

УДК 577.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМ ТРАНСАКТИВАЦИИ НА ОСНОВЕ CRISPR/dCas9 ЗАВИСИТ ОТ ВРЕМЕНИ РАБОТЫ СИСТЕМЫ

© 2022 г. А. С. Артюхов^a, Д. А. Доровский^b, А. В. Сорокина^a, К. М. Шакирова^a,
Е. Д. Момотюк^{a, c}, Э. Б. Дашинимаев^{a, b, *}

^aЦентр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

^bМосковский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: dashinimaev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 06.06.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Одно из перспективных приложений, возникших на основе системы CRISPR/Cas9, — активаторные системы, которые позволяют прицельно управлять уровнем экспрессии генов интереса в исследуемых клетках. Однако по имеющимся данным эффективность их работы может значительно изменяться в зависимости от типа клеток и используемой активаторной системы. Мы сравнили эффективность трех активаторных систем: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR — в линии иммортализованных фибробластов кожи человека для активации экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *FOXA2*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. Показано, что эффективность активации этих генов действительно зависит от типа активаторной системы, а сила активации — от времени работы активаторной системы.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, активация, dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR

DOI: 10.31857/S0026898422060052

ВВЕДЕНИЕ

Знаменитая система редактирования генома CRISPR/Cas9 послужила основой для широкого спектра молекулярно-биологических методов и приложений [1]. Помимо классического редактирования генома, возникли методы, использующие способность системы CRISPR/Cas9 целенаправленно взаимодействовать с выбранными участками геномной ДНК. Белок dCas9 (деактивированная форма белка Cas9) может быть соединен с различными функциональными белками, такими как активаторы (или репрессоры) транскрипции. Таким образом, используя гидовые РНК, комплементарные к промоторным областям генов интереса, можно изменять уровень экспрессии этих генов, активировать их, если они подавлены, и наоборот [2]. По-прежнему преимущество данных систем — их модульность, гибкость и мультиплектность, поскольку замену гидовых РНК (т.е. перенацеливание системы) осуществить просто и в одну клетку можно доставлять несколько их вариантов для активации нескольких генов одновременно.

Перечисленные свойства потенциально делают такие системы мощным инструментом для исследования клеточной пластичности, процессов репрограммирования клеток и выяснения роли исследуемых генов в подобных процессах. Отдельно стоит отметить, что, например, активация экспрессии гена путем воздействия на его промотор позволяет запустить “естественную” экспрессию нескольких различных изоформ мРНК, в то время как часто используемая для таких целей вирусная трансдукция рекомбинантного трансгена позволяет экспрессировать лишь одну изоформу.

Потенциальной проблемой для работы активаторных систем могут быть различия в структуре хроматина и доступности промоторных участков генов интереса в клетках разных типов. Так, легко предположить, что активация генов, отвечающих за терминальную нейрональную дифференцировку, будет происходить легче в нейральных стволовых клетках, в то время как активация таких генов в фибробластах кожи может быть менее эффективна. Вместе с тем, отдельный вопрос, требующий изучения, — сила активации подобных активаторных систем. Например, известно,

что лентивирусная трансдукция, в случае использования конститутивного сильного промотора, позволяет запустить экспрессию трансгена в десятки тысяч раз сильнее фоновой экспрессии. В то же время заранее неизвестно, во сколько раз удастся увеличить уровень экспрессии генов интереса с помощью активаторных систем, а также будет ли такое увеличение экспрессии достаточным или избыточным для изучаемого биологического процесса.

В данной работе мы рассмотрели три разных активаторных системы на основе CRISPR/dCas9: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR. Сравнили их эффективность, а также изучили, как влияет на эффективность работы системы dCas9-VPR длительность эксперимента. С этой целью мы получили три клеточные линии иммортализованных фибробластов, постоянно экспрессирующие компоненты соответствующих активаторных систем. Затем сравнили эффективность работы этих систем на примере трех транскрипционных факторов: *PDX1*, *OCT4*, *NANOG* – и выбрали наиболее эффективную систему. После этого мы активировали экспрессию транскрипционных факторов: *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, *FOXA2*, *OCT4*, *NANOG* и измерили уровень их экспрессии на 7, 14 и 28 сутки культивирования после трансфекции соответствующих геновых РНК. Нам удалось установить, что системы dCas9-VPR и dCas9-SunTag значительно эффективней dCas9-VP160. Также оказалось, что уровень экспрессии всех активируемых генов, рассмотренных в этой статье, сильно зависит от длительности эксперимента, повышаясь при увеличении времени культивирования. Максимальный уровень экспрессии каждого из рассмотренных генов также значительно варьирует.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. В данной работе использована иммортализованная линия фибробластов кожи человека 1608. Эта клеточная линия получена из первичных фибробластов кожи введением в них гена каталитического компонента теломеразы (ген *TERT*). Клеточная линия любезно предоставлена Е.Е. Егоровым (ИМБ РАН им. Энгельгардта, Москва, Россия) [3]. При пассировании клеток использовали 0.05% Трипсин-EDTA (“Life Technologies”, США). Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с 10%-ной фетальной телячьей сывороткой (“Carpicorn”, Германия) при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности.

