентов, они формировали 3D-органоиды. Мы выявили существенные морфологические различия между органоидами Caco-2-WT и Caco-2-CFTR-KO. В то время как Caco-2-WT формировали поляризованные цисты с центральной полостью [1], клетки с нокаутом по *CFTR* образовывали плотные структуры без полости.



*Rис. 1.* Нокарт гена *CFTR* в клетках Caco-2 с помощью CRISPR/Cas9: *a* — схематическое изображение целевого участка гена *CFTR* с подобранный sgRNA. Подчеркнутый триплет TGG указывает на положение PAM-сайта; *б* — хроматограммы секвенирования клеток Caco-2-CFTR-KO и Caco-2-WT

Для оценки функции CFTR на органоидах, полученных от пациентов, используется форсколиновый тест. При активации CFTR форсколином хлорид секретируется в просвет цисты, вода и натрий пассивно выходят в том же направлении, что приводит к набуханию органоида. Мы провели форсколиновый тест на полученных нами 3D-структур: в отличие от Caco-2-WT, демонстрирующих ожидаемое набухание, органоиды из Caco-2-CFTR-KO не формировали полость и не изменили свой объем (рис. 2). Это подтверждает функциональные различия нокартной по CFTR и родительской линии в отношении транспорта ионов хлора.



*Rис. 2.* Форсколиновый тест на клетках Caco-2, масштабная линейка = 250 мкм. Слева — органоиды из нокартных клеток сохраняют плотные структуры без полости после добавления форсколина. Справа — органоиды из клеток дикого типа после добавления форсколина набухают и образуют полость

Таким образом, нами была разработана *in vitro* модель муковисцидоза Caco-2-CFTR-KO. Ключевое преимущество полученной модели заключается в полной генетической идентичности с родительской линией аденоактиномы кишечника Caco-2 за исключением целевой мутации в гене *CFTR*, что позволяет минимизировать влияние генетического фона при тестировании различных патогенетических терапий. При переходе к 3D-культурированию Caco-2-CFTR-KO демонстрируют выраженный и воспроизводимый фенотип, что делает разработанную модель перспективной для создания стандартизированного теста функциональной активности CFTR.

### Литература

1. Jaffe A. B., Kaji N., Durgan J. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis // The Journal of Cell Biology. 2008. Vol. 183, No. 4. P. 625–633.