

УДК 57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cpf1 ДЛЯ ИНДУЦИРУЕМОГО НОКАУТА ГЕНОВ

© 2021 В.В. Шерстюк*, С.М. Закиян

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: svv@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.03.2021

После доработки 09.05.2021

Принята к публикации 10.05.2021

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) крысы играют важную роль в изучении генов, участвующих в поддержании плюрипотентного состояния и в процессах раннего развития этого модельного организма. Для изучения функций жизненно важных генов, а также в ходе процессов дифференцировки клеток широко используется метод индуцируемого нокаута. Система CreERT2/loxP позволяет получить индуцируемый нокаут в клетках, экспрессирующих тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу (CreERT2) и содержащих loxP-сайты, фланкирующие целевой ген, путём добавления в культуральную среду 4-гидрокситамоксифена. Однако в настоящее время отсутствуют линии ЭСК крысы, экспрессирующие CreERT2. В данной работе мы протестировали три CRISPR/Cas-системы на предмет внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26* в ЭСК крысы и произвели встройку в данный локус тамоксифен-зависимой Cre-рекомбиназы с использованием системы CRISPR/Cpf1. Было показано, что полученные трансгенные линии ЭСК крысы сохранили характеристики плюрипотентных клеток. Активность тамоксифен-зависимой Cre-рекомбиназы была проанализирована с использованием репортёрного вектора.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эмбриональные стволовые клетки, крыса, CRISPR/Cas, редактирование генома, Cre-рекомбиназа.

DOI: 10.31857/S0320972521070046

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – это полученный из внутренней клеточной массы бластоцист тип клеток, для которого характерны свойства самообновления и плюрипотентности [1, 2]. Данные свойства обуславливают широкое применение ЭСК для изучения процессов раннего развития и дифференцировки клеток. Одним из важных объектов биологии является серая крыса (*Rattus norvegicus*). Крыса используется в качестве модельного объекта в различных областях, среди которых исследования в области физиологии, токсикологии, поведения, а также моделирование генетических за-

болеваний [3]. ЭСК крысы были впервые получены в 2008 г. [4, 5]. Тем не менее количество работ, посвящённых ЭСК крысы, в том числе и с использованием современных методов редактирования генома, очень мало.

Одним из распространённых инструментов изучения функций генов является их нокаут. Появление систем редактирования генома, и в частности системы CRISPR/Cas9, позволяющей вносить одноцепочечные или двуцепочечные разрывы в интересующие участки генома, дало возможность эффективно и в короткие сроки получать нокаут целевых генов [6]. Однако при использовании систем редактирования генома в результате получается гетерогенная популяция клеток, в которой количество клеток с нокаутом целевого гена зависит от эффективности доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки и активности выбранной направляющей РНК (нРНК). Кроме того, данный подход не работает в случае изучения жизненно важных для клеток генов, а также при изучении функций генов в ходе дифференцировки или репрограммирования клеток. В данных случаях наиболее применим метод индуцируемого нокаута, которого можно достичь при использовании системы CreERT2/loxP. Хи-

Принятые сокращения: нРНК – направляющая РНК; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; AvSA – сайт сплайсинга аденовируса; CreERT2 – тамоксифен-индуцируемая Cre-рекомбиназа; CRISPR/Cas9 – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/CRISPR-ассоциированный белок 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9); CreERT2 – тамоксифен-индуцируемая Cre-рекомбиназа; GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); 4-ОНТ – 4-гидрокситамоксифен; NeoR – ген устойчивости в неомицину.

* Адресат для корреспонденции.

мерный белок тамоксифен-зависимая Cre-рекомбиназа (CreERT2) состоит из Cre-рекомбиназы, соединённой с мутантным лиганд-связывающим доменом эстрогенового рецептора человека, и локализуется в цитоплазме клетки. Добавление 4-гидрокситамоксифена (4-OHT) приводит к транслокации CreERT2 в ядро и рекомбинации между loxP-сайтами [7]. В свою очередь, ЭСК, экспрессирующие CreERT2, можно получить путём интеграции данного трансгена в локус *Rosa26* методом гомологичной рекомбинации с использованием системы CRISPR/Cas. В последние годы значительно увеличилось количество известных CRISPR/Cas-систем для редактирования генома [8]. Наиболее используемой системой является CRISPR/SpCas9 из *Staphylococcus pyogenes* [6]. Для редактирования генома также адаптированы и используются системы CRISPR/SaCas9 из *Staphylococcus aureus* и CRISPR/Cpf1 [9, 10]. К настоящему времени для гомологичной рекомбинации в ЭСК крысы использовали только систему CRISPR/SpCas9 [11–14].

Ранее нами были получены и полностью охарактеризованы ЭСК крысы [15–17]. В данной работе мы протестировали три CRISPR системы на предмет внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26*. Мы получили ЭСК крысы, экспрессирующие тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу с использованием системы CRISPR/Cpf1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение донорного плазмидного вектора. Создание донорного вектора для рекомбинации осуществляли в несколько этапов, последовательно клонируя необходимые части в плазмиду pBluescript II SK (+) («Agilent Technologies», США), используя реакции гидролиза эндонуклеазами рестрикции и лигирование. На первом этапе мы амплифицировали ген *CreERT2* и сайт полиаденилирования, используя в качестве матрицы плазмиду MXS_PGK::CreERT2-bGHpA («Addgene», США, #62444) [18], и клонировали в pBluescript II SK(+) по сайтам рестрикции EcoRI и SmaI. Далее произвели встройку акцепторного сайта сплайсинга аденовируса (AvSA) по сайтам рестрикции KpnI и ApaI, используя пару комплементарных олигонуклеотидов. На следующем этапе была произведена встройка последовательности, кодирующей T2A-пептид, по сайтам XhoI и EcoRI с использованием пары комплементарных олигонуклеотидов. Ген устойчивости к неомицину амплифицировали, используя в качестве матрицы плаз-

