

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 577.21:575.113

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SAM-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ОВЕРЭКСПРЕССИЕЙ БЕЛКА CD5 ЧЕЛОВЕКА

Истомина П. В.¹, Кулемзин С. В.², Ямапай М.¹, Горчаков А. А.²

¹Технологический университет Суранари, Накхонратчасима, Таиланд

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Горчаков Андрей Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Статья поступила в редакцию 11.06.2022
и принята к печати 03.07.2022.

РЕЗЮМЕ

Проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo* зачастую требует создания удобного клеточного инструментария, позволяющего надежно контролировать специфичность тестируемых соединений или подходов в отношении белка-мишени. Идеальным решением таких задач является использование клеточных линий, отличающихся по наличию или отсутствию единственного интересующего целевого белка. Клонирование и эффективная доставка кассет, кодирующих такие белки, особенно крупные, как правило, сопряжены с рядом трудностей, равно как и нокаутирование кодирующих их генов. В работе представлен универсальный подход для преодоления данной проблемы с использованием SAM (Synergistic Activation Mediator)-технологии, основанной на элементах системы CRISPR/Cas9, в результате применения которого было получено четыре модельных изогенных клеточных линии человека (U343, HeLa, HT-1080 и HEp-2) с оверэкспрессией белка CD5.

Ключевые слова: изогенные клеточные линии, редактирование генома, экспрессия гена, CD5, CRISPR/Cas9, SAM.

Для цитирования: Истомина П.В., Кулемзин С.В., Ямапай М., Горчаков А.А. Редактирование генома с использованием SAM-системы для получения изогенных клеточных линий с оверэкспрессией белка CD5 человека. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(4):56-62. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-4-56-62

SAM-BASED GENOME EDITING TO OBTAIN ISOGENIC CELL LINES OVEREXPRESSING HUMAN CD5 PROTEIN

Istomina P. V.¹, Kulemzin S. V.², Yamabhai M.¹, Gorchakov A. A.²

¹ Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

² Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Gorchakov Andrey A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Received 11 June 2022; accepted 03 July 2022.

ABSTRACT

In vitro and *in vivo* experiments often require construction of convenient cell instruments to reliably assess the specificity of the molecules or therapeutic approaches being tested against the protein target of interest. Using model isogenic cell lines that differ only in the expression of the target protein represents an ideal solution to this problem. Cloning and efficient delivery of genetic cassettes encoding such proteins, particularly the large ones, is typically challenging, much as the knock-out of the respective genes. To tackle this issue, we adapted a CRISPR/Cas9-based SAM (Synergistic Activation Mediator) platform, and successfully established four model isogenic cell line pairs (U343, HeLa, HT-1080 и HEP-2) overexpressing human CD5.

Key words: CD5, CRISPR/Cas9, Gene expression, Genome editing, Isogenic cell lines, SAM.

For citation: Istomina PV, Kulemzin SV, Yamabhai M, Gorchakov AA. SAM-based Genome Editing to Obtain Isogenic Cell Lines Overexpressing Human CD5 Protein. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(4):56-62. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-4-56-62

Список сокращений: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, кДНК — комплементарная ДНК, 7-AAD — 7-амино-актиномицин, BiTE — Bispecific T cell engager, CAR — Chimeric Antigen Receptor, CD — кластер дифференцировки, CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, FACS — Fluorescence Activated Cell Sorting, RNA — ribonucleic acid — рибонуклеиновая кислота, SAM — Synergistic Activation Mediator, sgRNA — single guide RNA.

ВВЕДЕНИЕ

Использование таргетных биологических или клеточных препаратов, таких как антитела, BiTE, CAR T-клетки, низкомолекулярные ингибиторы и т. д., селективно узнающих одну или несколько белковых мишеней, неразрывно связано с необходимостью валидации их специфичности, а именно: узнавания ими целевого белка и полного отсутствия узнавания нецелевых белков или эпитопов.