Лентивирусная трансдукция. Лентивирусные частицы упаковывали с использованием системы третьего поколения (“Invitrogen”, США) в клетки HEK293TN. Клетки HEK293TN высевали за сутки до трансфекции в количестве 600 тыс. клеток

на чашку Петри диаметром 6 см, затем проводили трансфекцию коктейлем плазмид (вектор интереса + 3 упаковочные плазмиды) при помощи PEI (Polyethylenimine, линейная форма; “Sigma”, США) в соотношении 6 мкл PEI (стоковый раствор 6 мкг/мл) + 6 мкг плазмидной ДНК, в 100 мкл OPTI-MEM (“Gibco”, США). Трансфекционную смесь добавляли к клеткам, затем через 4–6 ч проводили смену среды на свежую. С этого момента шло накопление вирусных частиц; через 72 ч среду с лентивирусными частицами собирали, осветляли центрифугированием 200 g, 5 мин, при комнатной температуре и фильтровали через поры 0.45 мкм. Полученный вирусный супернатант добавляли к клеткам-мишеням на одну ночь в присутствии полибрена (конечная концентрация 5 мкг/мл), на следующий день заменяли среду на свежую. Экспрессия трансгена выходила на постоянный уровень примерно через 48–72 ч.

Лентивирусные конструкции для экспрессии компонентов систем трансактивации. Вектор для экспрессии системы dCas9-VP160 сконструировали на основе вектора pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (Addgene plasmid #48240; <http://n2t.net/addgene:48240>; RRID: Addgene_48240) [4], который был любезно предоставлен Rudolf Jaenisch. С этой целью в компании Евроген (ООО “Евроген”, Москва, Россия), последовательность гена dCas9-VP160 переклонировали в вектор для лентивирусной трансдукции pLVТ.

Векторы для экспрессии системы dCas9-SunTag – pHR-TRE3G-dCas9-10XGCN4-P2A-mCherry (Addgene plasmid #122132; <http://n2t.net/addgene:122132>) и pHR-PGK-scFvGCN4-sfGFP-VP64 (Addgene plasmid #122133; <http://n2t.net/addgene:122133>) – любезно предоставлены Stanley Qi [5]. Вектор для экспрессии системы dCas9-VPR – lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro (Addgene plasmid #99373; <http://n2t.net/addgene:99373>) – любезно предоставлен Kristen Brennand [6].

Подбор и клонирование геновых РНК. Последовательности геновых РНК, нацеленные на промоторы различных генов для активации их экспрессии, представлены в табл. 1. Последовательности геновых РНК для активации генов *OCT4* и *NANOG* взяты из статьи Weltner с соавт. [7], последовательности остальных геновых РНК подобраны при помощи ресурсов EPD (Eukaryotic Promoter Database, <https://epd.epfl.ch>), ENSEMBL.ORG, CRISPOR.TEFOR.NET.

Олигонуклеотиды, кодирующие варибельную часть геновых РНК, синтезированы в компании “Евроген”. Данные олигонуклеотиды фосфорилированы полинуклеотидкиназой T4 (“NEB”, США) согласно инструкции производителя и затем лигированы в линеаризованный вектор pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP с помощью ДНК лигазы T7 (“NEB”). Вектор (Addgene plasmid # 57823;

<http://n2t.net/addgene:57823>) [8] любезно предоставлен доктором Benjamin Ebert.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Клетки снимали с культурального пластика и собирали центрифугированием. Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA (“Евроген”). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра Implen P360 nanodrop system. Для приготовления раствора кДНК отбирали 1 мкг тотальной РНК и обрабатывали ДНКазой (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно инструкции производителя. Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора MMLV kit (“Евроген”) с использованием олиго-dT праймеров. Обратную транскрипцию проводили в течение 1 ч при 37°C и 10 мин при 70°C для остановки реакции.

Количественная ПЦР. Количественную ПЦР проводили с использованием амплификатора CFX96 (“Bio-Rad”, США). Температурный профиль реакции: 1) 95°C, 10 мин; 2) 40 циклов: 95°C, 15 с и 60°C 1 мин; 3) построение кривой плавления в диапазоне от 60 до 95°C. Для приготовления реакционных смесей использовали готовую ПЦР-смесь HS-SYBR (“Евроген”). Для нормирования результатов использовали следующие гены: *C1orf43* и *REEP5*. Выбор референтных генов проведен с помощью программы geNorm. Список использованных праймеров представлен в табл. 2. Для расчетов относительных уровней экспрессии использовали $\Delta\Delta C_T$ метод.

Иммуноцитохимия. Перед окрашиванием клетки отмывали в PBS и фиксировали в течение 15 мин в 4%-ном растворе параформальдегида при комнатной температуре. Затем их аккуратно промывали в том же буфере еще три раза (по 5 мин при комнатной температуре). Клетки инкубировали в растворе первичных антител (анти-Cas9, “Thermo Fisher Scientific”, cat# MA5-23519) в блок-растворе (10% FBS и 0.1% Triton-X-100 в PBS) в течение 16–18 ч при 4°C, снова промывали 3 раза и инкубировали в растворе вторичных антител (Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 594 (“Thermo Fisher Scientific”) в блок-растворе в течение 1 ч при 37°C. Затем клеточные ядра окрашивали DAPI (“Thermo Fisher Scientific”) (1 мг/мл в PBS). Снимки образцов получали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FL AUTO (Life Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение клеточных линий, постоянно экспрессирующих компоненты активаторных систем

