

НОКАУТ ГЕНОВ *VAX*, *BAK1* И ИЗБЫТОЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ *BCL2*, *BECN1* УВЕЛИЧИВАЮТ ВРЕМЯ ЖИЗНИ И МАКСИМАЛЬНУЮ ПЛОТНОСТЬ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СНО-S

© 2022 г. С. В. Ковнир¹, Л. К. Даянова^{1, 2}, Е. А. Гаямова¹,
Л. Н. Дыбовский¹, И. И. Воробьев^{1, 2}, Н. А. Орлова¹ *

¹Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина Федерального исследовательского центра
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: nobiol@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принята к публикации 14.07.2022 г.

При помощи двух операций геномного редактирования получена линия клеток СНО-4BGD с гомозиготными нокаутами генов *BAK1*, *VAX*, *DHFR*, *GLUL* и оверэкспрессией генов *BCL2*, *BECN1*. Данная линия способна к длительному росту без замены культуральной среды и обладает увеличенной в 5 раз интегральной клеточной плотностью по сравнению с родительской клеточной линией при том же режиме культивирования. Оверэкспрессия пары генов *BCL2*, *BECN1* приводит к достоверному увеличению клеточной плотности на 6–10 сутки культивирования по сравнению с линией клеток с нокаутами генов *BAK1*, *VAX*, *DHFR*, *GLUL*, интегральная клеточная плотность при этом возрастает на 34%.

Ключевые слова: генетическое редактирование, проапоптотические факторы, антиапоптотические факторы

DOI: 10.56304/S0234275822040081

Линия клеток СНО (Chinese hamster ovary) широко используется в качестве продуцента терапевтически значимых белков. Редактирование генома клеток и оверэкспрессия генов домашнего хозяйства позволяет улучшить их ростовые показатели, в частности способность к длительной культивации. Одновременное (мультиплексное) редактирование нескольких генов позволяет получить целевые клоны клеток за меньшее число шагов редактирования-клонирования, снижая вероятность нецелевых событий редактирования генома.

Культивируемые клетки млекопитающих, в отличие от настоящих одноклеточных микроорганизмов, подвержены контактному торможению клеточного деления [1] и вступают в программируемую клеточную смерть, вызываемую дефицитом нутриентов и накоплением катаболитов задолго до критического ухудшения условий среды [2]. Подавление индукции или прохождения апопто-

за у клеток позволяет существенно увеличить максимальную клеточную плотность в культуре и как минимум на несколько дней увеличить срок культивации без замены среды. Наиболее популярными мишенями для антиапоптотической инженерии клеток являются проапоптотические факторы *Bak-1*, *Vax*, *Bok* [3], антиапоптотические факторы *Bcl-2* [4], *Mcl-1* и *Bcl-xL* [5], каспаза-7 [6], каспаза-3 [7], шапероны *HSP27* и *HSP70* [8], протеинкиназа *B (Akt)* [9], белки *Aven*, *XIAP*, *CrmA* [10].

Как правило, в условиях внешнего стресса в клетках индуцируются два взаимно конкурирующих, но не противоположных процесса: апоптоз, приводящий к клеточной смерти, и макроаутофагия, развивающаяся как выживание за счет утилизации части органелл и содержимого цитоплазмы [11] (рис. 1а). По мере ухудшения условий, например падения концентрации незаменимых аминокислот в среде, процесс аутофагии переходит в апоптоз либо в контролируемый некроз клетки [12]. На молекулярном уровне переход от аутофагии к апоптозу реализуется как участие части белков контроля аутофагии в индукции и прохождении апоптоза [13].

Список сокращений: *Bak-1* (*Bcl-2* antagonist/killer 1) – антагонист белка *Bcl-2*; *Vax* (*Bcl-2* associated X) – ассоциированный с *Bcl-2* фактор X; СНО (Chinese hamster ovary) – клетки яичника китайского хомячка; гРНК – РНК-гид; ОРС – открытая рамка считывания; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

