

УДК 577.29

ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИКОВ С НОКАУТОМ ГЕНА *LEPR* С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9

© 2024 г. Ю. Ю. Силаева¹, П. Д. Сафонова², Д. В. Попов³, М. А. Филатов¹, Ю. Д. Окулова¹,
Р. А. Шафеев⁴, О. И. Скобель³, Д. Э. Высоцкий³, Ю. Д. Губарев⁵, В. И. Глазко³,
Т. Т. Глазко³, академик РАН П. Г. Георгиев², Г. Ю. Косовский³, М. В. Шепелев^{1, *}

Поступило 25.05.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принято к публикации 30.06.2024 г.

Мутации в гене *LEPR*, кодирующем рецептор гормона лептина, у человека приводят к развитию морбидного ожирения, нарушению обмена липидов, дефектами фертильности. У грызунов описаны спонтанные мутации в гене *LEPR*, а также получены животные с нокаутом *LEPR*, в том числе с помощью системы CRISPR/Cas9. Особенности липидного обмена у грызунов существенно отличаются от таковых у человека или кроликов, поэтому наиболее релевантной моделью нарушений липидного обмена и морбидного ожирения являются кролики, однако до настоящего времени не сообщалось о получении кроликов с нокаутом гена *LEPR*. В данной работе с помощью системы CRISPR/Cas9 за счет внесения делеции в области 10 экзона был получен кролик с нокаутом гена *LEPR*. Показано, что вес нокаутного кролика был существенно выше среднего веса кроликов дикого типа. Технология получения кроликов с нокаутом *LEPR* с помощью CRISPR/Cas9 позволит создать модель морбидного ожирения и эндокринных нарушений, обусловленных мутациями в гене рецептора лептина человека.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, *LEPR*, лептин, генетически модифицированный кролик

DOI: 10.31857/S2686738924050071

Пептидный гормон лептин (16 кДа) продуцируется белой жировой тканью (относится к адипокинам) и регулирует пищевое поведение, энергообмен и множество других нейроэндокринных функций [1]. Эффекты лептина реализуются за счет связывания с трансмембранным рецептором, кодируемым геном *LEPR*, и относящимся к семейству gp130 рецепторов цитокинов [2]. Основные эффекты лептина опосредованы активацией JAK-STAT сигнального пути, а также таких

сигнальных белков как SOCS3, PTP1b, MAP-киназы и IRS (субстрат инсулинового рецептора) [2]. Длинная форма рецептора состоит из трех доменов — внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного. Описана растворимая изоформа рецептора лептина, представляющая собой отщепленную внеклеточную часть рецептора, циркулирующую в крови и играющую роль лептин-связывающего белка [3]. Показано, что взаимодействие лептина с его рецептором необходимо для регуляции аппетита, расхода энергии, поддержания гомеостаза глюкозы и фертильности. У человека описано более 50 клинических случаев ожирения, обусловленного мутациями в гене *LEPR* [4]. Созданы генетически модифицированные грызуны с нокаутом гена *LEPR*, однако их фенотип не вполне совпадает с симптомами, наблюдаемыми у людей [5]. Известно об участии лептина в индукции и регуляции хронических воспалительных процессов, дегенеративных заболеваний, аутоиммунных патологий, диабета 2-го типа и рака [6]. Кроме того, лептин регулирует репродуктивные функции, а у самок мышей с тканеспецифическим нокаутом *LEPR* в репродуктивной системе нарушается фертильность [7].

¹Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

³Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, пос. Родники, Московская область, Россия

⁴Московский Государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵Белгородский государственный национальный университет, Белгород, Россия

*e-mail: mshepelev@mail.ru

Однако весь спектр эффектов, связанных с активацией/ингибированием лептиновых рецепторов, изучен пока недостаточно.

Мыши линий (*diabetes/db*) и (*obese/ob*) с фенотипом, характеризующимся метаболическими нарушениями, гипергликемией, ожирением и симптомами диабета, были описаны в 60-70-е годы XX века [8]. Впоследствии было установлено, что фенотип *ob/ob* обусловлен мутацией в гене лептина [9], а фенотип *db/db* — мутацией в гене *LEPR* [10]. Показано, что у таких мышей инсерция длиной 106 п.о. между 18 и 19 экзонами приводит к формированию укороченного нефункционального белка [10]. С помощью технологии классического нокаута генов были получены мыши с Cre-индуцибельным нокаутом *LEPR* за счет делеции первого или 17 экзонов [11, 12]. На основе этих линий получали животных с нокаутом *LEPR* в различных тканях (в нейронах, печени, поджелудочной железе, жировой ткани, клетках эндотелия и др.) [12–16]. Было показано, что именно действие лептина на рецептор *LEPR* в гипоталамусе, но не в других тканях, регулирует аппетит у экспериментальных животных [12]. Спонтанная мутация в гене *LEPR*, приводящая к ожирению, была описана и у крыс (линия Zucker или *fatty* (*fa/fa*)) [17]. Кроме того, появление технологий геномного редактирования позволило получить крыс с нокаутом *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9 за счет внесения инделов в 4 экзоне гена [18]. Однако оказалось, что фенотип грызунов с мутациями в гене *LEPR* не вполне совпадает с симптомами, наблюдаемыми у людей [5]. Это может быть связано с тем, что у мышей, помимо ряда других особенностей, в отличие от человека и кроликов, холестерин в плазме крови преимущественно связан с липопротеинами высокой плотности, что приводит к резистентности мышей к развитию атеросклероза. Таким образом, моделирование нарушений липидного обмена, наиболее актуально именно на моделях генно-модифицированных кроликов, а не мышей [19]. Кролики с нокаутом гена *LEPR* до настоящего времени описаны не были, поэтому целью данной работы было создание кроликов с нокаутом гена *LEPR* с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Ген *LEPR* кролика локализован на 13 хромосоме, содержит 28 экзонов, включая альтернативные. Известно 14 изоформ транскрипта *LEPR*, кодирующих 5 изоформ белка. Гидовую РНК для нуклеазы SpCas9 выбирали с помощью ресурса ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>), используя в качестве запроса нуклеотидную последовательность одного из самых длинных транскриптов гена *LEPR* (XM_051856399, транскрипт вариант 8, кодирует белок изоформы X1, и состоит из 21 экзона). В результате были выбраны две гидовые РНК с наивысшим рангом (GCTGACACGATCATTACACAACGG; sgLepr-1)

и (ATAATTCCGCATAGCGATGATGG; sgLepr-2), комплементарные мишеням в 10 экзоне гена *LEPR*, которые присутствуют во всех изоформах транскрипта.