Традиционно и за неимением лучших вариантов для решения этой проблемы использовались клеточные линии, экспрессирующие и не экспрессирующие интересные белки-мишени. Очевидно, что опухолевые клеточные линии различного происхождения отличаются друг от друга не только морфологически и биохимически, но и генетически, то есть наличие у таких линий целевого белка может являться не единственным фактором, определяющим их чувствительность или устойчивость к тестируемым агентам. В этой связи гораздо более корректным способом доказательства специфичности является использование так называемых изогенных клеточных линий, отличающихся друг от друга экспрессией лишь одного, целевого, белка. Создание пар таких изогенных клеточных линий формально возможно несколькими способами, а именно: при помощи доставки кассет, кодирующих интересующий белок, в клеточную линию без его экспрессии и, наоборот, за счет нокаутирования или снижения экспрессии целевого гена, кодирующего такой белок, в имеющейся клеточной линии.

Существует множество способов, позволяющих клонировать и доставить интересные последовательности в клетки эукариот, однако, за редким исключением, их эффективность резко снижается, а ресурсоемкость, наоборот, растет с увеличением размера генетической кассеты [1, 2]. Несмотря на развитие невирусных способов доставки, основанных на различных транспозазах и рекомбиназах, лишенных многих недостатков вирусных платформ, «узким местом» продолжает оставаться клонирование крупных последовательностей

ДНК и связанная с этим необходимость проверки точности клонирования путем полного секвенирования целевой кассеты. Кроме того, несмотря на существование обширных библиотек и коммерческих источников полноразмерных кДНК для большинства модельных организмов, клонирование и оверэкспрессия некоторых «редких» белков и их изоформ с крайне узким паттерном и низким уровнем экспрессии продолжает оставаться ресурсозатратной проблемой.

Ситуация коренным образом изменилась с приходом поистине революционной технологической платформы CRISPR/Cas9: стало возможно достаточно бюджетно и просто нокаутировать интересные последовательности генома [3, 4]. Более того, опираясь на модульный принцип организации CRISPR/Cas9, был разработан способ направленной активации транскрипции целевых последовательностей генома, названный SAM (Synergistic Activation Mediator, или медиатор синергичной активации), заключающийся в использовании каталитически неактивной формы Cas9, сшитой с транскрипционным активатором VP64, химерного белка MS2-p65-HSF1, обладающего способностью дополнительно усиливать транскрипцию и связываться со stem-loop районом РНК фага MS2, и, наконец, единой направляющей РНК, образованной аптамерами РНК MS2 и 20–21 оснований, комплементарных протоспейсерной последовательности в выбранном припромоторном районе генома [5]. Формирующийся таким образом рибонуклеопротеиновый SAM-комплекс позволяет специфически активировать экспрессию интересующих последовательностей генома. Широкое использование CRISPR/Cas9- и SAM-платформ позволило значительно упростить и удешевить проведение полногеномных скринингов *in vitro* и *in vivo* за счет создания библиотек направляющих РНК с предсказанными уникальными местами гибридизации в геноме с достаточным уровнем доступности хроматина [6].

Ввиду того что в наших лабораториях проводятся работы по созданию и валидации антител, BiTE и CAR T/NK-клеточных продуктов, нацеленных против маркеров перерожденных В- и Т-клеток человека, для оценки специфичности имеющихся в нашем распоряжении агентов было необходимо получить панель изогенных клеточных линий, контрастно отличающихся в плане экспрессии (да/нет) интересующих нас белков. Белок CD5 человека экспрессируется на поверхности нормальных и перерожденных Т-клеток и является привлекательной мишенью для терапии ряда неоплазий Т-клеточного генеза [7]. В этой связи нами была поставлена

задача использовать SAM-платформу для направленной оверэкспрессии CD5 в четырех CD5-негативных клеточных линиях человека (U343, HeLa, HT-1080 и HEp-2) и получения таким образом четырех пар изогенных клеточных линий, отличающихся друг от друга только наличием экспрессии CD5. Подобные линии в дальнейшем будут использоваться для *in vitro* исследований CD5-специфичных CAR T/NK-клеток и антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

В данном исследовании было использовано несколько клеточных линий человека, HEK293T, U343, HeLa, HT-1080, HEp-2. Все клеточные линии культивировали в питательной среде Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), содержащей 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), при 37 °C, 5 % CO₂ и пассировали каждые 3–4 дня.