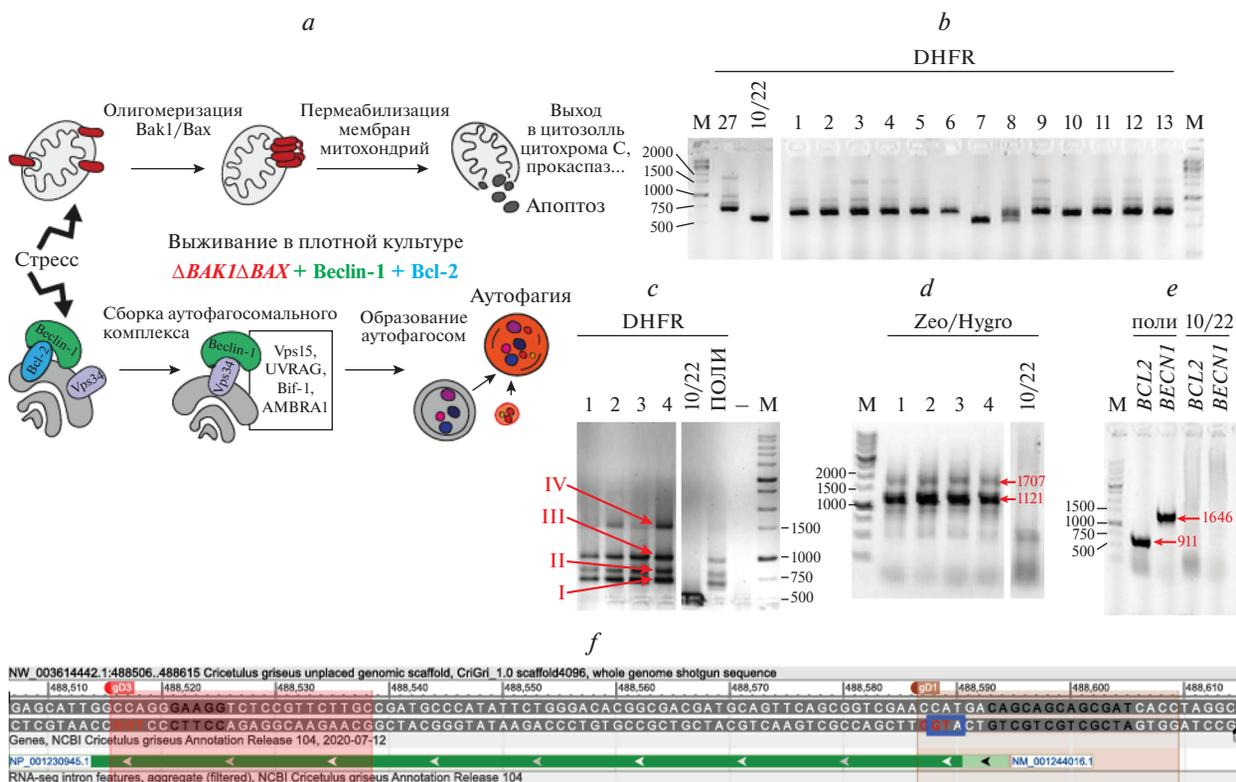


Рис. 1. Схема индукции апоптоза и аутофагии, результаты редактирования генома и инсерции в геном клеток генетических конструкций. *a* – Схема участия генов-мишеней геномного редактирования в индукции апоптоза и аутофагии. *b* – Электрофореграмма продуктов ПЦР для ампликона гена дигидрофолатредуктазы (*DHFR*), короткая элонгация. Обозначения: М – маркер, 1–13, 27 – номера клональных линий клеток, 10/22 – родительская линия клеток. *c* – Электрофореграмма продуктов ПЦР для ампликона *DHFR*, длинная элонгация. ПОЛИ – поликлональная популяция клеток, прошедших редактирование генома и селекцию, номера вариантов продуктов ПЦР обозначены красным цветом. *d* – Электрофореграмма продуктов ПЦР, ампликоны селекционных маркеров Zeo и Hygro; ожидаемые размеры ампликонов обозначены красным цветом. *e* – Электрофореграмма продуктов ПЦР, ампликоны границ открытой рамки считывания (ОРС) Bcl-2 (*BCL2*), Beclin-1 (*BECN1*) и промотора *EEF1A1*. *f* – Схема расположения участков узнавания D1 и D3 РНК-гидом (гРНК) на последовательности гена *DHFR*. Старт-кодон обозначен синей рамкой, PAM-сайты – красным шрифтом, участки узнавания гРНК – красными рамками, делеции – черным шрифтом; ОРС *DHFR* – темно-зеленый прямоугольник, мРНК *DHFR* – светло-зеленый прямоугольник. ОРС *DHFR* расположена на минус-цепи ДНК. Позиции в геноме приведены для сборки генома *Cricetulus griseus* CriGri_1.0.