Далее, для выявления возможных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, single nucleotide polymorphism) амплифицировали участок генома кролика, включающий 10 экзон гена *LEPR*, в котором находятся мишени для гидовых РНК. Геномную ДНК из тканей кролика породы советская шиншилла выделяли с помощью набора реагентов GeneElute Mammalian genomic DNA Miniprep Kit (“Sigma-Aldrich”, США, G1N350) и фрагмент длиной 642 п.о. амплифицировали в реакции объемом 25 мкл, содержащей 1-х кратный мастермикс PrimeSTAR® HS (“TakaraBio”, Япония, R040), 160 нМ прямого (“F”, 5-gtctttatctgatatcctgcttt-3) и обратного (“R”, 5-gttagctcactataccsacaga-3) праймеров, и 20 нг геномной ДНК при следующих условиях: +94°C — 3 мин; 35х циклов +94°C — 30 с, +62°C — 30 с, +72°C — 45 с; +72°C — 3 мин, +4°C — постоянно. Продукт ПЦР очищали из реакционной смеси с помощью набора реагентов DNA Clean & Concentrator-25 (“Zymo Research”, США, D4034) и секвенировали по Сэнгеру используя праймер “F”. Было обнаружено, что мишень для гидовой РНК sgLepr-1 содержит два SNP: C/G во второй позиции протоспейсера и G/A в РАМ-сайте (данные не показаны), а мишень для гидовой РНК sgLepr-2 — один SNP A/T в 20-м положении протоспейсера (рис. 1А). На основании этих результатов для получения кроликов с нокаутом гена *LEPR* была выбрана гидовая РНК sgLepr-2, так как в геноме присутствует один SNP, и, значит, как минимум один аллель будет эффективно разрезаться нуклеазой SpCas9.

Далее получали гидовую РНК sgLepr-2 для микроинъекций в зиготы. Вначале на основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (далее — pX300; Addgene #42230), конструировали плазмиду pX330-sgLepr-2. Для этого одноцепочечные синтетические олигонуклеотиды (“Евropen”, Россия) 5-caccgataattccgcatacgatga-3 и 5-aaactcatcgctatgcggaattatc-3 гибридизовали для формирования двуцепочечных олигонуклеотидов и клонировали в вектор pX330 по сайту BbsI. Далее, получали ДНК-матрицу для транскрипции *in vitro* (IVT), амплифицируя на матрице плазмиды pX330-sgLepr-2 фрагмент длиной 122 п.о. с праймерами 5-tgtaatacagactcactataggataattccgcatacgatga-3 и 5-aaaagcaccgactcggtgcc-3 в реакции объемом 50 мкл, содержащей 1-кратный премикс PrimeSTAR® HS, праймеры в концентрации 200 нМ и 1 нг плазмиды pX330-sgLepr-2. Реакцию проводили при следующих условиях: +95°C — 2 мин; 5х циклов: +95°C — 15 с, +72°C — 20 с; 5х циклов: +95°C — 15 с, +66°C — 10 с, +72°C — 20 с; 25х циклов: +95°C — 15 с, +63°C — 10 с, +72°C — 20 с;