Нами использована линия иммортализованных фибробластов кожи человека 1608hT [3]. Получены три линии клеток, постоянно экспресси-

Таблица 1. Последовательности гидовых РНК

Целевой ген	Последовательность, 5'→3'
<i>OCT4</i>	GGGGGAGAACTGAGGCGA
<i>NANOG</i>	GCGCCAGGAGGGGTGGGTCTA
<i>PDX1</i>	GCCGCACCATAGGCTCCGCG
<i>NKX2-2</i>	GCCTTATATGGACTGATCGCT
	GTGTGGACTCGCGAGCGACG
<i>NKX6-1</i>	GTCTAGGACTCGCGGAACGAA
	GCTCTGCTCTTTCGGTCGCG
<i>FOXA2</i>	GGAGGAGGAGGTGTGGACCG
	GTGCCAACCTCAGCCGCCACC

Таблица 2. Использованные праймеры

Ген	Последовательность, 5'→3'
<i>C1orf43</i>	ACGCCTTTCAAGGGTGTACG CAAAGACCCCTGTCCCATAGC
<i>REEP5</i>	ACTGCATGACTGACCTTCTGG AGTCCGATGACACCAAGAGC
<i>OCT4</i>	ACCCACACTGCAGCAGATCA CACACTCGGACCACATCCTTCT
<i>NANOG</i>	GTCTCGTATTTGCTGCATCGT AACACTCGGTGAAATCAGGGT
<i>PDX1</i>	CCCTGGGTGACCACTAAACC CACAGCCTCTACCTCGGAAC
<i>NKX2-2</i>	CAATGACAAGGAGACCCCGG GAAAAGCACTCGCCGCTTTC
<i>NKX6-1</i>	CGTTGGGGATGACAGAGAGT CGAGTCCTGCTTCTTCTTGG
<i>FOXA2</i>	GTGAAATCCAGGTCTCGGGT GCCCTTGCAGCCAGAATACA

рующих компоненты трех активаторных систем: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR, – с помощью лентивирусной трансфекции соответствующих векторов [4–6]. Клеточные линии названы 1608-VP160, 1608-SunTag и 1608-VPR соответственно. Мы проверили наличие экспрессии компонентов активаторных систем с помощью иммуноцитохимической окраски полученных клеточных линий антителами против Cas9. Результаты представлены на рис. 1. Окраска на Cas9 показала корректную локализацию преимущественно в ядрах окрашенных клеток. Таким образом мы подтвердили, что компоненты активаторных систем экспрессируются в полученных клеточных линиях.

Сравнение активаторных систем

Сравнивая три рассматриваемые активаторные системы, мы использовали гидовые РНК, комплементарные промоторам генов *OCT4*, *NANOG* и *PDX1*. Гены *OCT4* и *NANOG* – одни из