миду AAVS1-Neo-M2rtTA («Addgene», #60843) [19], и встроили в pBS-AvSA-T2A-CreERT2 по сайтам ApaI и XhoI. Плечи гомологии к первому интрону *Rosa26* крысы были получены с помощью ПЦП с использованием геномной ДНК, выделенной из ЭСК крысы. Для того, чтобы предотвратить внесение двуцепочечных разрывов в донорный вектор и в ДНК после встройки трансгена мы расположили протоспейсер на стыке плеч гомологии и внесли мутацию в прилежащий к протоспейсеру мотив (PAM-сайт). Сначала была произведена встройка левого плеча гомологии по сайту KpnI, затем правого плеча гомологии – по сайтам SpeI и NotI. Все олигонуклеотиды («Биоссет», Россия), использованные для амплификации и клонирования фрагментов, приведены в табл. 1. Правильность сборки плазмидных конструкций и отсутствие замен нуклеотидов проверяли на каждом этапе клонирования с использованием секвенирования по Сэнгеру. Для электропорации в клетки крысы донорный вектор был линейаризован по сайтам рестрикции NotI и BglI. Полученные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, необходимый фрагмент вырезали и очищали с использованием набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit («Promega», США). Все приведенные в данной работе эндонуклеазы рестрикции были приобретены в компании «New England Biolabs», (США).

Плазмиды систем CRISPR/Cas, использованные в работе. В данной работе мы использовали системы доставки компонентов CRISPR/Cas9, состоящие из двух плазмид. Одна плаزمида кодировала нуклеазу, а вторая – нРНК и зеленый флуоресцентный белок (GFP) для оценки эффективности электропорации. Для доставки компонентов системы CRISPR/SpCas9 мы использовали плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 («Addgene», #42230) [20] и pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP. pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP была получена на основе плазмиды pX552 («Addgene», #60958) [21] путём замены промотора и удаления KASH-домена. Для доставки компонентов системы CRISPR/SaCas9 мы использовали pX601-CMV-SaCas9, которая была получена путём замены промотора miniCMV на полноценный CMV-промотор в плазмиде pX601 miniCMV-SaCas9-SpA-sgRNA («Addgene», #107055), и pX552-U6-Sa-gRNA-CMV-GFP, которая была получена путём замены скаффолда для нРНК в плазмиде pX552-U6-Sp-gRNA-CMV-GFP. Для доставки компонентов CRISPR/Cpf1 мы использовали плазмиды pTE4560 («Addgene», #107526) [22] и pAsCpf1-2NLS, сконструированную путём замены фраг-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в работе

Название пары олигонуклеотидов	Последовательность (5'–3')	Описание
CreERT2pA	GAGTCGAATTCTGGCCACCATGTCCAATTTACT, CGAATTGGTTCGACCATAGAG	праймеры для амплификации гена <i>CreERT2</i> с сайтом полиаденилирования
AvSA	CTAGGGCGCAGTAGTCCAGGGTTTCCTTGATGATGTCAT- ACTTATCCTGTCCCTTTTTTTTCCACAGCTCGCGGTTGA- GGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTGGGCC, CACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGA- GCTGTGGAAAAAAGGGACAGGATAAGTATGACATCAT- CAAGGAAACCCTGGACTACTGCGCCCTAGGTAC	комплементарные олигонуклеотиды для встройки сайта сплайсинга аденовируса
T2A	TCGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACG- TGGAGGAGAATCCCGGCC, AATTGGGCGGGATTCTCTCCACGTCACCGCATGTTA- GAAGACTTCTCTGCCCTC	комплементарные олигонуклеотиды для встройки последовательности, кодирующей T2A-пептид
NeoR	CCTAGGGGGCCCGCCACCATGGGATCGGCCATTGAACA, CGGATCTCGAGAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC	праймеры для амплификации гена устойчивости к неомицину
HA-L	AGTCTTGGTACCACGCGTTGCAAACGGGATTCTCTCTT, AGTCATGGTACCTCTAAGATCAGGAGAGAGGG	праймеры для амплификации левого плеча гомологии к первому интрону <i>Rosa26</i>
HA-R	CCTGATACTAGTGTCCGATGACTCATGCAACCAG, ATTGTAGCGGCCCGCTGCGCACACCACCCTAAAA	праймеры для амплификации правого плеча гомологии к первому интрону <i>Rosa26</i>
F1/R1	TCATGCAAGTTCAGTCCCTAAG, GCCAGTCATAGCCGAATAG	праймеры для анализа встройки трансгена
F2/R2	GATCCGCCCTGGAGAATT, AAGCTCTCTGAACTGTGAATAGG	праймеры для анализа биаллельности встройки трансгена и для анализа доли инсерций/делеций при действии CRISPR/Cas систем
Oct4	CACACTCTACTCGGTCCCTT, TGCTTTCAATTCTCCCA	праймеры для анализа уровня экспрессии Oct4
Sox2	TATCGAGATAAACATGGCAA, CAGAATCAAAACCCAGCAA	праймеры для анализа уровня экспрессии Sox2
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT, GCAATGGATGCTGGGATACT	праймеры для анализа уровня экспрессии Nanog
Cre	CTGACGGTGGGAGAATGTTAAT, CATCGCTCGACCATTTAGTT	праймеры для анализа уровня экспрессии Cre-рекомбиназы

Таблица 2. Последовательности протоспейсеров, использованных в работе

Система CRISPR	#	Последовательность (5'–3')	PAM
SpCas9	1	GACTTCTAAGATCAGGAGAG	AGG
	2	CCAATCCCTAGACAGAGCAC	TGG
	3	GTGTATGAAACTAATCTGTC	TGG
SaCas9	1	ACTTCTAAGATCAGGAGAGA	GGAAT
	2	GCCAGTGTCTGTCTAGGGA	TTGGAT
Cpf1	1	ATGAGTCATCGGACTTCTAAGAT	TTTC
	2	TGGTGTATGAAACTAATCTGTCT	TTTG
	3	ATACACCACAAATCGAGGCTGTA	TTTC

мента BstXI–EcoRI в pAsCpf1(TYCV)(BB) (pY211) («Addgene», #89352) [23] на фрагмент BstXI–EcoRI из плазмиды pY010 (pcDNA3.1-hAsCpf1) («Addgene», #69982) [10].