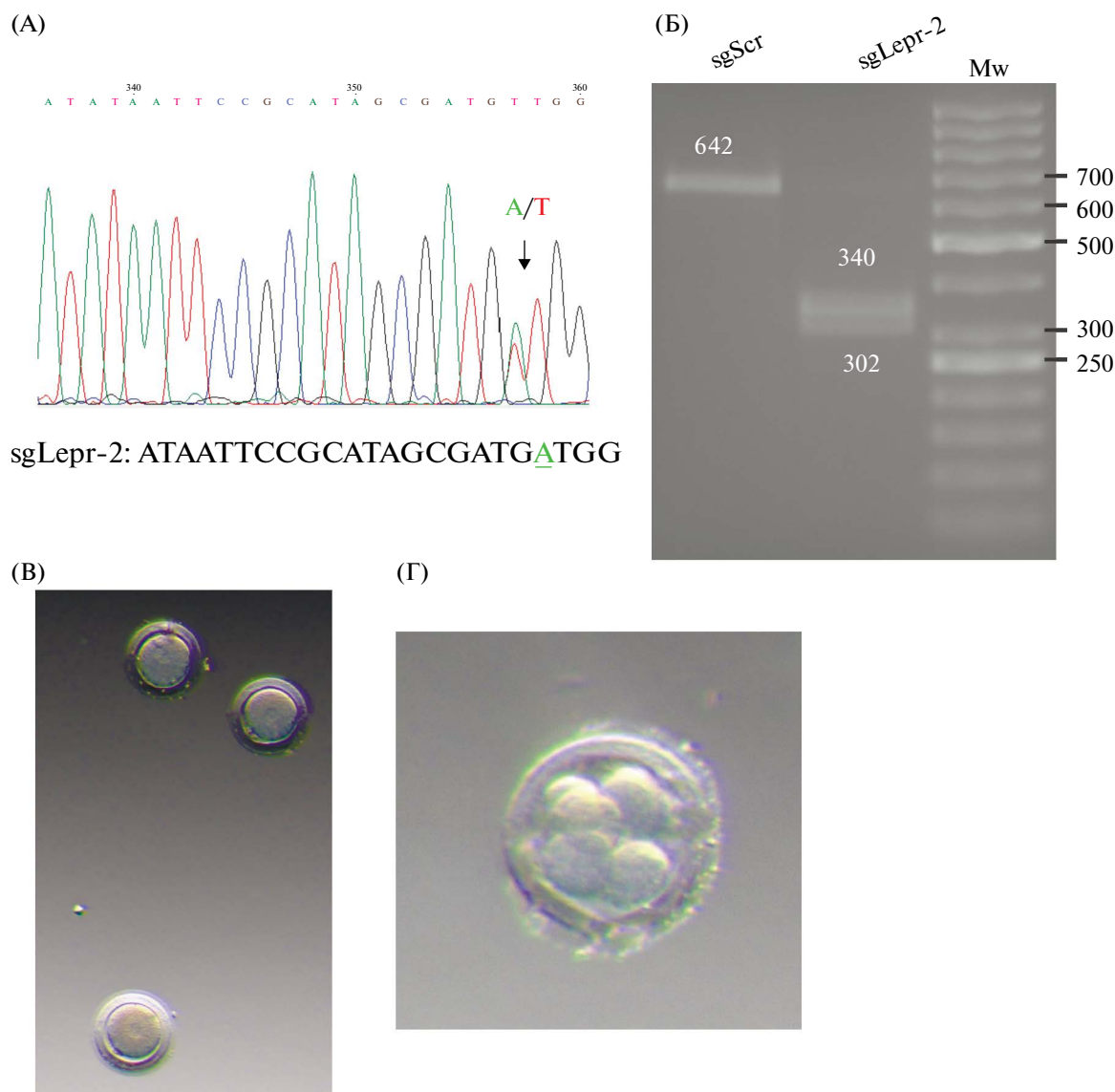


Рис.1. Разработка технологии нокаута гена *LEPR* кроликов с помощью системы CRISPR/Cas9. (а) Результаты секвенирования по Сэнгеру мишени для sgLepr-2 в геноме кролика. SNP A/T в 20 позиции протоспейсера указан стрелкой. Снизу от хроматограммы приведена нуклеотидная последовательность мишени для sgLepr-2, включающая протоспейсер и сайт PAM. (б) Результаты *in vitro* теста на расщепление ДНК-субстрата. Продукт ПЦР длиной 642 п.о. инкубировали с SpCas9 РНП, содержащим sgLepr-2 или контрольную гидовую РНК, не имеющую мишеней в геноме кролика (sgScr). Расщепление ДНК-субстрата с образованием фрагментов ожидаемого размера (340 и 302 п.о.) отмечалось только под влиянием sgLepr-2. Дорожка “Mw” – маркер длины фрагментов ДНК – O’GeneRuler 50bp DNA Ladder (“Thermo Scientific”, SM1133). Длина некоторых полос маркера обозначена справа от рисунка. Фото эмбрионов кролика до проведения микроинъекций (в) и через 120 часов после микроинъекций смеси реагентов для геномного редактирования (г). Снимки эмбрионов, находящихся в чашках Петри в культуральной среде, получали с помощью микроскопа Nikon SMZ-800 (Япония).

+72°C – 10 мин, +4°C – постоянно. Продукт ПЦР очищали, используя набор реагентов MinElute® Reaction Cleanup Kit (“Qiagen”, Германия, 28204) и определяли его концентрацию с помощью спектрофотометра Nanophotometer ND-120 (“Implen”, Германия). Концентрация ПЦР матрицы для IVT составляла 29 нг/мкл.

Далее проводили реакцию IVT объемом 20 мкл, используя набор реагентов HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit (“New England Biolabs”, США, 02040S) в соответствии с протоколом для коротких РНК транскриптов длиной менее 300 п.о. и содержащую 15.2 нг/мкл ПЦР-матрицы. Реакцию инкубировали при +37°C

в течение 5 часов, после чего добавляли 1 мкл фермента TURBO DNase, 2 ед./мкл (“Ambion”, Литва, AM2238) для разрушения ДНК-матрицы и инкубировали при +37°C в течение 20 мин. Синтезированную в реакции транскрипции гидовую РНК очищали из реакционной смеси с помощью набора реагентов miRNeasy Mini Kit (“Qiagen”, 217004) и хранили в аликвотах при –80°C.

Оценку активности гидовой РНК sgLepr-2 проводил с помощью *in vitro* теста на расщепление субстрата с рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). Рекombинантный белок SpCas9 получали как описано в [20]. Нуклеазу SpCas9 и гидовую РНК sgLepr-2 разводили до концентрации 3 мкМ в однократном буфере “Orange” (“Thermo Scientific”, BO5), и свободной от нуклеаз воде (“Ambion”, AM9937) соответственно. Объем реакции *in vitro* теста на расщепление составлял 30 мкл и включал 150 нМ белка SpCas9, 150 нМ sgLepr-2 или контрольной гидовой РНК, не имеющей мишеней в геноме кролика (sgScr, протоспейсер: 5-gcactaccagagctaaactca-3), и 3.5 нг/мкл ДНК-субстрата (продукт ПЦР длиной 642 п.о., амплифицированный на матрице геномной ДНК кролика породы советская шиншилла, как описано выше) в 1-х кратном буфере “Orange”. Вначале для сборки РНП смешивали SpCas9 и гидовую РНК и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Далее, добавляли 3 мкл ДНК-субстрата и инкубировали реакцию при +37°C в течение 30 мин. Затем для разрушения гидовой РНК добавляли 1 мкл РНКазы (10 мкг/мкл) и инкубировали реакцию 10 мин при +37°C, после чего для разрушения белка SpCas9 и высвобождения ДНК-субстрата из комплекса с РНП добавляли 1 мкл протеиназы К (20 мкг/мкл) и инкубировали реакцию при +56°C в течение 10 мин. Полученные образцы разделяли в 2%-ом ТАЕ-агарозном геле. Результаты *in vitro* теста на расщепление субстрата с РНП показаны на рис. 1Б. В результате было обнаружено, что гидовая РНК sgLepr-2, но не контрольная выроденная гидовая РНК (sgScr) вызывает расщепление ПЦР-продукта длиной 642 п.о. на два фрагмента ожидаемого размера 302 и 340 п.о. (рис. 1Б), что свидетельствует о пригодности полученной гидовой РНК для внесения дуплексных разрывов ДНК в гене *LEPR* кролика в месте, определяемом последовательностью гидовой РНК sgLepr-2.