Клонирование

Для создания лентивирусной конструкции, кодирующей единую направляющую РНК к гену *CD5*, был взят вектор *lenti sgRNA(MS2)_zeo backbone* (#61427, Addgene [6]). Данный лентивирусный вектор содержит кассету с MS2 stem-loop последовательностями под контролем U6-промотора человека. Интересующая спейсерная последовательность (GCCAGGGCTGCCATTCAAACA), соответствующая 5'-регуляторной зоне гена *CD5* человека, была синтезирована ООО «Биоссет» в виде двух комплементарных и частично перекрывающихся олигонуклеотидов (saccCCAGGGCTGCCATTCAAACA и aaacTGTTTGAATGGCAGCCCTGG). Плавная ренатурация подогретой до 95 °C смеси данных олигонуклеотидов приводит к формированию короткого двуцепочечного фрагмента ДНК с одноцепочечными концевыми последовательностями, соответствующими сайтам узнавания рестриктазы *BsmBI*. После лигирования полученного ДНК-фрагмента с очищенной ДНК векторной плазмиды 61427, гидролизованной *BsmBI*, была проведена трансформация компетентных клеток *E. coli* штамма Stbl3, селекция бактерий на среде с ампициллином и наработка рекомбинантной плазмидной ДНК 61427-gRNA_CD5 с использованием набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

Получение псевдотипированных лентивирусных частиц и трансдукция

Для сборки вирусных частиц была использована клеточная культура HEK293T. Векторные лен-

тивирусные плазмиды (см. ниже) были смешаны с плазмидами psPAX2 (кодирует GAG, POL и REV) и pMD2.G (кодирует оболочечный белок G вируса везикулярного стоматита) в молярном соотношении 4:3:1. Далее их смешивали с 60 мкл 2M CaCl₂ и добавляли воду до объема 500 мкл. Эту смесь по каплям добавили к 500 мкл раствора 2xHBS (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,14), активно перемешивая ее на вортексе, и затем осторожно распределили по поверхности чашки с клетками HEK293T с конфлюентностью 80 %. Через 6 часов среда была заменена на Opti-MEM с добавлением термоинактивированной 2,5% FBS, в которой клетки инкубировали в течение 2 дней. После этого супернатант был профильтрован через фильтр PES 0,45 мкм для удаления клеточных фрагментов. Лентивирусные частицы были сконцентрированы при помощи центрифугирования в настольной центрифуге при 20000 g в течение 90 минут при +4° C. Для трансдукции клеточных линий был использован метод спинокуляции. Для этого 1 × 10⁴ клеток были собраны в лунки 96-луночного планшета с конечной концентрацией полибрена 8 мкг/мл (Sigma Aldrich), после чего к ним добавляли концентрированные суспензии псевдотипированных лентивирусных частиц в различных объемах: 0, 5 и 10 мкл. Полученную смесь клеток и лентивирусных частиц центрифугировали при 500 g в течение 40 минут при 32 °C, после чего клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂. Через 3 дня питательную среду меняли на среду с антибиотиками для удаления нетрансдуцированных клеток.