Подбор нРНК осуществляли с использованием онлайн-программы Cas-Designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) [24]. Последовательности протоспейсеров представлены в табл. 2.

Культивирование ЭСК крысы. Используемые в данной работе ЭСК крысы были получены и охарактеризованы ранее [17]. ЭСК культивировали на слое митотически инактивированных

фибробластов мыши в культуральной среде advanced N2B27, состоящей из смеси среды Neurobasal с добавкой B-27 и advanced DMEM/F-12 с добавкой N-2 в пропорции 1/1, кроме того в состав среды входит GlutaMAX, 5000 ЕД./мл смеси пенициллин/стрептомицин, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1000 ЕД./мл LIF мыши, 1 мкМ PD0325901, 3 мкМ SHIR99021. Культуральные среды и добавки произведены в компании «Gibco» США, фактор, ингибирующий лейкемию мыши (LIF), PD0325901 и SHIR99021 – в компании «StemRD», США. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂ при 90% влажности. Рекомбинацию между loxP-сайтами индуцировали путём добавления 4-ОНТ («Sigma-Aldrich», США) в культуральную среду в концентрации 0,1 мкМ.

Электропорация ЭСК крысы. Клетки пассировали за 24 ч до электропорации и добавляли в культуральную среду ингибитор Rho-киназы Y-27632 («Abcam», Великобритания) в концентрации 5 мкМ. На следующий день ЭСК крысы дезагрегировали до одноклеточного состояния и промывали дважды PBS («Биолот», Россия). 4 × 10⁵ клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера R (Invitrogen), США с добавлением плазмидной ДНК и электропорировали с использованием прибора Neon Transfection System («Invitrogen», США). После электропорации ЭСК высаживали в новую ячейку с предварительно подогретой до 37 °С средой advanced N2B27 с добавлением 5 мкМ Y-27632 и не содержащей антибиотиков. На следующие сутки производили смену культуральной среды на advanced N2B27 без Y-27632 и с добавлением антибиотиков.

Для анализа активности различных CRISPR/Cas-систем мы электропорировали клетки 10 мкг плазмидной ДНК в молярном соотношении 1 : 1. Для интеграции трансгена мы использовали 4 мкг плазмиды, кодирующей nРНК, 6 мкг плазмиды, кодирующей Cpf1, и 3 мкг лиnearизованного донорного вектора.

Селекция ЭСК крысы на среде с антибиотиком. На третьи сутки после электропорации с донорным вектором и плазмидами системы CRISPR/Cpf1 ЭСК крысы пересаживали в клональной плотности на слой митотически-инактивированных фибробластов мыши линии DR4. В культуральную среду добавляли антибиотик G418 («Gibco», США) в концентрации 250 мкг/мл. Селекцию проводили в течение 7 дней. На восьмой день выжившие колонии механически пересаживали в отдельные лунки 48-луночного планшета и размножали для дальнейшего анализа и криоконсервации.

Выделение ДНК из ЭСК крысы и ПЦР-анализ. Выделение ДНК осуществляли с использо-

ванием реагента QuickExtract DNA Extraction Solution («Lucigen», США) по протоколу производителя. Полученный лизат разбавляли в 6 раз и использовали 3,5 мкл в реакции ПЦР. ПЦР проводили с помощью набора BioMaster HS-Taq ПЦР-Color («Биолабмикс», Россия) на амплификаторе T100 («Bio-Rad», США). Используемые в работе праймеры для ПЦР представлены в табл. 1.

Вестерн-блот-анализ. Клетки дезагрегировали, промывали дважды в PBS и лизировали в буфере RIPA (150 мМ NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% додецилсульфат натрия, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, ингибиторы протеаз («Roche», Германия)) в течение 30 мин при 4 °С и постоянном перемешивании. Лизаты центрифугировали при 13 500 g в течение 20 мин при 4 °С. Белки разделяли в денатурирующем 7%-ном полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad»). Мембрану блокировали в TBS (50 мМ Tris-HCl pH 7,6, 150 мМ NaCl), содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 и 5% обезжиренного сухого молока («Cell Signaling Technology», США), затем инкубировали с антителами к Cre-рекомбиназе (кроличьи IgG, «Cell Signaling Technology», США, #12830, 1 : 1000) и к GAPDH (кроличьи IgG, «Cell Signaling Technology», США, #2118, 1 : 1000). Для детекции белков использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Jackson ImmunoResearch», Великобритания, #111-035-144, 1 : 40 000), и набор Clarity Max Western ECL Substrate («Bio-Rad»).

Спонтанная дифференцировка *in vitro* и иммунофлуоресцентное окрашивание. Спонтанную дифференцировку ЭСК крысы проводили в монослое по описанному ранее протоколу [17]. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на 21 день дифференцировки по протоколу, описанному ранее [25]. Для иммуноокрашивания использовали первичные антитела против TUBB3 (мышинные IgG, «BioLegend», США, #801201, 1 : 500), KRT18 (мышинные IgG, «Abcam», Великобритания, #ab668, 1 : 100), aSMA (мышинные IgG, «Dako», США, #M0851, 1 : 100) и вторичные антитела Goat anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific», США, #A11029, 1 : 400), Goat anti-Mouse IgG2a Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 («Thermo Fisher Scientific», #A21134, 1 : 400). Для окрашивания ядер использовали 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, «Sigma-Aldrich»). Окрашенные клетки анализировали с использованием микроскопа Eclipse Ti-E («Nikon», Япония).