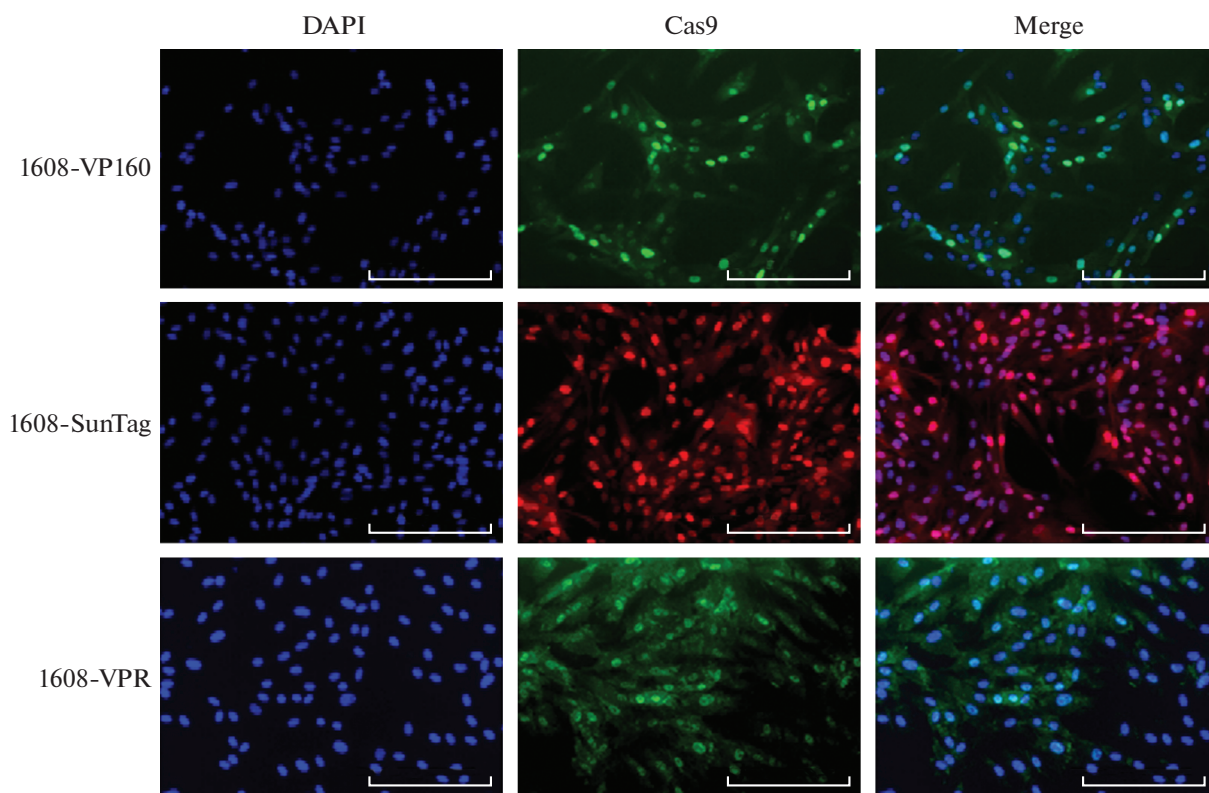


Рис. 1. Окраска антителами против белка Cas9 клеточных линий, в которые трансдуцированы компоненты активаторных систем dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR. Как видно, белок dCas9 локализован в ядрах клеток, — следовательно, компоненты активаторных систем успешно экспрессируются. Флуоресцентная микроскопия, размер шкалы — 200 мкм.

ключевых транскрипционных факторов поддержания плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках, а ген *PDX1* — ключевой транскрипционный фактор продуцирующих инсулин бета-клеток поджелудочной железы. Данные гены не экспрессируются (либо экспрессируются на крайне низком уровне единичных транскриптов) в фибробластах кожи человека. Далее при помощи лентивирусной трансдукции мы доставили в клетки линий 1608-VP160, 1608-SunTag и 1608-VPR несколько гидовых РНК для активации целевых генов. Трансдукцию проводили для каждой гидовой РНК по отдельности. В то же время каждую клеточную линию трансдуцировали лентивирусом, кодирующим гидовую РНК, не имеющую мишени в геноме человека (no target gRNA, NTC-gRNA), и такие клеточные линии использовали в качестве контроля сравнения. Через семь суток после трансдукции из полученных клеток выделили тотальную РНК и измерили уровни экспрессии генов *OCT4*, *NANOG* и *PDX1* методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Далее уровни экспрессии откалибровали по контрольному образцу NTC-gRNA, для каждой точки эксперимента сделаны независимые биологические повторы, результат по которым усредняли. Ре-

зультаты эксперимента представлены на рис. 2. В целом, нам удалось зафиксировать значимую достоверную активацию экспрессии исследуемых генов. В среднем уровень экспрессии рассмотренных генов повысился в 3.8 раза для dCas9-VPR, 3.9 раза для dCas9-SunTag и 1.2 раза для dCas9-VP160. На основе полученных данных сделан вывод о том, что активаторные системы dCas9-SunTag и dCas9-VPR (второго поколения) работают эффективней, чем dCas9-VP160 (первого поколения). В целом данный факт согласуется с опубликованными ранее результатами [2].

Исследование эффективности активаторной системы dCas9-VPR в зависимости от времени культивирования

Сравнив эффективность работы активаторных систем в доступных нам условиях, для дальнейших экспериментов мы выбрали систему dCas9-VPR. Несмотря на то, что данная система показала сравнимую эффективность с системой dCas9-SunTag, мы решили использовать dCas9-VPR ввиду более простых технических нюансов при работе с линией (поддержание постоянной экспрессии всего одного трансгена, в то время как dCas9-SunTag

