

CONSISTENT PRODUCTION OF MICE WITH CONDITIONAL KNOCKOUT ALLELES BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENOME EDITING USING TWO GUIDES/ TWO OLIGOS APPROACH

ANDREI GOLOVKO *, JOHN ADAMS,
HUIPING GUO, JOHNATHAN BALLARD,
AMY GONZALES, BEN MORPURGO

Texas A&M Institute for Genomic Medicine, College Station, TX 77843

* Email: agolovko@tigm.org

Gene targeting is extensively used to generate designer mouse mutants and to study gene function in vivo. Knockout mice that harbor a null allele in their germline provide appropriate genetic models of inherited diseases and often exhibit embryonic or early postnatal lethality. To study gene function in adult mice and in selected cell types, a refined strategy for conditional gene inactivation has been developed that relies on the DNA recombinase Cre and its recognition (loxP) sites. This process has traditionally relied on the complex process involving genome editing in embryonic stem (ES) cells despite its limitations, including incorrect targeting or cassette structure, and difficulties with germline transmission of the allele from chimeric mice. CRISPR-Cas9 gene editing technology has considerably facilitated the generation of mouse knockout alleles, relieving many of the cumbersome and time-consuming steps of traditional mouse ES cell technology. However, the generation of conditional knockout alleles remains an important challenge. An earlier study reported up to 16 % efficiency in generating conditional knockout alleles in mice using 2 single guide RNAs (sgRNA) and 2 single-stranded oligonucleotides (ssODN), which has been questioned by another report combining data from multiple transgenic cores. With the advent of CRISPR/Cas9 as a mouse genome modification tool, we assessed the efficiency of using this method in creating conditional targeted alleles in three genes, phosphatase and actin regulator 1 (Phactr1), apolipoprotein A-I (ApoA1), and actin-related protein T2 (Actr12). Even though overall success rate was low – about 2.5 % – we show that it's possible to reliably

generate conditional knockout alleles using CRISPR/Cas9 on a consistent basis.

Key words: knockout mouse, CRISPR/Cas9, Cre/loxP.

СИСТЕМАТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ УСЛОВНЫХ НОКАУТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9 ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 2-Х ЦЕЛЬНЫХ РНК-ГИДОВ (SGRNA) И 2-Х ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (SSODN)

Целенаправленное изменение геномной ДНК широко используется для создания мышей-мутантов и для изучения функций генов *in vivo*. Мыши-нокауты, способные передавать инактивированный аллель своему потомству, являются ценными генетическими моделями наследственных заболеваний и часто демонстрируют эмбриональную или раннюю постнатальную летальность. Для изучения функции генов у взрослых мышей и у отдельных типов клеток была разработана усовершенствованная стратегия условной инактивации генов, основанная на ДНК-рекомбиназе Cre и ее сайтах узнавания (loxP). Этот подход традиционно основывался на многоступенчатом и трудоемком процессе, включающем редактирование генома в эмбриональных стволовых (ES) клетках и использовании их для получения химер. Кроме того, этот процесс имеет некоторые ограничения, такие как необходимые особенности структуры встраиваемой кассеты вектора ДНК, часто неправильное редактирование и трудности наследования линии модифицированного аллеля от химерных мышей. Технология редактирования генов CRISPR-Cas9 значительно упростила получение нокаутных аллелей мышей, избавив от многих громоздких и трудоемких этапов традиционного подхода с использованием мышиных ES клеток. Тем не менее, генерация условных нокаутных аллелей (conditional knockouts) остается важной задачей. В более раннем исследовании сообщалось о почти 16 % эффективности генерации аллелей условного нокаута у мышей с использованием так называемого метода 2-g 2-o (2-х цельных РНК-гидов (sgRNA) и 2-х одноцепочечных олигонуклеотидов (ssODN)), что было поставлено под сомнение другой группой авторов, проанализировавшей результаты полученные несколькими трансгенными лабораториями. Используя CRISPR/Cas9 в качестве ин-

струмента модификации генома мыши, мы оценили эффективность использования этого метода в создании условных нокаутных аллелей в трех генах: фосфатаза и регулятор актина 1 (Phactr1), аполиппротеин A1 (ApoA1) и связанный с актином протеин T2 (Actrt2). Несмотря на то, что общая эффективность метода оказалась низкой – около 2,5 % – мы показали, что можно с высокой долей вероятности генерировать аллели условных нокаутов мышей с использованием CRISPR/Cas9 на постоянной основе.

Ключевые слова: изменение геномной ДНК, условные нокауты мышей, CRISPR/Cas9, цельные РНК-гиды.

REFERENCES

1. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, *Science*, 1994, vol. 265, pp. 103–6.
2. Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. Conditional gene targeting, *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, pp. 600–3.
3. Sauer, B., and Henderson, N., Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, pp. 5166–70.
4. Hoess, R. H. and Abremski, K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, pp. 1026–1029.
5. Branda, C. S. and Dymecki, S. M. Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell*, 2004, vol. 6, pp. 7–28.
6. Jinek, M., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, vol. 337, pp. 816–21.
7. Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.S., Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 2013, vol. 31, pp. 230–2.
8. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 819–23.
9. Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2, 2013, vol. e00471, doi:10.7554/eLife.00471.
10. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 823–6.
11. Mashiko, D. et al. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.*, 3, 2013, vol. 3355, 10.1038/srep03355.
12. Shen, B. et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res.*, 2013, vol. 23, pp. 720–3.
13. Wang, H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, vol. 153, pp. 910–8.
14. Yang, H., et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, vol. 154(6), pp. 1370–9.
15. Gurumurthy, C., et al. Re-Evaluating One-step Generation of Mice Carrying Conditional Alleles by CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing *Technology. bioRxiv*, 2018, vol. 393231; doi: <https://doi.org/10.1101/393231>
16. Behringer R., et al., *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014, Cold Spring Harbor, NY.
17. Horii, T., et al., Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7(1), p. 7891.
18. Bishop, K.A., et al., CRISPR/Cas9-Mediated Insertion of loxP Sites in the Mouse Dock7 Gene Provides an Effective Alternative to Use of Targeted Embryonic Stem Cells. *G3 (Bethesda)*, 2016, vol. 6(7), pp. 2051–61.
19. Kueh, A.J., et al., An update on using CRISPR/Cas9 in the one-cell stage mouse embryo for generating complex mutant alleles. *Cell Death Differ.*, 2017, vol. 24(10), pp. 1821–2.
20. Lanza, D.G., et al., Comparative analysis of single-stranded DNA donors to generate conditional null mouse alleles. *BMC Biol.*, 2018, vol. 16(1), p. 69.
21. Pritchard, C.E.J., Kroese, L.J., and Huijbers, I.J., Direct Generation of Conditional Alleles Using CRISPR/Cas9 in Mouse Zygotes. *Methods Mol. Biol.*, 2017, vol. 1642, pp. 21–35.
22. Miyasaka, Y., et al., CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics*, 2018, vol. 19(1), p. 318.

Received June 30, 2019
Received July 30, 2019
Accepted January 18, 2020