Выделение РНК, синтез кДНК и анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР. РНК из кле-

ток выделяли с помощью реагента TRIzol («Invitrogen») и затем использовали в реакции синтеза кДНК по методу обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы SuperScript III («Invitrogen») и Random Hexamer Primer («Thermo Scientific», США). Уровень экспрессии определяли по методу полуколичественной ПЦР в реальном времени с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс») на приборе LightCycler 480 System («Roche»). Анализ уровня экспрессии проводили в трёх независимых повторах.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии проводили на приборе FACSAria III («Becton Dickinson», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Активность различных CRISPR/Cas систем в локусе *Rosa26* крысы. В настоящей работе мы решили протестировать три CRISPR-системы (SpCas9, SaCas9 и Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. BV3L6) для внесения двуцепочечных разрывов в локус *Rosa26* крысы. Для систем CRISPR/SpCas9 и CRISPR/Cpf1 было подобрано по три нРНК, а для системы CRISPR/SaCas9 – две нРНК в первом интроне *Rosa26* (рис. 1, а, табл. 2). Выбранные нРНК клонировали в соответствующие плазмиды. Плазмиды доставляли в ЭСК крысы методом электропорации. Через 48 ч после электропорации из клеток вы-

деляли геномную ДНК, амплифицировали целевые участки с использованием пары праймеров, фланкирующих места внесения разрывов (пара F2 и R2 в табл. 1), и секвенировали ПЦР продукты по методу Сэнгера. Процент инсерций/делетий, образующихся в результате репарации двуцепочечных разрывов ДНК и свидетельствующий о примерной эффективности CRISPR-системы с конкретной нРНК, оценивали с использованием онлайн программы TIDE (<https://tide.nki.nl/>) [26]. Процент инсерций/делетий, генерируемый исследуемыми CRISPR-системами с выбранными нРНК, составил примерно от 30 до 60% (рис. 1, б). При этом наибольшую эффективность внесения разрывов в целевом участке ДНК показали системы CRISPR/SaCas9 с нРНК #1 и CRISPR/Cpf1 с нРНК #1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные CRISPR-системы с выбранными нРНК могут быть использованы для интеграции трансгенов в первый интрон *Rosa26* в ЭСК крысы. Ранее в ряде исследований было показано, что Cpf1 демонстрирует низкую нецелевую активность по сравнению с Cas9 [27, 28]. На основании этого мы выбрали Cpf1 с нРНК #1 для дальнейших экспериментов по внесению трансгена в локус *Rosa26* крысы.

Получение ЭСК крысы, экспрессирующих тамоксифен-индуцируемую Cre-рекомбиназу. Для интеграции CreERT2 в локус *Rosa26* крысы мы создали плазмидный донорный вектор, несущий сайт сплайсинга аденовируса, ген устойчивости к неомицину и CreERT2. Данные элемен-

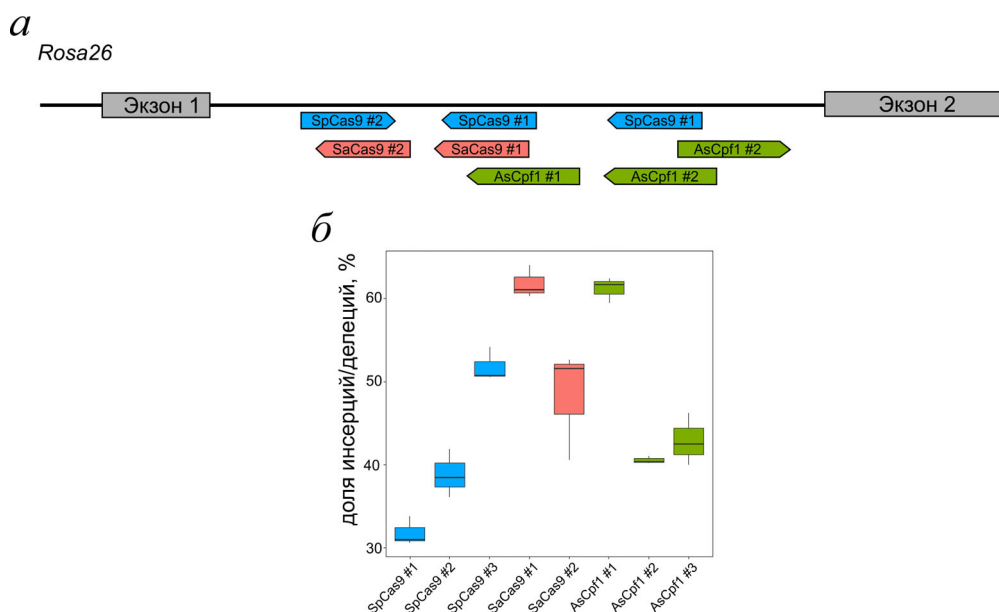


Рис. 1. а – Схема расположения выбранных протоспейсеров в локусе *Rosa26*; б – результаты анализа доли инсерций/делетий, полученных при действии CRISPR/Cas-систем с выбранными протоспейсерами. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