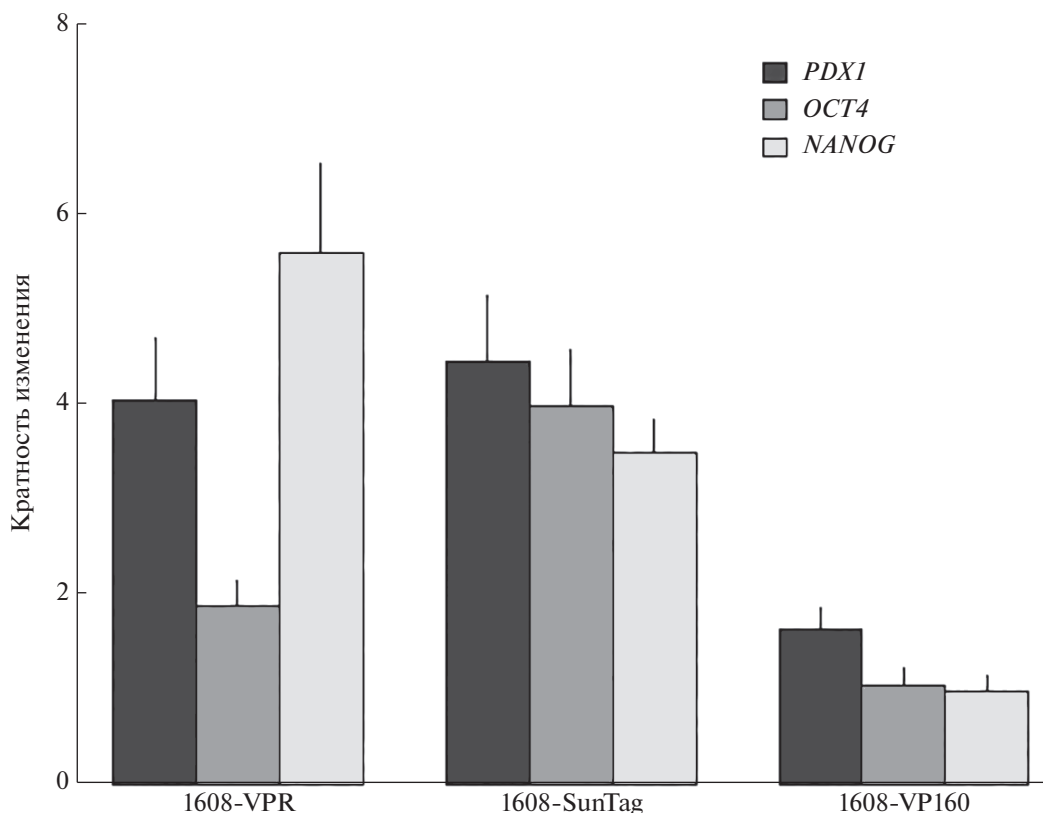


Рис. 2. Сравнение эффективности активаторных систем dCas9-VPR, dCas9-SunTag, dCas9-VP160. Уровни экспрессии генов *PDX1*, *OCT4* и *NANOG* в клеточных линиях 1608-VPR, 1608-SunTag и 1608-VP160 через 7 суток после трансдукции лентивирусами, кодирующими гидовые РНК к генам *PDX1*, *OCT4* и *NANOG*. Уровни экспрессии откалиброваны по таковой в образцах, трансдуцированных конструкцией, кодирующей безтаргетную гидовую РНК NTC-gRNA. Бары обозначают стандартное отклонение, каждое измерение проведено в трех технических и двух независимых биологических повторах.

требует поддержания экспрессия двух трансгенов, а также “забывает” два флуоресцентных канала). Поскольку уровень активации в предыдущем эксперименте был недостаточно сильным по сравнению с литературными данными, мы решили проверить, как меняется уровень экспрессии активируемых генов с течением времени. Для этого использовали гидовые РНК, нацеленные на промоторы генов *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*. Клетки линии 1608-VPR трансдуцировали лентивирусами, кодирующими гидовые РНК к вышеперечисленным генам, и NTC-gRNA. Клетки культивировали и выделяли из них тотальную РНК на 7, 14 и 28 суток после трансдукции. Уровень экспрессии активируемого гена оценивали при помощи количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессии откалибровали по контрольному образцу NTC-gRNA, для каждой точки эксперимента провели независимые биологические повторы и результат усредняли. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Мы наблюдали значительное достоверное повышение уровней экспрессии активируемых генов с течением времени.

Наиболее сильно возросла экспрессия гена *FOXA2* (примерно в 100, 1000 и 5000 раз на 7, 14 и 28 сутки после трансдукции соответственно). Наиболее слабое увеличение экспрессии наблюдали для *OCT4* (примерно в 21 раз на 28 сут после трансдукции). В среднем уровни экспрессии активируемых генов повысились в 30, 240 и 960 раз на 7, 14 и 28 сутки эксперимента. Довольно широкий разброс результатов между генами может быть объяснен разным “качеством” гидовых РНК, особенностями используемой клеточной культуры, такими как доступность промоторных участков целевых генов для гидовых РНК и исходным уровнем экспрессии этих генов, а также особенностями регуляции экспрессии активируемых генов в фибробластах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнив эффективность активационных систем dCas9-VPR, dCas9-SunTag и dCas9-VP160 в фибробластах кожи человека на примере генов *PDX1*, *OCT4* и *NANOG*, мы установили, что в среднем уровень экспрессии рассмотренных генов