Вначале проводили ко-трансдукцию клеток псевдотипированными лентивирусными частицами, кодирующими химерный белок-помощник активации MS2-P65-HSF1 (плазмидный клон #89308, Addgene) и химерный белок dCas9(D10A, N863A)-VP64 (плазмидный клон #61425, Addgene). После трансдукции клетки инкубировали в питательной среде с добавлением антибиотиков бластицидин (10 мкг/мл) и гигромицин (200 мкг/мл), чтобы обеспечить селекцию только тех трансдуцированных клеток, которые несли интеграцию обеих конструкций. Через неделю клетки были трансдуцированы псевдотипированными лентивирусными частицами, кодирующими направляющую РНК для активации экспрессии CD5, и проведена селекция трансдуктантов на среде с добавлением антибиотика зеоцин (300 мкг/мл).

FACS анализ

Для анализа использовали 2 × 10⁵ клеток. Клетки промывали 1xPBS, содержащим 1,5 % FBS, центрифугируя при 400×g в течение 5 минут,

и инкубировали с флуоресцентными конъюгатами PE-anti-CD5 (0,2 мкг на реакцию) (#12-0059-42, eBioscience), в течение 1 часа на льду в темноте. Для исключения мертвых клеток использовали 7-амино-актиномицин D (7-AAD). В качестве отрицательного контроля использовали изогенные, немодифицированные клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения целевой конструкции была выбрана последовательность, соответствующая протоспейсеру в 5'-регуляторной области гена *CD5* человека, и клонирована в лентивирусный вектор *lenti_sgRNA(MS2)_zeo_backbone*. Корректность сборки полученной конструкции 61427-gRNA_CD5 была проверена с помощью секвенирования по Сэнгеру.

В качестве клеточных моделей для тестирования SAM-подхода были выбраны 4 клеточные линии человека HT-1080 (фибросаркома), U343 (глиобластома), HeLa и HEP-2 (карцинома шейки матки), поскольку данные клеточные линии легки в культивировании, позволяют проводить относительно эффективную лентивирусную трансдукцию и негативны по большинству поверхностных маркеров В- и Т-клеток, в частности по CD5.

Создание клеточных линий проводили в два этапа. На первом этапе указанные клеточные линии были ко-трансдуцированы псевдотипированными лентивирусными частицами, кодирующими базовые элементы SAM-системы — химерные белки dCas9-VP64 и MS2-P65-HSF1. После отбора и экспансии стабильно трансдуцированных клеток поликлональная популяция была трансдуцирована псевдотипированными лентивирусными

частицами, полученными на основе конструкции 61427-gRNA_CD5. FACS-анализ поликлональных популяций на третий день после трансдукции подтвердил появление белка CD5 на клеточной поверхности (рис. 1) у 20–30 % клеток (HEP-2, HeLa, U343) и 85 % (HT-1080), что соответствует ожидаемому уровню трансдукции при использованном титре лентивирусных частиц.

Моноклонирование CD5-положительных клеточных линий с различным уровнем поверхностной экспрессии CD5 и проверка стабильности экспрессии целевого белка проводятся в настоящее время.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения клеточных линий с оверэкспрессией интересующих белков и их сочетаний чаще всего используют различные варианты трансфекции и трансдукции кассет, несущих соответствующие кДНК. Сложность получения таких линий значительно увеличивается при необходимости доставки протяженных последовательностей ДНК, кодирующих крупные белки. В настоящей работе был апробирован подход, в котором вместо традиционного клонирования и доставки кДНК реализована доставка компонентов SAM-системы, позволяющая активировать экспрессию целевого белка, CD5, в четырех клеточных линиях. Данный подход обладает тем неоспоримым преимуществом, что после того, как в интересующие клеточные линии доставлены базовые компоненты SAM-системы, создание искомым вариантов клеток с оверэкспрессией одного или нескольких белков становится тривиальной задачей. Так, создание конструкции для экспрессии целевого белка сводится к дизайну двух коротких комплемен-