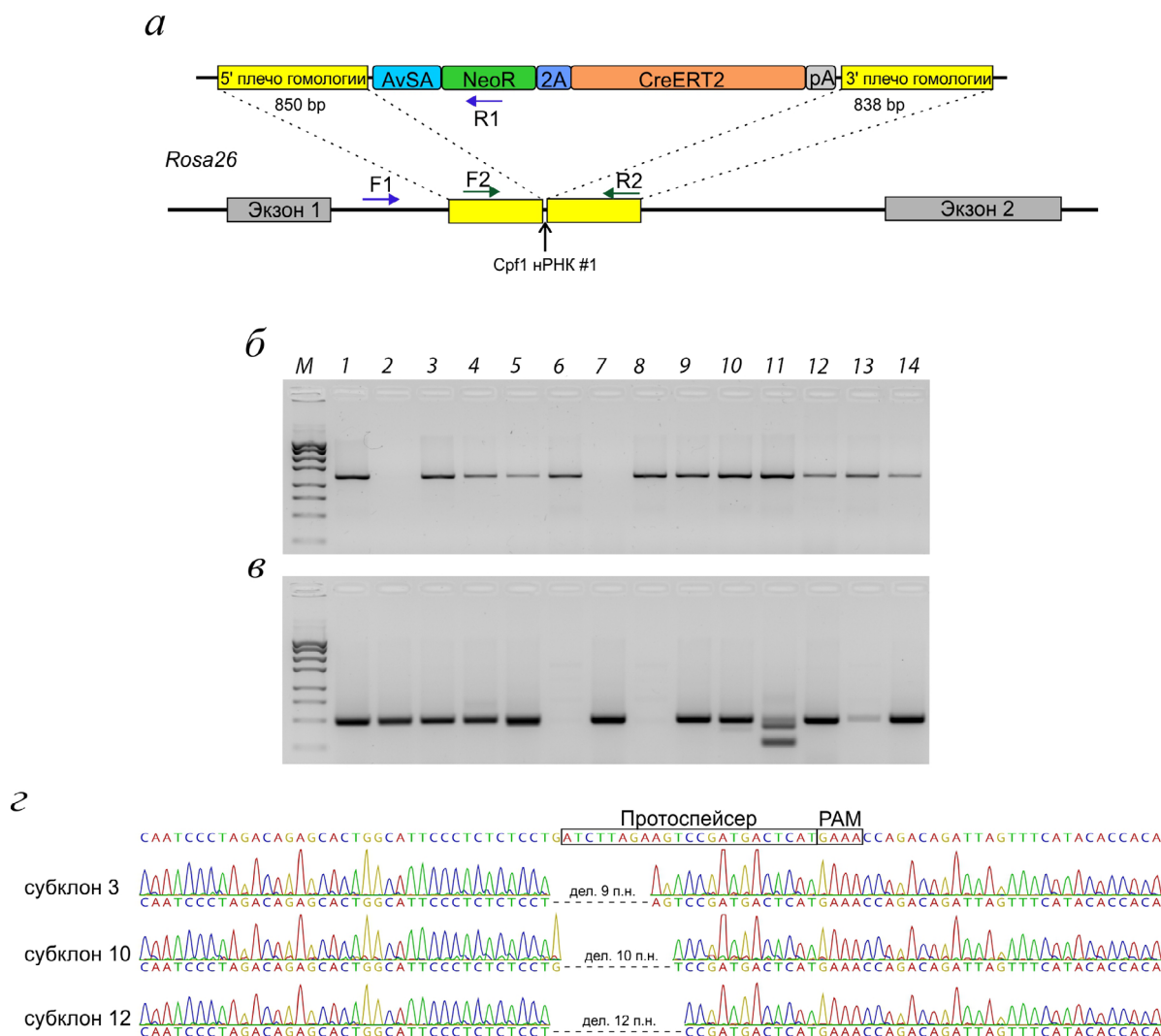


Рис. 2. *а* – Схема гомологичной рекомбинации в локусе *Rosa26*; *б* – результаты ПЦР-анализа субклонов на наличие целевой встройки трансгена в локус *Rosa26*; *М* – маркер молекулярного веса ДНК Start 250 («Биолабмикс»), *1–14* – полученные субклоны; *в* – результаты ПЦР-анализа субклонов с использованием пары праймеров, фланкирующих протоспейсер, отсутствие ПЦР-продукта свидетельствует о встройке трансгена в оба аллеля; *г* – результаты секвенирования второго аллеля *Rosa26* в трёх полученных субклонах

ты были фланкированы плечами гомологии (~800 п.н.) к первому интрону *Rosa26* (рис. 2, *а*).

ЭСК крысы (линия dB50) [17] были электропорированы линейаризованным донорным вектором и плазмидами, экспрессирующими Srf1 и нРНК #1. Через 24 ч после электропорации начали селекцию клеток на среде с антибиотиком G418, и проводили ее в течение 7 дней. В результате селекции было получено 14 субклонов ЭСК, которые затем были механически пересажены в отдельные лунки культуральной планшета и размножены. Полученные субклоны были проанализированы на наличие встройки трансгена с помощью ПЦР с парой праймеров F1 и R1, в результате анализа было показано, что 12 из них содержат целевую встрой-

ку (рис. 2, *б*). Для проверки, произошла ли встройка трансгена в один или два аллеля *Rosa26*, провели ПЦР-анализ с парой праймеров F2 и R2, фланкирующих сайт внесения двуцепочечного разрыва (рис. 2, *в*). В результате было выявлено два субклона (6 и 8), несущих встройку трансгена в оба аллеля. Секвенирование второго аллеля *Rosa26* в субклонах со встройкой только в одном аллеле показало, что в данных субклонах в районе протоспейсера содержатся короткие делеции (рис. 2, *г*).

Все полученные трансгенные субклоны ЭСК крысы сохранили морфологию, характерную для данного типа клеток (рис. 3, *а*). Далее мы выбрали три субклона, два из которых несли встройку в оба аллеля, для подтверждения того, что дан-