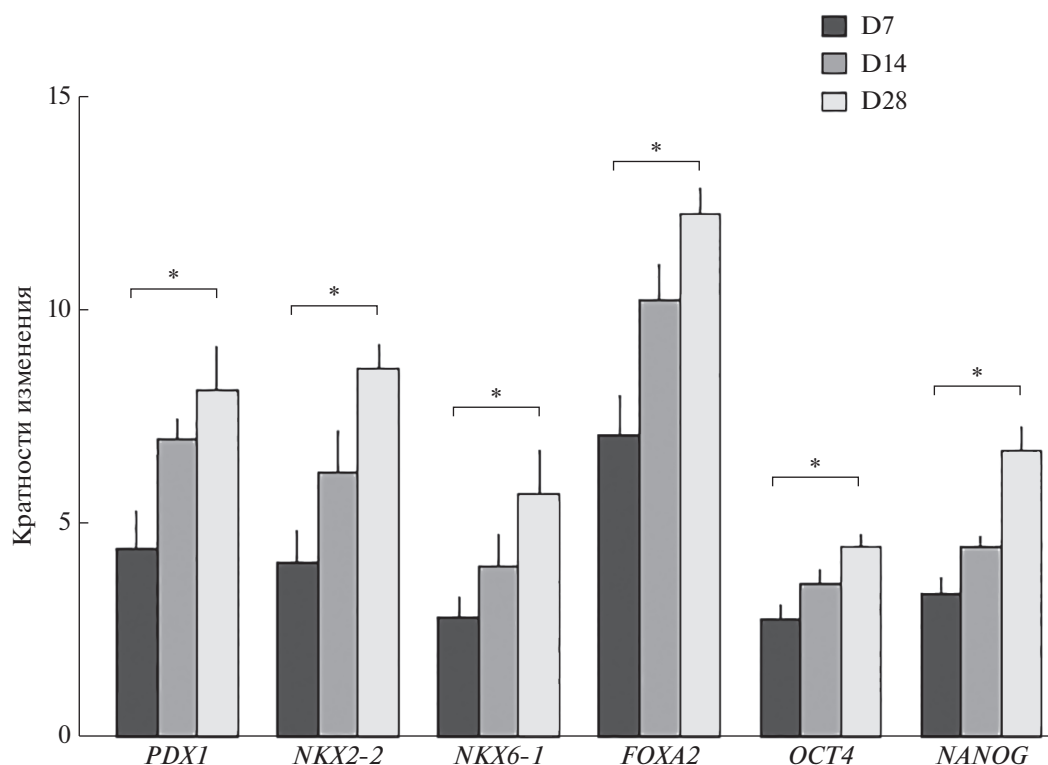


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии активируемых генов в клеточной линии 1608-VPR в зависимости от времени после трансфекции гидовых РНК. Уровни экспрессии измерены на 7, 14 и 28 сутки после трансдукции гидовых РНК. Уровни экспрессии откалиброваны по уровню экспрессии в образцах, трансдуцированных конструкцией, кодирующей безтаргетную гидовую РНК NTC-gRNA. Как можно видеть, экспрессия каждого из генов достоверно значительно возрастает с течением времени культивирования. Бары обозначают стандартное отклонение, каждое измерение проведено в трех технических и двух независимых биологических повторах. * Обозначает достоверное отличие (p -value < 0.05) согласно t -критерию Стьюдента.

выше в 3.8, 3.9 и 1.2 раза для dCas9-VPR, dCas9-SunTag и dCas9-VP160 соответственно, что указывает на превосходство систем активации второго поколения по сравнению с системами первого. Полученные нами результаты идентичны уже опубликованным данным других исследовательских групп. Так, группа исследователей под руководством Tanenbaum M.E., разработавшая систему dCas9-SunTag, провела сравнение эффективности своей системы с системой dCas9-VP64 (система первого поколения, практически аналог dCas9-VP160) на примере активации гена *CDKN1B* в клеточной линии HEK293. Они обнаружили, что уровень экспрессии *CDKN1B* повышался более чем в 3 раза и менее чем в 1.5 раза для систем dCas9-SunTag и dCas9-VP64 соответственно [9]. Исследователи во главе с Blancfort P. использовали систему dCas9-VPR для активации опухолевого супрессора *PTEN* в клеточных линиях меланомы SK-MEL28 и рака молочной железы SUM159. Через двое суток после трансфекции гидовых РНК уровень экспрессии *PTEN* вырос в 3 и 2.5 раза в соответствующих клеточных линиях [10]. В работе Xi H. с соавт. [11] экспрессия *PAX7* в

плюрипотентных клетках человека повысилась в 8 раз с помощью dCas9-VPR на вторые сутки после трансфекции гидовых РНК. Однако более интересные результаты представлены группой под руководством Church G.M., разработавшей систему dCas9-VPR. Они сравнили свою систему и dCas9-VP64, используя гидовые РНК к генам, участвующим в нейтральной дифференцировке, в плюрипотентных клетках человека и линии HEK293. Оказалось, что система dCas9-VPR примерно в 80 раз эффективней в HEK293 и в 15 раз – в плюрипотентных клетках, чем dCas9-VP64 [12]. Кроме того, установлено, что в клетках HEK293 экспрессия *NEUROD1* возрастала в 87 раз, в то время как *ASCL1* – в 4600 раз. Таким образом, можно прийти к заключению, что эффективность активации генов интереса зависит как от системы активации, так и от особенностей используемого типа клеток. Возможным объяснением таких различий могут служить профили конденсации хроматина и метилирования промоторов активируемых генов, а также регулирование экспрессии генов интереса со стороны различных тран-

скрипционных факторов в конкретной клеточной культуре.

Еще один фактор, влияющий на эффективность активации генов интереса — подбор гидовых РНК к промоторам этих генов. Задача определения оптимального участка промотора, как и картирование промоторов, для определения оптимального сайта связывания гидовых РНК полностью не решена в настоящий момент. Существует две стратегии для решения этой задачи. Первая состоит в подборе одновременно нескольких гидовых РНК к одному промотору (как правило, до пяти на один промотор) и в сравнении их по отдельности с выбором в последующем наиболее эффективной. Эта величина для гидовых РНК может значительно отличаться. Так, в работе Liu P. с соавт. [13] обнаружено, что эффективность разных гидовых РНК для активации *SOX2* в линии эмбриональных фибробластов мыши MEF отличается в 3–5 раз. Похожие результаты получены группой Tanenbaum M.E. с соавт. [9] для гена *CDKN1B* в клеточной линии HEK293, группой Hoogewijs D. с соавт. [14] для гена *ADGB* в линиях HEK293 и MCF7, а также группой Pyle A.D. с соавт. [11] для гена *PAX7* в плюрипотентных клетках. Второй стратегией может служить подбор несколько гидовых РНК и доставка в клеточную культуру их эквимоллярной смеси. Такой подход позволяет сэкономить ресурсы на проверке каждой гидовой РНК по отдельности, однако может приводить к снижению эффективности активации в целом в культуре (поскольку доля эффективных гидовых РНК будет снижена за счет присутствия неэффективных РНК). С другой стороны, в случае, если внутри клетки оказывается несколько гидовых РНК, которые садятся на разные участки промотора, можно надеяться на возникновение кумулятивного синергетического эффекта и кратного повышения эффективности работы системы.