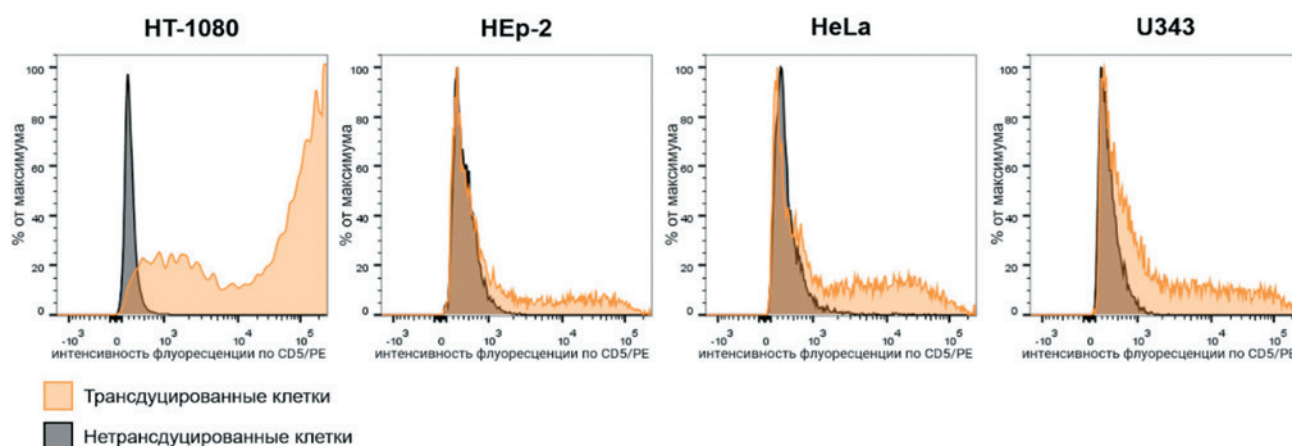


Рис. 1. FACS-анализ связывания антител к CD5 с клеточными линиями после трансдукции (оранжевый) и нетрансдуцированными клеточными линиями (серый)

тарных олигонуклеотидов и несложному клонированию образуемого ими дуплекса в лентивирусный вектор, в то время как клонирование кДНК критически зависит от доступности материала, в котором такой ген активен, размера самой кДНК, отсутствия в ней сайтов рестрикции, имеющихся в полилинкере векторной плазмиды, точности используемых ревертаз и ДНК-полимераз и т. д.

У SAM-системы есть несколько недостатков. Во-первых, в ряде случаев она не может обеспечить экспрессию лишь одной, конкретной изоформы белка. Соответственно, ее использование в отношении генов, в составе которых присутствуют альтернативные экзоны, приводящие к формированию множественных изоформ белка, может быть неоправданным. Во-вторых, данная система базируется на использовании трех трансгенов, соответственно, случайная эпигенетическая инактивация любого из них может привести к потере экспрессии целевого белка. По всей видимости, данное ограничение вполне преодолимо за счет проведения селекции клеток на средах с соответствующими антибиотиками и работы со стабильными моноклонами, а не с поликлональными популяциями. В то же время первый из указанных недостатков может быть и достоинством примененного нами подхода. Известны случаи, когда поверхностный опухоль-ассоциированный белок представлен множественными изоформами [8], и вклад отдельных изоформ в патологический процесс не ясен [9]. Для таких мишеней SAM-система будет приводить к синтезу паттерна изоформ, имитируя естественную экспрессию гена. Строго говоря, полученные нами модельные клеточные линии с сверхэкспрессией белка CD5 отличаются от родительских немодифицированных клеток наличием не только CD5: со встроенных трансгенов конститутивно нарабатываются элементы SAM-платформы — химерные белки-активаторы и белки, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам. По умолчанию считается, что они нейтральны по отношению к исследуемым процессам и белкам, однако в некоторых ситуациях этот момент также может потребовать валидации.