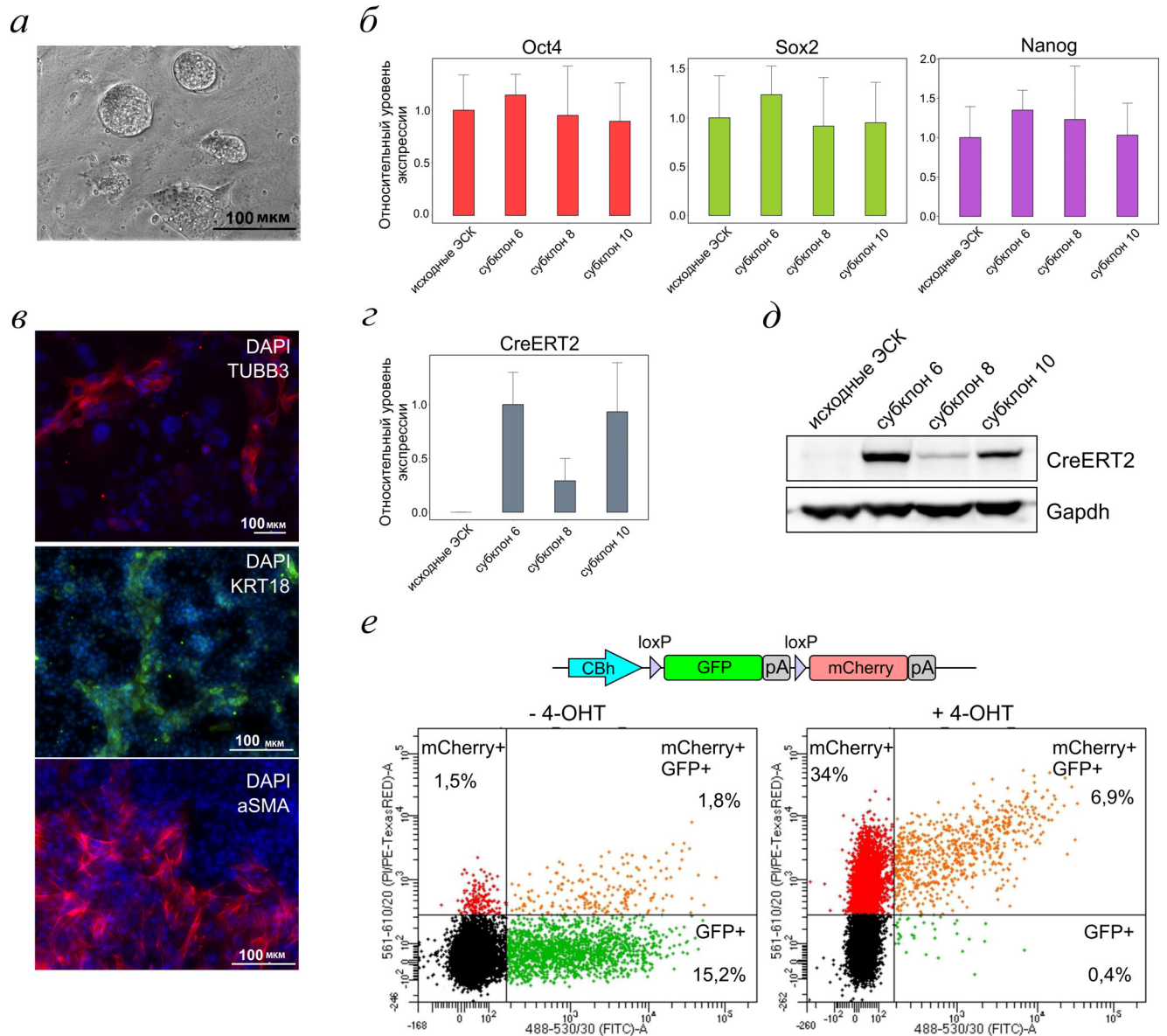


Рис. 3. Характеристика полученных трансгенных ЭСК крысы. *а* – Морфология колоний; *б* – относительный уровень экспрессии основных маркёров плюрипотентности в сравнении с исходной линией ЭСК, «усы» обозначают стандартное отклонение; *в* – иммунофлуоресцентное окрашивание производных, полученных при спонтанной дифференцировке *in vitro*, с использованием антител к маркёрам эктодермы (β -тубулин III, TUBB3), энтодермы (цитокератин-18, KRT18) и мезодермы (альфа-гладкомышечный актин, α SMA), ядра окрашены DAPI; *г* – относительный уровень экспрессии CreERT2 в полученных субклонах, нормирование на субклон 6, «усы» обозначают стандартное отклонение; *д* – результаты вестерн-блот-анализа с использованием антител против Cre-рекомбиназы и GAPDH в полученных субклонах; *е* – сверху – схема репортёрного вектора; снизу – результаты анализа на проточном цитофлуориметре трансгенных ЭСК, электропорированных репортёрным вектором без добавления и с добавлением 4-OHT

ные клетки сохранили плюрипотентные свойства, а также для анализа экспрессии трансгена. В результате было показано, что выбранные субклоны сохранили экспрессию основных маркёров плюрипотентности, а также способность образовывать производные всех трёх зародышевых листков при дифференцировке *in vitro* (рис. 3, *б*, *в*). С использованием методов ПЦР и вестерн-блоттинга была выявлена экспрессия

мРНК CreERT2 и наличие белка соответствующего размера (~75 кДа, рис. 3, *г*, *д*). При этом в субклоне 8 наблюдается сниженный уровень экспрессии мРНК CreERT2 и синтезируемого белка по сравнению с субклонами 6 и 10. Так как в случае Cre-рекомбиназы уровень экспрессии не влияет на функциональность трансгена, то можно заключить, что получено три субклона ЭСК крысы, экспрессирующих CreERT2.

Для того, чтобы подтвердить функциональность CreERT2 и его зависимость от тамоксифена в полученных субклонах ЭСК крысы, мы создали репортёрную конструкцию на основе плазмиды pTE4560 путём клонирования зелёного флуоресцентного белка (GFP) с сайтом полиадезилации фланкированными loxP-сайтами между CBh-промотором и геном *mCherry*. Фрагмент для клонирования был получен путём рестрикции плазмиды p212 pCMV-EGFP/RFP («Addgene», #8389) [29] по сайтам KpnI. Полученную репортёрную плазмиду электропорировали в трансгенные ЭСК без добавления и с добавлением 4-ОНТ в культуральную среду. В результате анализа на проточном цитофлуориметре было показано, что добавление 4-ОНТ приводит к индукции рекомбинации между loxP-сайтами и активации экспрессии *mCherry* (рис. 3, e).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенной нами работы были получены ЭСК крысы, экспрессирующие тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу с использованием системы CRISPR/Cpf1. Полученные трансгенные клетки сохранили экспрессию основных маркёров плюрипотентности и способность дифференцироваться в производные всех трёх зародышевых листков. Зависимость Cre-рекомбиназы от тамоксифена была продемонстрирована с использованием репортёрного плазмидного вектора. В настоящее время проводится мало исследований на ЭСК крысы, несмотря на широкое применение данного животного в качестве модельного объекта в различных областях биологии. В связи с этим применение новых систем редактирования генома и получение новых трансгенных линий ЭСК крысы позволит расширить инструментарий для будущих исследований. Известно, что культивирование ЭСК крысы осложнено из-за их тенденции к спонтанной дифференцировке, особенно при низкой плотности клеток в культуре, которая необходима для получения субклонов при трансгенезе [30]. В данной работе мы подтвердили, что условия культивирования, опубликованные ранее и включающие применение advanced DMEM/F-12, а также добавление ингибитора Rho-киназы при электропорации, способствуют отбору субклонов после геномного редактирования [11].