Мы использовали гидовые РНК к *OCT4* и *NANOG*, эффективность которых подтверждена в работе Weltner с соавт. [7], а также подобранными самостоятельно гидовыми РНК к генам *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*. В случае генов *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2* применяли по две гидовых РНК в эквимоллярной смеси. Наблюдаемые значительные различия в эффективности активации рассматриваемых генов (от 6 раз для *OCT4* и 20 раз для *PDX1* на 7 сут после трансдукции) обусловлены, по всей видимости, как качеством гидовых РНК, так и особенностями использованной линии фибробластов кожи человека. Несмотря на то, что полученные результаты свидетельствуют о достоверно различимом эффекте активации экспрессии, этот уровень вряд ли может быть использован для изучения процессов репрограммирования одного типа клеток в другой или изучения клеточной пластичности. Так, по некоторым

оценкам, для репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки уровень экспрессии мастер-генов должен возрасти более, чем в 1000 раз.

Низкая эффективность активации генов интереса также может быть объяснена недостатком компонентов активаторной системы и гидовых РНК или недоступностью сайтов связывания гидовых РНК с целевым промотором. В данной работе мы использовали клеточные культуры с постоянной экспрессией компонентов активаторных систем и лентивирусную доставку конструкций, кодирующих гидовые РНК. Такой подход позволяет обеспечивать избыток необходимых компонентов и устойчивую работу системы, поскольку, как показано группой Hoogewijs D. [14], изменение количества гидовой РНК и компонентов системы dCas9-VPR в широком диапазоне не приводит к кратному росту эффективности активации гена *ADGB* в линии HEK293. Вместе с тем, Liu P. с соавт. [13] установили, что с ростом продолжительности эксперимента с 4 до 12 суток, уровень экспрессии *OCT4* в клетках MEF возрастал в три раза, а экспрессия *SOX2* — в 5. Hu W. с соавт. [15] показали, что эффективность активации гена *FibH* в клетках VmE шелковичного червя возрастает в 10 раз при увеличении продолжительности эксперимента с 24 до 60 ч. Опираясь на эти данные, мы решили значительно продлить время эксперимента и проверить, как будут меняться уровни экспрессии активируемых генов в течение 28 суток после доставки гидовых РНК. Установлено, что экспрессия всех активируемых генов (*PDX1*, *OCT4*, *NANOG*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*) значительно возрастает на 7, 14 и 28 сутки культивирования; при этом в каждой временной точке наблюдали значительный разброс в эффективности активации генов интереса. Так, на 7 сутки эксперимента экспрессия усиливалась в 6–20 раз, а на 28 сутки — в 22–4000 раз. Заметим, что наибольшая эффективность активации достигнута для гена *FOXA2*, в то время как для остальных генов она варьировала от 22 до 398 раз на 28 сутки культивирования. Стоит отметить, что все активируемые гены — это гены транскрипционных факторов, не характерных для фибробластов, и можно предположить, что исследуемые промоторы расположены в областях компактного гетерохроматина. Мы полагаем, что возрастание их экспрессии с увеличением времени эксперимента можно объяснить пролиферацией клеток, так как процессы клеточного деления сопровождают циклы конденсации–деконденсации хроматина, что увеличивает доступность сайтов связывания гидовых РНК с целевыми промоторами. Широкий диапазон эффективности активации, по-видимому, связан также с регулированием экспрессии этих генов в использованной нами линии фибробластов. Например, ген *FOXA2* представляет собой “пионер-

ский” транскрипционный фактор, способный к самостоятельной модификации гистонов, ремоделированию хроматина и профиля метилирования [16, 17]. В то же время гены *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, *OCT4* и *NANOG* регулируются большим числом других транскрипционных факторов, отсутствие экспрессии которых в фибробластах может снижать эффективность их активации.