Наконец, крайне перспективным в этой связи выглядит развитие инструментов не геномного, а эпигеномного редактирования генома, таких как CRISPRon [10] и dCas9^{p300} [11, 12], при использовании которых становится возможна временная доставка компонент системы, эпигенетическая модификация локуса с запуском экспрессии интересующего гена и стабильное поддержание активного состояния хроматина в ряду клеточных делений, даже после потери компонент эпигенетического редактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами был успешно опробован SAM-подход, позволяющий быстро, просто и эффективно создавать клеточные линии с сверхэкспрессией искомым белков, составляющие изогенные пары с немодифицированными родительскими клеточными линиями. Полученные клеточные линии, у которых с помощью SAM-платформы была активирована экспрессия белка CD5, после проведения моноклонирования могут быть использованы для оценки специфичности и цитотоксичности CD5-направленных молекулярных и клеточных инструментов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075-15-2022-301 от 20.04.2022). / This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2022-301).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton R. Systematic Determination of the Packaging Limit of Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy*. 2001; 12: 1893–1905.
2. Pezzoli D, Giupponi E, Mantovani D, Candiani G. Size matters for in vitro gene delivery: Investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Scientific Reports*. 2017; 7: 44134.
3. Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Jiang W, Marraffini L, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*. 2013; 339(6121): 819–823.
4. Dominguez A, Lim W, Qi L. Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2015; 17(1): 5–15.
4. Konermann S, Brigham M, Trevino A, Joung J, Abudayyeh O, Bárcena C, Hsu P, Habib N, Gootenberg J, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2014; 517(7536): 583–588.
6. Joung J, Konermann S, Gootenberg J, Abudayyeh O, Platt R, Brigham M, Sanjana N,

Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nature Protocols*. 2017; 12: 828–863.

7. Scherer L, Brenner M, Mamonkin M. Chimeric Antigen Receptors for T-Cell Malignancies. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9: 126.

8. Moiseeva E, Leyland M, Bradding P. CADM1 is expressed as multiple alternatively spliced functional and dysfunctional isoforms in human mast cells. *Molecular Immunology*. 2012; 53: 345–354.

9. Bernard A, Boidot R, Vegran F. Alternative Splicing in Cancer and Immune Cells. *Cancers*. 2022; 14(7): 1726.

10. Nuñez J, Chen J, Pommier G, Cogan J, Replogle J, Adriaens C, Ramadoss G, Shi Q, Hung K, Samelson A, Pogson A, Kim J, Chung A, Leonetti M, Chang H, Kampmann M, Bernstein B, Hovestadt V, Gilbert L, Weissman J. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. *Cell*. 2021; 184(9): 2503–2519.

11. Hilton I, D'Ippolito A, Vockley C, Thakore P, Crawford G, Reddy T, Gersbach C. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*. 2015; 33(5): 510–517.

12. Klann T, Black J, Chellappan M, Safi A, Song L, Hilton I, Crawford G, Reddy T, Gersbach C. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature Biotechnology*. 2017; 35(6): 561–568.

Информация об авторах:

Истомина Полина Вадимовна, аспирант в лаборатории молекулярной биотехнологии (MY Lab) Технологического университета Суранари (Накхонратчасима, Таиланд);

Кулемзин Сергей Викторович, к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ геномного редактирования НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Ямапай Монтароп, профессор, руководитель научно-исследовательской лаборатории молекулярной биотехнологии (MY Lab) Технологического университета Суранари (Накхонратчасима, Таиланд);

Горчаков Андрей Александрович, к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ геномного редактирования НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Istomina Polina V., Ph.D. student of the “Molecular Biotechnology Laboratory” (MY Lab) at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand;

Kulemzin Sergey V., Ph.D, senior researcher of the Research Laboratory of Genomic Editing, the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Yamabhai Montarop, Prof.Dr., PI of the “Molecular Biotechnology Laboratory” (MY Lab) at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand;

Gorchakov Andrey A., Ph.D, senior researcher of the Research Laboratory of Genomic Editing, the World-Class Research Centre for Personalized Medicine.