Использование различных CRISPR-систем расширяет возможности для редактирования геномов. Нами было показано, что для встройки трансгенов в локус *Rosa26* крысы можно также использовать систему CRISPR/Cpf1 с высокой

эффективностью. Интеграция трансгена классическим способом без использования систем редактирования генома требует длинных плеч гомологии и даже после селекции на среде с антибиотиком имеет низкую эффективность [31, 32]. При этом в некоторых случаях исследователям не удавалось получить трансгенные ЭСК крысы без использования системы CRISPR/Cas9 [14]. В нашей работе мы использовали плечи гомологии ~800 п.н., селекцию на среде с антибиотиком, систему CRISPR/Cpf1, и в результате доля субклонов ЭСК с корректной целевой встройкой трансгена составила 85%. Около 14% от всего количества субклонов несли биаллельную встройку трансгена. Высокая эффективность внесения двуцепочечных разрывов с использованием Cpf1 привела также к тому, что в тех субклонах, которые несли моноаллельную встройку трансгена, второй аллель содержал короткие делеции, затрагивающие последовательность протоспейсера. Таким образом, в случае необходимости интеграции разных трансгенов в один локус лучше использовать стратегию одновременной встройки.

Важным моментом при использовании систем редактирования генома является возможность внесения нецелевых разрывов в ДНК. При подборе протоспейсеров мы учитывали предсказанные нецелевые эффекты и выбирали те, которые имеют наименьшее количество потенциальных нецелевых эффектов. В ряде работ на клетках человека уровень нецелевых эффектов был значительно ниже при использовании Cpf1 по сравнению с Cas9, что является существенным преимуществом при выборе CRISPR-системы [27, 28, 33, 34].

В настоящее время существует несколько подходов для получения индуцируемого нокаута. Часть из них основана на применении CRISPR/SpCas9-системы. Так, например, платформа iCRISPR основана на доксициклин-индуцируемой экспрессии Cas9, что требует интеграции двух трансгенов в геном клеток и последующей доставки нРНК [35]. При данном подходе получается неоднородная популяция клеток, только часть из которых несёт нокаут целевого гена. Доля таких клеток зависит от эффективности доставки нРНК, активности самой нРНК и доли мутаций со сдвигом рамки считывания. Эффективность нокаута можно увеличить за счёт использования нескольких нРНК [36]. Тем не менее применение iCRISPR-платформы для нокаута жизненно важных генов и в ходе дифференцировки клеток является затруднительным.

Система CreERT2/loxP широко используется для получения индуцируемого нокаута *in vivo* и *in vitro* [37, 38]. Применение CreERT2/loxP-

системы также позволяет провести нокаут во всех клетках в культуре, кроме того, с использованием данной системы можно проводить нокаут кластеров микроРНК, длинных некодирующих РНК и удалять регуляторные участки генома. Однако применение данной системы требует нескольких раундов трансгенеза клеток. В данной работе нами был пройден только первый этап. Далее требуется провести интеграцию loxP-сайтов для фланкирования целевых генов. Встройка loxP-сайтов может быть осуществлена с использованием плазмид или олигонуклеотидов в качестве донорной ДНК. Использование плазмид в качестве донорной ДНК может привести к нецелевой встройке в случайном районе генома, кроме того, конструирование донорного вектора может занять длительное время, особенно если требуется провести нокаут протяженного кластера микроРНК. Использование длинных олигонуклеотидов осложняется отсутствием селективного маркера, что в результате может привести к долгому поиску клонов с биаллельной встройкой. В одной из работ авторам удалось повысить эффективность встройки за счёт селекции клеток, в которых активно идёт процесс гомологичной рекомбинации [37]. В результате было показано, что биаллельная встройка двух loxP-сайтов может быть осуществлена за один раунд трансгенеза. Таким образом, адаптация подходов для получения корот-

ких встроек в геном ЭСК крысы является предметом дальнейших исследований.

В заключение, мы использовали систему редактирования генома CRISPR/Cpf1 для получения трансгенных ЭСК крысы, экспрессирующих тамоксифен-индуцируемую Cre-рекомбиназу. Полученные клетки представляют собой платформу для дальнейших исследований как в области редактирования генома, так и для изучения функций генов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-00022).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Шевченко Александру Игоревичу и Захаровой Ирине Сергеевне за помощь в спонтанной дифференцировке и иммунофлуоресцентном окрашивании, Медведеву Сергею Петровичу за сборку плазмиды pAsCpf1-2NLS, а также ЦКП «Геномика» СО РАН за анализ реакций секвенирования по Сэнгеру.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154-156.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634-7638, doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Smith, J. R., Bolton, E. R., and Dwinell, M. R. (2019) The rat: a model used in biomedical research, *Methods Mol. Biol.*, **2018**, 1-41, doi: 10.1007/978-1-4939-9581-3_1.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., et al. (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts, *Cell*, **135**, 1287-1298, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.007.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., et al. (2008) Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts, *Cell*, **135**, 1299-1310, doi: 10.1016/j.cell.2008.12.006.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821, doi: 10.1126/science.1225829.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 752-757, doi: 10.1006/bbrc.1997.7124.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., et al. (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67-83, doi: 10.1038/s41579-019-0299-x.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., et al. (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9, *Nature*, **520**, 186-191, doi: 10.1038/nature14299.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., et al. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system, *Cell*, **163**, 759-771, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- Chen, Y., Spitzer, S., Agathou, S., Karadottir, R. T., and Smith, A. (2017) Gene editing in rat embryonic stem cells to produce *in vitro* models and *in vivo* reporters, *Stem Cell Rep.*, **9**, 1262-1274, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.09.005.
- Kobayashi, T., Kobayashi, H., Goto, T., Takashima, T., Oikawa, M., et al. (2020) Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14, *Development*, **147**, doi: 10.1242/dev.183798.
- Li, W., Li, X., Li, T., Jiang, M. G., Wan, H., Luo, G. Z., et al. (2014) Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **14**, 404-414, doi: 10.1016/j.stem.2013.11.016.
- Yamamoto, S., Ooshima, Y., Nakata, M., Yano, T., Nishimura, N., et al. (2015) Efficient gene-targeting in rat embryonic stem cells by CRISPR/Cas and generation of human kynurenine aminotransferase II (KAT II) knock-in rat, *Transgen. Res.*, **24**, 991-1001, doi: 10.1007/s11248-015-9909-1.
- Sherstyuk, V. V., Medvedev, S. P., Elisaphenko, E. A., Vaskova, E. A., Ri, M. T., et al. (2017) Genome-wide profiling and differential expression of microRNA in rat pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, **7**, 2787, doi: 10.1038/s41598-017-02632-0.