Таким образом, экспериментально подтверждено, что системы трансактивации второго поколения: dCas9-VPR и dCas9-SunTag – более эффективны, чем система первого поколения dCas9-VP160. Эффективность активации в одних и тех же клетках для разных генов разная, что, по всей видимости, происходит из-за совокупности факторов: качества гидовых РНК, выбора клеточной линии, особенностей эпигенетического ландшафта в конкретном биологическом контексте целевого промотора. Нам удалось подобрать несколько гидовых РНК и вызвать достоверную значимую активацию генов *FOXA2*, *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, являющихся ключевыми транскрипционными факторами продуцирующих инсулин клеток поджелудочной железы. Также экспериментально показана прямая зависимость степени активации целевых генов от времени работы системы, что, несомненно, необходимо учитывать при планировании экспериментов по репрограммированию клеток при помощи трансактиваторных систем на основе CRISPR/dCas9.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки (№ 075-15-2019-1789), выданного Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Часть работы, связанная с иммунофлуоресцентной микроскопией, поддержана грантом РНФ (грант № 17-75-20178). Работа Артюхова А.С. поддержана грантом Systems Biology Fellowship от Сколковского института науки и технологий.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang H., Qin C., An C., Zheng X., Wen S., Chen W., Liu X., Lv Z., Yang P., Xu W., Gao W., Wu Y. (2021) Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol. Cancer*. **20**(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01431-6>
- Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., Dashinimaev E.B. (2020) Cell reprogramming with CRISPR/Cas9 based transcriptional regulation systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 882. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00882>
- Egorov E.E., Terekhov S.M., Vishniakova Kh.S., Karachentsev D.N., Kazimirchuk E.V., Tsvetkova T.G., Veiko N.N., Smirnova T.D., Makarenkov A.S., El'darov M.A., Meshcheriakova Iu.A., Liapunova N.A., Zelenin A.V. (2003) Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. *Ontogenez*. **34**(3), 183–192 (in Russ.).
- Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. **23**(10), 1163–1171. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.122>
- Liu Y., Yu C., Daley T.P., Wang F., Cao W.S., Bhate S., Lin X., Still C. 2nd, Liu H., Zhao D., Wang H., Xie X.S., Ding S., Wong W.H., Wernig M., Qi L.S. (2018) CRISPR activation screens systematically identify factors that drive neuronal fate and reprogramming. *Cell Stem Cell*. **23**(5), 758–771.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.003>
- Ho S.M., Hartley B.J., Flaherty E., Rajarajan P., Abdelaal R., Obiorah I., Barretto N., Muhammad H., Phatnani H.P., Akbarian S., Brennand K.J. (2017) Evaluating synthetic activation and repression of neuropsychiatric-related genes in hiPSC-Derived NPCs, neurons, and astrocytes. *Stem Cell Rep*. **9**(2), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.012>
- Weltner J., Balboa D., Katayama S., Bernal M., Krjutškov K., Jouhilahti E.M., Trokovic R., Kere J., Otonkoski T. (2018) Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nat. Commun.* **9**(1), 2643. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>
- Heckl D., Kowalczyk M.S., Yudovich D., Belizaire R., Puram R.V., McConkey M.E., Thielke A., Aster J.C., Regev A., Ebert B.L. (2014) Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat. Biotechnol.* **32**(9), 941–946. <https://doi.org/10.1038/nbt.2951>
- Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S., Vale R.D. (2014) A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. **159**(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- Moses C., Nugent F., Waryah C.B., Garcia-Bloj B., Harvey A.R., Blancafort P. (2019) Activating PTEN tumor suppressor expression with the CRISPR/dCas9 system. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **14**, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.003>
- Xi H., Young C.S., Pyle A.D. (2020) Generation of PAX7 reporter cells to investigate skeletal myogenesis from human pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* **1**(3), 100158. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100158>
- Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Iyer P.R.E., Lin S., Kiani S., Guzman C.D., Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B.E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G.M. (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming.

- Nat. Methods.* **12**(4), 326–328.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>
13. Liu P., Chen M., Liu Y., Qi L.S., Ding S. (2018) CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell.* **22**(2), 252–261.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.001>
 14. Koay T.W., Osterhof C., Orlando I.M.C., Keppner A., Andre D., Yousefian S., Suárez Alonso M., Correia M., Markworth R., Schödel J., Hankeln T., Hoogewijs D. (2021) Androglobin gene expression patterns and FOXJ1-dependent regulation indicate its functional association with ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **296**, 100291.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100291>
 15. Hu W., Wang X., Ma S., Peng Z., Cao Y., Xia Q. (2021) CRISPR-mediated endogenous activation of fibroin heavy chain gene triggers cellular stress responses in *Bombyx mori* embryonic cells. *Insects.* **12**(6), 552.
<https://doi.org/10.3390/insects12060552>
 16. Friedman J.R., Kaestner K.H. (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol. Life Sci.* **63**(19–20), 2317–2328.
<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6095-6>
 17. Iwafuchi-Doi M., Donahue G., Kakumanu A., Watts J.A., Mahony S., Pugh B.F., Lee D., Kaestner K.H., Zaret K.S. (2016) The pioneer transcription factor FoxA maintains an accessible nucleosome configuration at enhancers for tissue-specific gene activation. *Mol. Cell.* **62**(1), 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.001>

The Efficiency of Gene Activation Using CRISPR/dCas9-Based Transactivation Systems Depends on the System Run Time

A. S. Artyuhov¹, D. A. Dorovskiy², A. V. Sorokina¹, K. M. Shakirova¹,
 E. D. Momotyuk^{1,3}, and E. B. Dashinimaev^{1,2,*}

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

³Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: dashinimaev@gmail.com

One promising application based on the CRISPR/Cas9 system is the transactivator systems, which allow targeted control of the genes expression levels in cell culture. However, their performance has been reported to vary considerably depending on the cell type and the activator system used. In this work, we compared the efficacy of the three activator systems dCas9-VP160, dCas9-SunTag, and dCas9-VPR in an immortalized human skin fibroblast line to activate the expression of *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *FOXA2*, *NKX2-2*, and *NKX6-1* genes. It was shown that the efficiency of activation of these genes really depended on the type of activator system, and the strength of activation depended on the duration of the activator system.

Keywords: CRISPR/Cas9, activation, dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR