

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 Сасо-2 была создана изогенная клеточная линия с биаллельным нокаутом по гену *CFTR*, Сасо-2-*CFTR*-КО. 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 нокаутировали ген *CFTR* в клетках аденокарциномы кишечника Сасо-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 А, 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 (Сасо-2-*CFTR*-КО) уровень мРНК *CFTR* не изменился. Однако по данным вестерн-блоттинга в клетках Сасо-2-*CFTR*-КО отсутствовал полноразмерный белок CFTR.

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

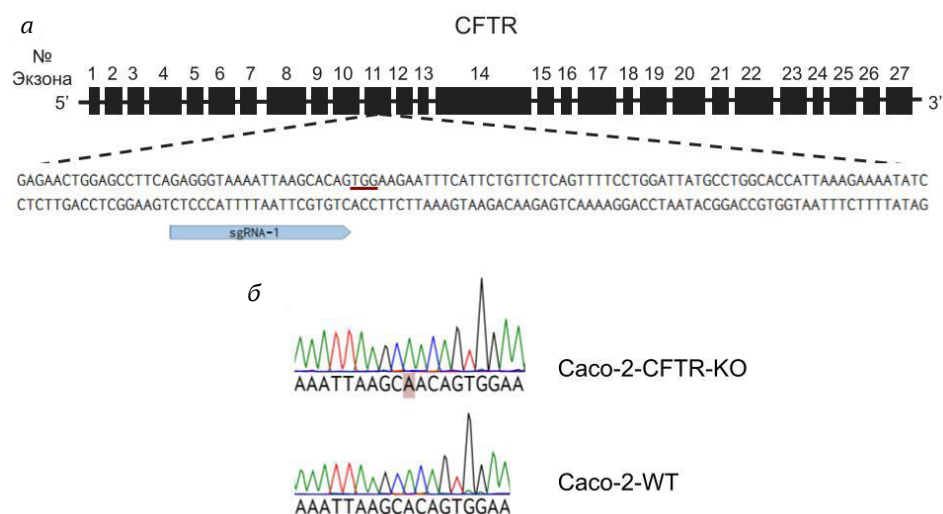


Рис. 1. Нокаут гена *CFTR* в клетках Сасо-2 с помощью CRISPR/Cas9: а — схематическое изображение целевого участка гена *CFTR* с подобранной sgRNA. Подчеркнутый триплет TGG указывает на положение PAM-сайта; б — хроматограммы секвенирования клеток Сасо-2-CFTR-KO и Сасо-2-WT

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-структурах: в отличие от Сасо-2-WT, демонстрирующих ожидаемое набухание, органоиды из Сасо-2-CFTR-KO не формировали полость и не изменили свой объем (рис. 2). Это подтверждает функциональные различия нокаутной по CFTR и родительской линии в отношении транспорта ионов хлора.

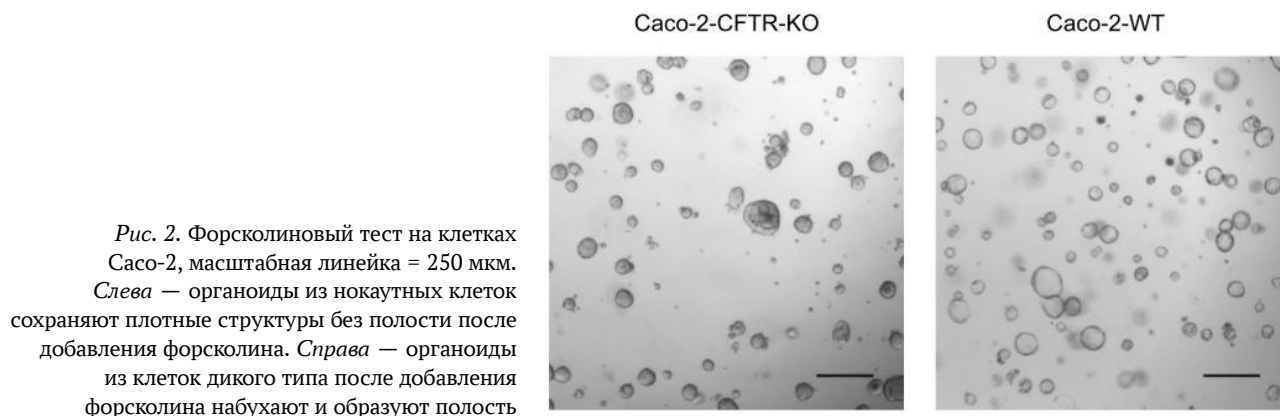


Рис. 2. Форсколиновый тест на клетках Сасо-2, масштабная линейка = 250 мкм. Слева — органоиды из нокаутных клеток сохраняют плотные структуры без полости после добавления форсколина. Справа — органоиды из клеток дикого типа после добавления форсколина набухают и образуют полость

Таким образом, нами была разработана *in vitro* модель муковисцидоза Сасо-2-CFTR-KO. Ключевое преимущество полученной модели заключается в полной генетической идентичности с родительской линией аденокарциномы кишечника Сасо-2 за исключением целевой мутации в гене *CFTR*, что позволяет минимизировать влияние генетического фона при тестировании различных патогенетических терапий. При переходе к 3D-культивированию Сасо-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.