16. Sherstyuk, V. V., Yanshole, L. V., Zelentsova, E. A., Melnikov, A. D., Medvedev, S. P., et al. (2020) Comparative metabolomic profiling of rat embryonic and induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rev. Rep.*, **16**, 1256-1265, doi: 10.1007/s12015-020-10052-3.
17. Vaskova, E. A., Medvedev, S. P., Sorokina, A. E., Nemudryy, A. A., Elisaphenko, E. A., et al. (2015) Transcriptome characteristics and X-chromosome inactivation status in cultured rat pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **24**, 2912-2924, doi: 10.1089/scd.2015.0204.
18. Sladitschek, H. L., and Neveu, P. A. (2015) MXS-chaining: a highly efficient cloning platform for imaging and flow cytometry approaches in mammalian systems, *PLoS One*, **10**, e0124958, doi: 10.1371/journal.pone.0124958.
19. DeKolver, R. C., Choi, V. M., Moehle, E. A., Paschon, D. E., Hockemeyer, D., et al. (2010) Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome, *Genome Res.*, **20**, 1133-1142, doi: 10.1101/gr.106773.110.
20. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823, doi: 10.1126/science.1231143.
21. Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., et al. (2015) *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 102-106, doi: 10.1038/nbt.3055.
22. Toth, E., Czene, B. C., Kulcsar, P. I., Krausz, S. L., Talas, A., et al. (2018) Mb- and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 10272-10285, doi: 10.1093/nar/gky815.
23. Gao, L., Cox, D. B. T., Yan, W. X., Manteiga, J. C., Schneider, M. W., et al. (2017) Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 789-792, doi: 10.1038/nbt.3900.
24. Park, J., Bae, S., and Kim, J. S. (2015) Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites, *Bioinformatics*, **31**, 4014-4016, doi: 10.1093/bioinformatics/btv537.
25. Vaskova, E. A., Demytyeva, E. V., Shevchenko, A. I., Pavlova, S. V., Grigor'eva, E. V., et al. (2014) Dynamics of the two heterochromatin types during imprinted X chromosome inactivation in vole *Microtus levis*, *PLoS One*, **9**, e88256, doi: 10.1371/journal.pone.0088256.
26. Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e168, doi: 10.1093/nar/gku936.
27. Kim, D., Kim, J., Hur, J. K., Been, K. W., Yoon, S. H., and Kim, J. S. (2016) Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 863-868, doi: 10.1038/nbt.3609.
28. Kleinstiver, B. P., Tsai, S. Q., Prew, M. S., Nguyen, N. T., Welch, M. M., et al. (2016) Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **34**, 869-874, doi: 10.1038/nbt.3620.
29. Kaczmarczyk, S. J., and Green, J. E. (2001) A single vector containing modified Cre recombinase and LOX recombination sequences for inducible tissue-specific amplification of gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **29**, E56-56, doi: 10.1093/nar/29.12.e56.
30. Blair, K., Leitch, H. G., Mansfield, W., Dumeau, C. E., Humphreys, P., and Smith, A. G. (2012) Culture parameters for stable expansion, genetic modification and germline transmission of rat pluripotent stem cells, *Biol. Open*, **1**, 58-65, doi: 10.1242/bio.2011029.
31. Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Yamaguchi, T., Tamura, C., Sanbo, M., et al. (2012) Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato, *Stem Cells Dev.*, **21**, 2981-2986, doi: 10.1089/scd.2012.0065.
32. Tong, C., Li, P., Wu, N. L., Yan, Y., and Ying, Q. L. (2010) Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells, *Nature*, **467**, 211-213, doi: 10.1038/nature09368.
33. Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., et al. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 822-826, doi: 10.1038/nbt.2623.
34. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., and Liu, D. R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 839-843, doi: 10.1038/nbt.2673.
35. Gonzalez, F., Zhu, Z., Shi, Z. D., Lelli, K., Verma, N., et al. (2014) An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **15**, 215-226, doi: 10.1016/j.stem.2014.05.018.
36. Wu, M., Liu, S., Gao, Y., Bai, H., Machairaki, V., et al. (2018) Conditional gene knockout and reconstitution in human iPSCs with an inducible Cas9 system, *Stem Cell Res.*, **29**, 6-14, doi: 10.1016/j.scr.2018.03.003.
37. Flemr, M., and Buhler, M. (2015) Single-step generation of conditional knockout mouse embryonic stem cells, *Cell Rep.*, **12**, 709-716, doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.051.
38. Friedel, R. H., Wurst, W., Wefers, B., and Kuhn, R. (2011) Generating conditional knockout mice, *Methods Mol. Biol.*, **693**, 205-231, doi: 10.1007/978-1-60761-974-1_12.

GENERATION OF TRANSGENIC RAT EMBRYONIC STEM CELLS USING THE CRISPR/Cpf1 SYSTEM FOR INDUCIBLE GENE KNOCKOUT

V. V. Sherstyuk* and S. M. Zakian

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: svv@bionet.nsc.ru

Rat embryonic stem cells (ESCs) play an important role in the studies of genes involved in maintaining of pluripotent state and early development of this model organism. To study functions of the essential genes, as well as the processes of cell differentiation, the method of induced knockout is widely used. The CreERT2/loxP system allows obtaining an inducible knockout in cells expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreERT2) and containing loxP sites flanking the target gene by adding 4-hydroxy tamoxifen to the culture medium. However, the rat ESC lines expressing CreERT2 are absent. In this work, we tested three CRISPR/Cas systems for introduction of double-strand breaks into the *Rosa26* locus in the rat ESCs and inserted tamoxifen-dependent Cre recombinase into this locus using the CRISPR/Cpf1 system. It was shown that the obtained transgenic rat ESC lines retained the characteristics of pluripotent cells. Tamoxifen-inducible Cre recombinase activity was analyzed using a reporter vector.

Keywords: embryonic stem cells, rat, CRISPR/Cas, genome editing, Cre recombinase