Далее, для получения зигот кроликов, самок-доноров породы советская шиншилла осеменяли методом естественной случки, через 16–18 часов животных забивали и отбирали матку, яйцеводы и яичники. Зиготы из яйцеводов извлекали с помощью промычного раствора $t = +25\text{--}29^\circ\text{C}$ (среда Хэнкса “ПанЭко”, Р020п, Россия, с добавлением гентамицина (ОАО “Дальхимфарм”, Россия, 800х раствор) и 2%-ой фетальной бычьей сыворотки

(ФБС) (“Cytiva”, США)), который вводили в отпрепарированный яйцевод со стороны рога матки с помощью шприца. Промычный раствор собирали в чашку Петри, фильтровали через фильтровальную систему для эмбрионов Miniflush® (“Minitube”, Германия) и проводили поиск зигот с помощью микроскопа при 150–200-х-кратном увеличении. Обнаруженные зиготы с помощью пластикового капилляра помещали в среду DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10%-ой ФБС и пенициллина (100 ед./мл), и стрептомицина (100 мкг/мл) под минеральным маслом (“Origio”, Дания). Далее в зиготы инъецировали компоненты системы CRISPR/Cas9 (как описано ниже) для оценки эффективности редактирования локуса *LEPR* с помощью гидовой РНК sgLepr-2 и культивировали в течение 120 ч. На рис. 1В показаны зиготы кролика до проведения микроинъекций, а на рис. 1Г — через 120 ч после микроинъекций. Инъецированные зиготы культивировали в течение 120 ч после чего анализировали на предмет редактирования гена *LEPR*. Для этого эмбрионы лизировали как описано в [21] и амплифицировали фрагмент генома длиной 642 п.о. с праймерами “F” и “R” с помощью набора реагентов GenPak PCR Core (“Лаборатория Изоген”, U 1010-08, Россия) в реакции объемом 20 мкл при следующих условиях: +94°C – 2 мин; 40х циклов: +94°C – 30 с, +62°C – 30 с, +72°C – 45 с; +72°C – 2 мин. Далее, для выявления отредактированных эмбрионов проводили гетеродуплексный анализ. Для этого продукты ПЦР инкубировали при +95°C в течение 5 мин и далее охлаждали до комнатной температуры со скоростью 2°C в секунду с +95°C до +85°C и со скоростью 0.1°C в секунду от +85°C до +25°C. После этого 5 мкл реакционной смеси разделяли в 8%-ом ТВЕ-полиакриламидном геле. Наличие редактирования определяли по появлению дополнительных полос в геле по сравнению с образцами, амплифицированными на матрице геномной ДНК из неинъецированных зигот (wt). На рис. 2А показаны результаты гетеродуплексного анализа шести инъецированных эмбрионов (1–6). Для образца #5 не удалось амплифицировать фрагмент ДНК в достаточном количестве. Во всех остальных образцах были обнаружены дополнительные полосы в геле, отсутствующие в образцах дикого типа и свидетельствующие о формировании гетеродуплексов. Поэтому далее для подтверждения редактирования локуса *LEPR* было проведено секвенирование продуктов ПЦР по Сэнгеру с праймером “F”, а также анализ результатов секвенирования с помощью он-лайн инструмента ICE Analysis (“Synthego”, США, <https://ice.synthego.com/>). В результате было установлено, что в эмбрионах #2 и #3 произошло CRISPR/Cas9 – опосредованное редактирование (рис. 2Б и В). При этом по результатам ICE анализа частота инделов составляла 89%

и 92%, что свидетельствует об эффективном редактировании обеих аллелей целевого локуса уже на стадии 1–2-клеточного эмбриона. Образец #1 был дикого типа, в образцах #4 и #6 был выявлен полиморфизм А/Т (данные не показаны), присутствующий геномной мишени для sgLepr-2 (рис. 1А), что, по всей видимости, и привело к формированию дополнительных полос в геле при гетеродуплексном анализе (рис. 2А). Интересно отметить, что в двух отредактированных образцах был выявлен генотип А/А (рис. 2Б), тогда как в трех нередактированных эмбрионах были выявлены генотипы А/А, А/Т и Т/Т (данные не показаны). Хотя полученный результат не является статистически значимым, тем не менее, он указывает на то, что, как и ожидалось, возможно редактирование только аллеля гена *LEPR*, несущего генотип А, и, кроме того, указывает на важность секвенирования геномных мишеней для гидовых РНК у экспериментальных животных. Резюмируя, нами были получены реагенты для эффективного CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования гена *LEPR* кролика.

Далее для получения кроликов с нокаутом гена *LEPR* проводили микроинъекции компонентов системы редактирования генома в виде смеси мРНК нуклеазы SpCas9 (25 нг/мкл, “TriLink Biotechnologies”, США, L-7206) и гидовой РНК sgLepr-2 (7.5 нг/мкл) в буфере TE (10 мМ Трис HCl pH 7.4, 0.1 мМ ЭДТА) в цитоплазму полученных зигот в среде Ооклин (“ПанЭко”) под контролем микроскопа Zeiss Axiovert 200M при увеличении 400X, с помощью микроманипуляторов Narishige (Япония) и инъектора Eppendorf FemtoJet (“Eppendorf”, Франция). Для изготовления игл для микроинъекций использовали пуллер Sutter instrument Co P-97 (США), для изготовления удерживающей пипетки использовали пуллер Narishige PC-10 (Япония) и микрокузницу Narishige MF-900 (Япония). Выжившие после микроинъекций зиготы помещали в среду DMEM/F12 с 10%-ой ФБС (см. выше) и культивировали при +38.5°C, 100% влажности и 7% CO₂ в течение 24-х часов до пересадки реципиентам.

Далее, для пересадки эмбрионов в качестве самок-реципиентов отбирали здоровых половозрелых

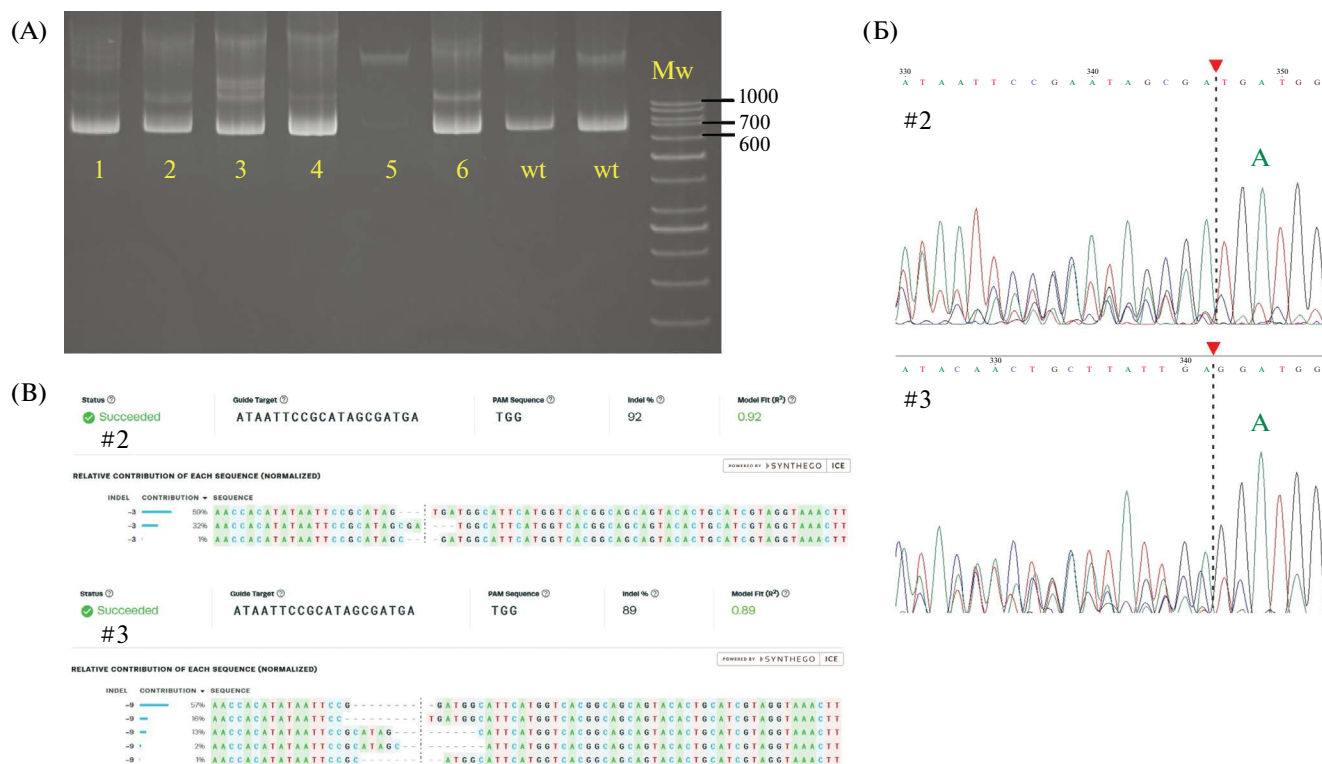


Рис. 2. Эффективное редактирование гена *LEPR* в эмбрионах кролика. (а) Результаты гетеродуплексного анализа продуктов амплификации на матрице геномной ДНК из шести эмбрионов кролика (1–6), инъецированных смесью мРНК SpCas9 и sgLepr-2. 5 мкл реакции ПЦР разделяли в 8%-ом полиакриламидном геле. Дорожка “Mw” — маркер длины фрагментов ДНК — O’GeneRuler 50bp DNA Ladder. Длина некоторых полос маркера обозначена справа от рисунка. (б) Результаты секвенирования по Сэнгеру образцов #2 и #3. Вертикальная пунктирная черта и красный треугольник указывают место разрезания генома нуклеазой SpCas9. Генотип SNP (А) показан над пиком хроматограммы. (в) Результаты ICE анализа хроматограмм секвенирования по Сэнгеру образцов #2 и #3. Нуклеотидные последовательности показывают выявленные инделы. Частоты инделов составляли 92% и 89% для образцов #2 и #3, соответственно.

самок породы белый великан, у которых индуцировали овуляцию за 15–24 часа до пересадки с помощью гонадотропин-рилизинг-фактора (препарат Сурфагон, АО “Мосагроген”, Россия) в дозе 1 мкг на животное. Доступ к яйцеводам обеспечивали лапаротомией и вводили инъецированные эмбрионы в воронку яйцевода самки-реципиента. Для анестезии и наркоза использовали препараты новокаин 0.5 % (“Solopharm”, Россия) и Пропофол Каби (“Fresenius Kabi”, Германия) согласно инструкции производителя. В качестве сред для трансплантации использовали среды Spermwash (“Gynotec”, Канада) или Ооклин (“ПанЭко”).

Для получения новорожденных кроликов через 30 суток после трансплантации эмбрионов проводили кесарево сечение. Для анестезии и наркоза использовали препараты как описано выше. Доступ к матке обеспечивали лапаротомией, после чего вскрывали рог матки, содержащий эмбрионы, и извлекали плоды. Далее проводили экстирпацию матки, убеждались, что нет кровотечения, и послойно зашивали рану. Полученных крольчат помещали к заранее подготовленной кормилице.

В общей сложности, в ходе двух экспериментов было получено и микроинъецировано 36 эмбрионов на стадии двух пронуклеусов, из которых 32 дробились через 24 ч после микроинъекций. Реципиенту #1 было пересажено 22 эмбриона (по 11 в каждый яйцевод), а реципиенту #2 было пересажено 10 эмбрионов (по 5 в каждый яйцевод). В результате реципиент #1 погибла от инфекционных осложнений после трансплантации, а у реципиента #2 развилась беременность и с помощью кесарева сечения был получен один живой крольчонок (самка).

Для генотипирования новорожденного кролика геномную ДНК из ткани уха выделяли как описано в [22] и амплифицировали фрагмент длиной 642 п.о., содержащий мишень для гидовой РНК sg-Lepr-2, как описано выше, используя в качестве отрицательного контроля геномную ДНК кролика дикого типа. Анализ продуктов ПЦР с помощью электрофореза в 8%-ом акриламидном геле показал, что на матрице геномной ДНК новорожденного кролика (рис. 3А, дорожка “КО”) помимо фрагмента длиной 642 п.о., соответствующего геному дикого типа, амплифицируется фрагмент длиной около 350 п.о., присутствующий только в образце “КО”. Далее продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора реагентов QIAEX II (“Qiagen”, #20021) и секвенировали по Сэнгеру используя праймер “F”. В результате, было обнаружено, что нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК длиной 642 п.о. соответствует геному кролика дикого типа (данные не показаны), а короткий продукт ПЦР в образце “КО” длиной 356 п.о. образовался в результате делеции длиной 295 п.о. и инсерции случайных 9 п.о. ТТТАААГТА (рис. 3В). Интересно отметить, что в ПЦР продукте

дикого типа SNP в мишени для sgLepr-2 был представлен генотипом Т, что и объясняет отсутствие редактирования в данном аллеле.

Таким образом, с помощью системы CRISPR/Cas9 был получен генно-модифицированный кролик, несущий делецию в геноме в области 10 экзона гена *LEPR*. Схема геномного локуса *LEPR* дикого типа (“wt”) и локуса с делецией в области 10-го и 11-го экзонов (“КО”) показана на рис. 3Б. Анализ нуклеотидной последовательности короткого ПЦР продукта показал, что в результате делеции утрачиваются 58 п.о. экзона 10, полный интрон 10 длиной 144 п.о. и часть экзона 11 длиной 93 п.о., тем самым приводя к формированию в геноме гибридного экзона между 5'-областью 10-го экзона и 3'- областью 11-го экзонов (рис. 3Б). Сплайсинг такого гибридного экзона с высокой вероятностью будет идти с использованием акцепторного сайта 10-го экзона и донорного сайта 11-го экзонов гена *LEPR*. Анализ нуклеотидной последовательности транскрипта гена *LEPR* (XM_051856399) показал, что в результате делеции возникает преждевременный стоп-кодон (Рис. 3В), и с такого транскрипта, начиная с кодона инициации трансляции АТГ во втором экзоне гена *LEPR*, будут транслироваться 450 N-концевых аминокислотных остатков белка *LEPR*, за которыми в одной рамке считывания будет транслироваться бессмысленный пептид FKVVPCS, после чего трансляция белка будет обрываться за счет кодона терминации трансляции TGA (рис. 3В). Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа указывают на то, что внесенная с помощью CRISPR/Cas9 делеция действительно приведет к синтезу укороченного нефункционального белка и, как следствие, к нокауту гена *LEPR*.

Как правило, животные поколения F0 являются мозаичными и несут в геноме несколько модифицированных аллелей. Как видно из рис. 3А, на матрице геномной ДНК из тканей кролика с нокаутом амплифицируется только два продукта ПЦР, и секвенирование по Сэнгеру длинного продукта не выявило присутствия дополнительных модифицированных аллелей. Таким образом, полученный с помощью геномного редактирования кролик с высокой вероятностью является гетерозиготным по нокаутному аллелю.

Основным проявлением фенотипа нокаута *LEPR* является морбидное ожирение. Интересно отметить, что уже при рождении вес крольчонка (104 г) был примерно в два раза выше нормального веса новорожденного крольчонка породы советская шиншилла (около 60 г). Далее проводился мониторинг веса крольчонка с нокаутом *LEPR* в сравнении со средним весом крольчат дикого типа такой же породы, который известен из справочных данных [23], так как было невозможно сравнить вес с крольчатами дикого типа из того же помета. Как видно из рис. 4Б, вес нокаутного

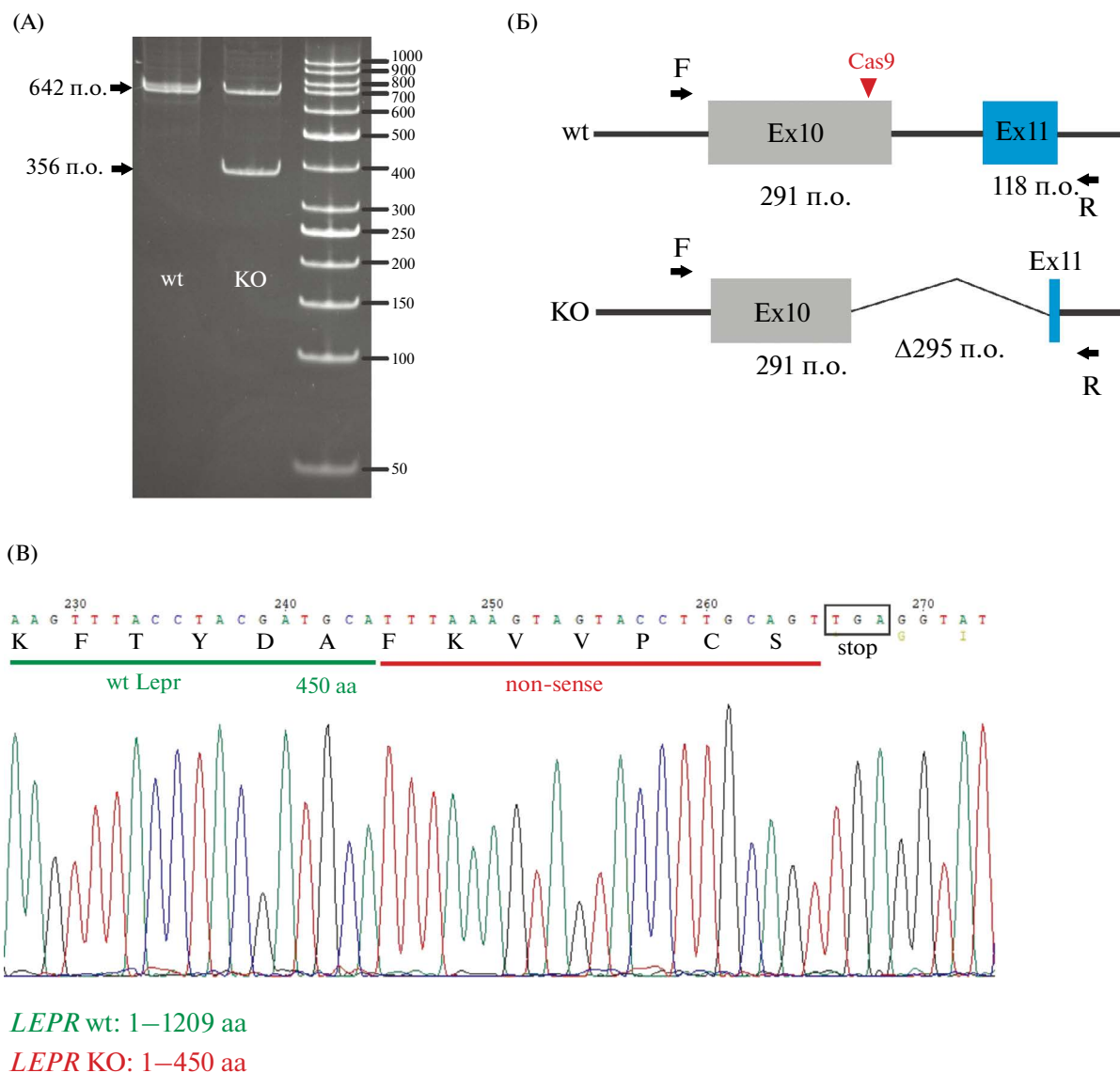


Рис. 3. Молекулярно-генетический анализ кролика с нокаутом *LEPR*. (а) Анализ продуктов ПЦР, амплифицированных на матрице геномной ДНК кролика дикого типа (дорожка wt) и с нокаутом гена *LEPR* (дорожка «КО»), с помощью электрофореза в 8%-ом акриламиде геле. Полоса длиной 642 п.о. амплифицируется на матрице геномной ДНК дикого типа; полоса длиной 356 п.о. присутствует только в образце «КО». Длины полос маркера молекулярного веса ДНК O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder ("ThermoFisher Scientific", США) указаны справа. Положение соответствующих продуктов ПЦР указано стрелками. (б) Схема геномного локуса *LEPR* дикого типа (wt) в области 10 и 11 экзонов, имеющих длину 291 и 118 п.о. соответственно. Положение олигонуклеотидных праймеров "F" и "R" показано в виде стрелок. На панели "КО" показана схема геномного локуса *LEPR* генно-модифицированного кролика. Место внесения двуцепочечного разрыва в геноме кролика с помощью нуклеазы SpCas9 и гидовой РНК sgLepr-2 показано красным треугольником. (в) Результат секвенирования по Сэнгеру продукта ПЦР длиной 356 п.о. Под нуклеотидной последовательностью указана транслация открытой рамки считывания транскрипта XM_051856399, транскрибирующегося с нокаутного аллеля. С 1 по 450 аминокислоту транслируется последовательность белка *LEPR* дикого типа (подчеркнуто зеленым), далее за счет инсерции случайных 9 п.о. ТТТАААГТА транслируется бессмысленный пептид FKVVP (non-sense, подчеркнут красным), после чего следует кодон терминации транслации TGA (показан рамкой).

крольчонка был существенно выше по сравнению с весом крольчат дикого типа такой же породы и возраста, что указывает на развитие морбидного ожирения у крольчонка с нокаутом *LEPR*.

По достижении половозрелости (в возрасте 6 месяцев) для получения животных поколения F1 самку с нокаутом *LEPR* спарили с самцом той же породы. Однако, крольчиха погибла во время

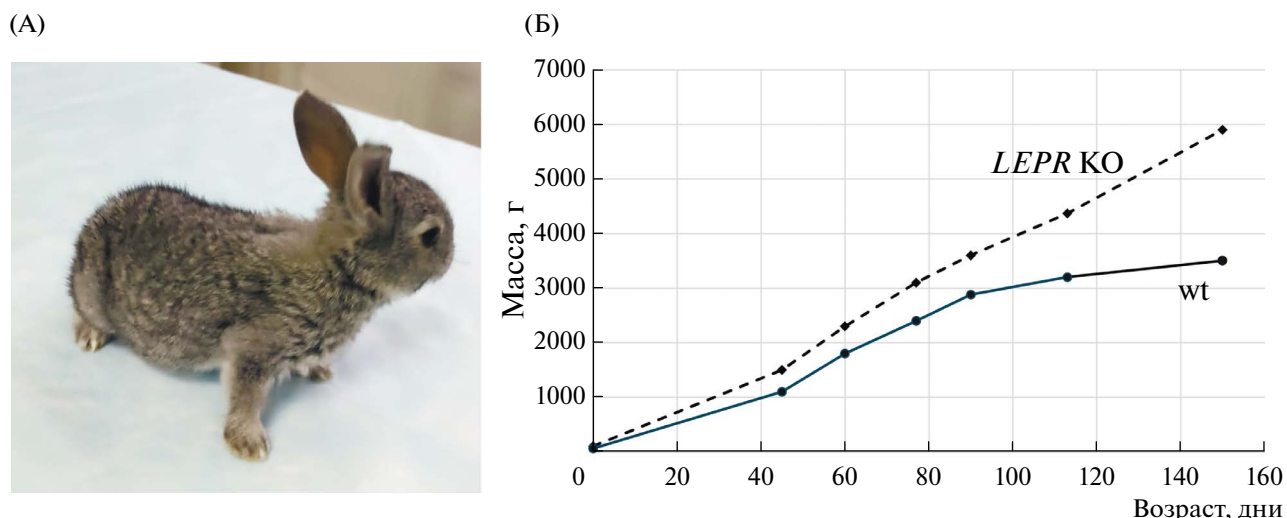


Рис. 4. Динамика набора массы тела кроликом с нокаутом гена *LEPR*. (а) Фото генно-модифицированного кролика в возрасте около двух недель. (б) График набора массы тела кроликом с нокаутом гена *LEPR* (“*LEPR KO*”) по сравнению со средней массой тела кроликов породы советская шиншилла дикого типа (“*wt*”).

беременности от пневмонии. При вскрытии в матке было обнаружено 9 имплантировавшихся плодов. В результате генотипирования было установлено, что 5 из 9 плодов несут нокаутный аллель (данные не показаны). Таким образом, показана возможность вертикальной передачи внесенной генетической модификации от матери к потомству. Известно, что нокаут *LEPR* может влиять на родовую активность животных и приводить к мертворождению [7], однако из-за гибели самки проверить это экспериментально оказалось невозможно. Тем не менее, можно сделать вывод о том, что инактивация одного аллеля гена *LEPR* не влияет на имплантацию эмбрионов.

Таким образом, с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного геномного редактирования за счет внесения делеции в области 10 экзона нами впервые был получен кролик с нокаутом гена *LEPR*. Стоит отметить, что наличие стоп-кодона ближе к 5'-области транскрипта с большой вероятностью будет приводить к деградации такого транскрипта по механизму нонсенс-опосредованного распада мРНК. Даже если такой аберрантный транскрипт будет экспрессироваться на достаточно высоком уровне, то укороченный до 450 а.о. белок будет лишен трансмембранного домена и не будет заякорен в плазматической мембране, а также не сможет действовать как растворимая форма *LEPR*, так как будет лишен функциональных CRH2 доменов (428-641 а.о.), связывающих лептин [3]. Таким образом, с точки зрения локализации внесенного генетического дефекта данная модель существенно отличается от всех ранее описанных моделей нокаута гена у млекопитающих. Показано, что вес нокаутного крольчонка был существенно

выше среднего веса крольчат дикого типа той же породы, что указывает на развитие морбидного ожирения у животного с нокаутом *LEPR*. Разработанная нами технология получения генно-модифицированных кроликов с нокаутом *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9 позволит создать модель морбидного ожирения и метаболических нарушений, обусловленных мутациями в гене рецептора лептина.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2019-1661 от 31.10.2019, государственного задания ФГБНУ НИИПЗК № 075-00503-24-01 от 05.04.2024.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН, на проведение экспериментов было получено разрешение Комиссии по биоэтике ИБГ РАН №10 от 15.02.2023.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Коллективом авторов подана патентная заявка № 2023134478 от 21.12.2023 “Способ получения генно-модифицированных кроликов с нокаутом гена *LEPR* с помощью системы CRISPR/Cas9”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алипкина С.И. *et al.* Лептин и его рецептор в норме и при патологии // Успехи Современной Биологии. 2019. Vol. 139. P. 352–364.
2. Friedman J.M. Leptin and the endocrine control of energy balance // Nat Metab. 2019. Vol. 1, № 8. P. 754–764.
3. Schaab M., Kratzsch J. The soluble leptin receptor // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2015. Vol. 29, № 5. P. 661–670.
4. Berger C., Klöting N. Leptin Receptor Compound Heterozygosity in Humans and Animal Models // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 9. P. 4475.
5. Israel D., Chua S. Leptin receptor modulation of adiposity and fertility // Trends Endocrinol Metab. 2010. Vol. 21, № 1. P. 10–16.
6. Iikuni N. *et al.* Leptin and Inflammation // Curr Immunol Rev. 2008. Vol. 4, № 2. P. 70–79.
7. Pennington K.A. *et al.* Conditional knockout of leptin receptor in the female reproductive tract reduces fertility due to parturition defects in mice // Biol Reprod. 2022. Vol. 107, № 2. P. 546–556.
8. Coleman D.L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice // Diabetologia. 1978. Vol. 14, № 3. P. 141–148.
9. Zhang Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue // Nature. 1994. Vol. 372, № 6505. P. 425–432.
10. Chen H. *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice // Cell. 1996. Vol. 84, № 3. P. 491–495.
11. McMinn J.E. *et al.* An allelic series for the leptin receptor gene generated by CRE and FLP recombinase // Mamm Genome. 2004. Vol. 15, № 9. P. 677–685.
12. Cohen P. *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity // J Clin Invest. 2001. Vol. 108, № 8. P. 1113–1121.
13. McMinn J.E. *et al.* Neuronal deletion of *Lepr* elicits diabetes in mice without affecting cold tolerance or fertility // Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005. Vol. 289, № 3. P. E403–411.
14. Gogiraju R. *et al.* Deletion of endothelial leptin receptors in mice promotes diet-induced obesity // Sci Rep. 2023. Vol. 13, № 1. P. 8276.
15. Morioka T. *et al.* Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice // J Clin Invest. 2007. Vol. 117, № 10. P. 2860–2868.
16. Guo K. *et al.* Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities // Endocrinology. 2007. Vol. 148, № 8. P. 3987–3997.
17. Wu-Peng X.S. *et al.* Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (*Lepr*): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat // Diabetes. 1997. Vol. 46, № 3. P. 513–518.
18. Bao D. *et al.* Preliminary Characterization of a Leptin Receptor Knockout Rat Created by CRISPR/Cas9 System // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 15942.
19. Matsuhisa F. *et al.* Transgenic Rabbit Models: Now and the Future // Applied Sciences. 2020. Vol. 10, № 21.
20. Maslennikova A. *et al.* Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41 // mBio. 2022. Vol. 13, № 1. P. e0358921.
21. Sakurai T. *et al.* A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice // BMC Biotechnol. 2014. Vol. 14. P. 69.
22. Green M.R., Sambrook J. Preparation of Genomic DNA from Mouse Tails and Other Small Samples // Cold Spring Harb Protoc. 2017. Vol. 2017, № 9. P. pdb.prot093518.
23. Абрашова Т.В. *et al.* // СПРАВОЧНИК. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб: ЛЕМА, 2013. P. с.15.

GENERATION OF *LEPR* KNOCKOUT RABBITS WITH CRISPR/CAS9 SYSTEM

Y. Y. Silaeva¹, P. D. Safonova², D. V. Popov³, M. A. Filatov¹, Y. D. Okulova¹,
R. A. Shafei⁴, O. I. Skobel³, D. E. Vysotskii³, Y. D. Gubarev⁵, V. I. Glazko³,
T. T. Glazko³, Academician of the RAS P. G. Georgiev², G. Y. Kosovsky³, M. V. Shepelev^{1, #}

¹*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Institute of Gene Biology Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation*

²*Institute of Gene Biology Russian academy of sciences, Moscow, Russian Federation*

³*Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, Rodniki, Moscow region, Russia*

⁴*Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

⁵*Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation*

[#]*e-mail: mshepelev@mail.ru*

In humans mutations in the *LEPR* gene, encoding leptin hormone receptor, are associated with the development of morbid obesity, lipid metabolism dysregulation, defects of fertility. In rodents spontaneous mutations in *LEPR* gene have been described. *LEPR* knock-out (KO) animals have been generated using classical KO technology or CRISPR/Cas9 system. In rodents lipid metabolism is significantly different from that in humans or rabbits, therefore rabbits are considered as the most relevant model of morbid obesity and lipid metabolism dysregulation in humans, but so far *LEPR* knock-out rabbits have not been reported. Here using CRISPR/Cas9 system we generated *LEPR* knock-out rabbit by introducing a deletion of the region around exon 10 of the *LEPR* gene. We showed that the body weight of the knock-out rabbit was significantly higher than an average body weight of the wild type rabbits. CRISPR/Cas9-mediated technology for the generation of the *LEPR* knock-out rabbits will allow for the development of the model of morbid obesity and endocrine defects in humans due to leptin receptor mutations.

Keywords: CRISPR/Cas9, *LEPR*, leptin, genetically modified rabbit