Fig. 1. Scheme of apoptosis and autophagy induction, results of genome editing and insertion of plasmids into the genome of cells. *a* – Schematic representation of the involvement of gene editing target genes in the induction of apoptosis and autophagy. *b* – Agarose gel separation of PCR products for the *DHFR* amplicon, short elongation. Designations: M – marker, 1–13, 27 – numbers of clonal cell lines, 10/22 – parental cell line. *c* – Agarose gel separation of PCR products for the *DHFR* amplicon, long elongation. POLY is a polyclonal population of cells subjected to genome editing and selection, the number of PCR product variants is indicated in red. *d* – Separation of PCR products in agarose gel, amplicons of selection markers Zeo and Hygro, expected sizes of amplicons are indicated in red. *e* – Separation of PCR products in agarose gel, amplicons of Bcl-2 (*BCL2*), Beclin-1 (*BECN1*) ORF borders and *EEF1A1* promoter. *f* – Layout of guide RNA (gRNA) recognition sites D1 and D3 on the *DHFR* gene sequence, start codon is marked with a blue frame, PAM sites are marked with red font, gRNA recognition regions are marked with red frames, deletions are marked with black font, *DHFR* ORF is a dark green rectangle, mRNA *DHFR* is a pale green rectangle. The *DHFR* ORF is located on the negative strand of DNA. The positions in the genome are indicated for the assembly of the *Cricetulus griseus* CriGri_1.0 genome.

Процесс макроаутофагии можно описать как возникновение и рост двумембранных аутофагосом, окружающих часть содержимого цитоплазмы и другие мембранные органеллы клетки, слияние аутофагосом с лизосомами и последующую деградацию их содержимого [14]. Одним из основных факторов, интенсифицирующих рост аутофагосом, является Beclin-1 (ген *BECN1*), который в отсутствие клеточного стресса связан в комплекс

с Bcl-2 [15] на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР), а при падении концентрации свободного Bcl-2 или его модификациях формирует аутофagosомальный комплекс с PI3-киназой Vps34 и белками Vps15, UVRAG, Bif-1, AMBRA1. Этот комплекс обеспечивает нуклеацию аутофагосом [16]. В клетках опухолей человека гиперэкспрессия *BECN1* определенно приводит к ингибированию их роста [17], прямое влияние гиперэкспрессии

Таблица 1. Праймеры для клонирования генов *BCL2* и *BECN1***Table 1.** Primers for cloning of *BCL2* and *BECN1* genes

Праймер	Последовательность,* 5' → 3'
AD-Bcl2-AbsF	ACCTCGAGG CCCGCCACC <i>ATGG</i> CTCAAGCTGGGAGAA
AD-Bcl2-NheR	TGCTAGCTCACTGTGGAGAAGCGGA
AD-Bec-AbsF	ACCTCGAGG CCCGCCACC <i>ATGG</i> AGGGGTCTAAGGCG
AD-Bec-NheR	TGCTAGCTCACTTGTATAGA ACTGTGAG

* *Примечание:* Жирным шрифтом обозначены сайты рестрикции, жирным курсивом выделен старт-кодон, подчеркнуты последовательности Козак.

* *Note:* Restriction sites are marked in bold, start codons are in bold italics, Kozak sequences are underlined.

BECN1 без его ингибитора Bcl-2 на скорость деления и устойчивость к индукции апоптоза в клетках CHO на настоящий момент не изучены.

В задачи представленной работы входило получение клеток CHO, защищенных от апоптоза при голодании или ЭР-стрессе, реагирующих на стресс индукцией макроаутофагии и не содержащих активных аллелей генов метаболических селекционных маркеров: дигидрофолатредуктазы (DHFR) и глутаминсинтетазы (GS).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение плазмид pKS-gD3 и pX459DU6, кодирующих гид-РНК (гРНК) к *DHFR* и spCas9, описано ранее [18]. Открытые рамки считывания (ОРС) Bcl-2 и Beclin-1 китайского хомячка получили методом ПЦР с кДНК клеток CHO-S (Invitrogen, США) с использованием праймеров, приведенных в табл. 1. Продукты ПЦР клонировали в T-вектор pAL2-T (ЗАО “Евроген”, Россия), секвенировали и переносили по сайтам *AbsI* и *AsuNHI* в векторные плазмиды p1.2-Hygro и p1.2-Zeo [19]. Использовали эндонуклеазы фирмы “Сибэнзим” (Новосибирск, Россия), смеси полимераз Encyclo и ScreenMix HS, T4 ДНК-лигазу и наборы Plasmid Miniprep Purification, PCR Clean-Up System производства ЗАО “Евроген”. Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии Российской академии наук (Москва, Россия).

Клетки линии 10/22 (*DHFR*^{+/-}*GLU*^{-/-}*BAK1*^{-/-}*BAH*^{-/-}) [18], культивируемые в суспензионном режиме в среде ProCHO5 (Lonza, Швейцария) с добавлением гипоксантина-тимидина (НТ; “ПанЭко”, Россия) и 4 мМ аланил-глутамин (“ПанЭко”), трансфицировали плазмидами pKS-gD1, pX459DU6, p1.2-Hygro-Beclin1 и p1.2-Zeo-Bcl-2 при помощи аппарата и набора Neon (Thermo Fischer Scientific, США) единичным импульсом 1.7 кВ, время разряда 20 мс. Использовали по 15 мкг каждой плазмиды и 10⁶ клеток. Культивировали 48 ч без смены среды, затем заменяли среду, понижали температуру до 32°C, вносили пуромицин до

конечной концентрации 14 мкг/мл и культивировали еще трое суток. После этого полностью заменяли среду и вносили гигромицин до конечной концентрации 500 мкг/мл и зеоцин – до 200 мкг/мл. Ввели селекцию до восстановления жизнеспособности клеток выше 95%. Клонировали в среде ExCell CHO (Sigma, США) с 8 мМ глутамин и 2× НТ при расчетной посевной дозе 2 клетки/лунка, эффективность клонирования – 36%. Растущие колонии пересеивали в 24-луночные планшеты в среду ProCHO5, а через 5 суток – в лунки 6-луночных планшетов, через 5 суток три отобранные активно делящиеся клональные линии переносили в колбы Эрленмейера объемом 125 мл и растили в 30 мл среды ProCHO5 до точной плотности более 10⁶ клеток/мл.

Геномную ДНК выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (ЗАО “Евроген”). Для подтверждения присутствия интегрированных генетических конструкций, кодирующих Beclin-1 и Bcl-2, с ожидаемыми размером продуктов 1646 п.н. и 911 п.н. соответственно, проводили ПЦР с праймерами к промоторной области экспрессионных плазмид SQ-5CH6-F [19] и обратных праймеров AD-Beclin1-NheR или AD-Bcl2-NheR (табл. 1). Кроме того, использовали пару праймеров AD-HYG-AscF и AD-HYG-AscR [19], позволяющих амплифицировать кассету устойчивости к гигромицину длиной 1707 п.н. плазмиды p1.2-Hygro и кассету устойчивости к зеоцину длиной 1121 п.н. плазмиды p1.2-Zeo. Для анализа состояния аллелей гена *DHFR* проводили ПЦР с геномной ДНК с использованием праймеров TA-DHFR-1v7-F (5'-GGGACCCTGTACACGTGTGCT-3') и TA-DHFR-1v7-R (5'-GCCTGGTG-GAGGCGGAGTCT-3'). Продукты ПЦР переосаждали этиловым спиртом или выделяли из геля и секвенировали с использованием тех же праймеров.

Продолжительное культивирование без смены среды проводили в среде ProCHO5 с 4 мМ глутамином, 2× НТ в колбах на 125 мл, посевная доза клеток – 3 × 10⁵ на 1 мл среды. Ежедневно отбирали образцы суспензии и дважды измеряли плотность клеток счетчиком Countess II (Thermo Fischer Scientific). Начиная с пятых суток культи-

вирования, ежедневно измеряли концентрацию глюкозы в среде глюкометром Accu-Chek Accutrend и штатными тест-полосками (Roche, Швейцария). Культивирование прекращали на следующий день после падения жизнеспособности клеток ниже 50%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы провели мультиплексное редактирование генов *DHFR*, *GLUL*, *BAK1*, *BAX* клеток сублинии CHO-S ферментом spCas9 и получили клональную линию 10/22 с гомозиготным нокаутом *GLUL*, *BAX*, *BAK1* и нокаутом одного аллеля *DHFR* [18]. Линия 10/22 содержала мутации в обоих аллелях гена *DHFR* в области гРНК D3 (рис. 1f): 5-нуклеотидную делецию со сдвигом ОРС в одном аллеле (аллель D3 – 5) и вставку триплета GAA, кодирующего Glu, во второй аллель (D3 + 3). Инсерция не привела к полной потере функции дигидрофолатредуктазы, ее ферментативная активность в лизате клеток 10/22 была всего в 5 раз ниже, чем в лизате клеток CHO-S. В связи с этим линию 10/22 подвергли повторному редактированию генома с помощью гРНК D1 к области стартового кодона *DHFR* (рис. 1f). Одновременно клетки 10/22 трансфицировали плазмидами, кодирующими Bcl-2 и Beclin-1 под контролем сильного конститутивного промотора фактора элонгации трансляции китайского хомячка EEF1A1. В результате трансфекции набором плазмид и селекции получили популяцию клеток, предположительно содержащих новые мутации в области *DHFR* и дополнительные гены *BECN1* и *BCL2*. Наличие в геноме клеток экспрессионных каскад с *BECN1* и *BCL2* подтверждали методом ПЦР (рис. 1e).

Методом предельных разведений получили 28 моноклональных линий. Для всех линий при ПЦР с праймерами к области генов устойчивости к зеоцину и гиромоцину получены двойные продукты амплификации с корректной длиной (рис. 1d для клонов 1–4; для остальных линий продукты ПЦР имели тот же размер и не приведены здесь). Для большинства клонов (23/28) обнаружено, что область начала ОРС *DHFR* содержит как минимум два варианта гена, значительно различающихся по размеру продуктов амплификации (рис. 1b), при этом оба аллеля давали продукты амплификации длиннее, чем исходный вариант гена. При увеличении времени элонгации ПЦР с 30 с до 1.5 мин для геномной ДНК из выбранного клона клеток № 4 получили четыре продукта амплификации сходной интенсивности (рис. 1c). Их секвенирование показало, что продукт I с наибольшей подвижностью соответствует аллелю D3 + 3 с делецией 13 п.н. перед стартовым кодом *DHFR* и инсерцией в этой точке 152 п.н. нерелевантной ДНК из генома *Escherichia coli* K-12 и плазмиды pX459ΔU6; продукт III соответствует аллелю D3 – 5 со вставкой

ДНК из генома *E. coli* K-12 длиной 339 п.н. перед стартовым кодом *DHFR*; продукты II и IV представляют собой гетеродуплексы из цепей ДНК продуктов I и III; в случае продукта IV качество распознавания нуклеотидов было низким, но начало и конец областей инсерции посторонней ДНК содержали нуклеотиды из инсерции в продуктах I и III. Таким образом, клон № 4 содержит два инактивированных аллеля гена *DHFR* с инсерциями ДНК непосредственно перед стартовым кодом. Для аллеля D3 + 3 эта вставка содержит три стартового кодона, первый из них не совпадает с рамкой считывания *DHFR*, а второй совпадает с рамкой считывания, но содержит стоп-кодон; таким образом, считывание полипептида *DHFR* для отредактированного аллеля оказывается крайне затруднительным. Ферментативная активность *DHFR*, измеренная как указано в работе [18], для лизата клеток клона № 4 также не обнаружена. Все 28 полученных клонов клеток содержали дополнительные копии *BCL2* и *BECN1* по данным ПЦР (продукты ПЦР для всех клонов совпадали с результатами, представленными на рис. 1e; данные не приведены).

Для дальнейшей работы отобрана клональная линия № 4, названная CHO-4BGD (*BAK1*^{-/-}*BAX*^{-/-}*BCL2*⁺*BECN1*⁺*GLUL*^{-/-}*DHFR*^{-/-}); время ее удвоения в суспензионной культуре было минимальным и составило 28.5 ч. Сходную скорость роста фиксировали для клонов 3 и 19; для остальных жизнеспособных клонов время деления было значительно больше.

Для линии CHO-4BGD, контрольной линии A11 [18] с генотипом *DHFR*^{-/-} и родительской линии 10/22 исследована способность к длительному росту без замены среды. В среде ProCHO5 время культивирования до падения жизнеспособности клеток ниже 50% составило 8 суток для линии A11, 15 – для 10/22 и 16 – для CHO-4BGD (рис. 2). Стоит отметить, что при этом интегральная плотность клеток (IVCD, integral viable cell density), то есть сумма значений клеточной плотности, измеренных 1 раз в день, составила $(15 \pm 1) \times 10^6$ клеток/мл для A11, $(58 \pm 2) \times 10^6$ клеток/мл для 10/22 и $(78 \pm 4) \times 10^6$ клеток/мл для CHO-4BGD. Таким образом, линия CHO-4BGD с гомозиготными нокаутами генов *BAK1*, *BAX*, *DHFR*, *GLUL* и дополнительными копиями генов *BCL2* и *BECN1* при продолжительном культивировании характеризуется увеличенной в 5.2 раза интегральной клеточной плотностью по сравнению с клетками CHO A11, прошедшими редактирование только гена *DHFR*. Интегральная клеточная плотность увеличилась на 34% по сравнению с клетками без дополнительных копий генов *BCL2* и *BECN1*. Статистически достоверное увеличение клеточной плотности линии CHO-4BGD по сравнению с 10/22 зафиксировано для 6–10 суток культивирования ($p < 0.05$, критерий Стьюдента), в дальней-

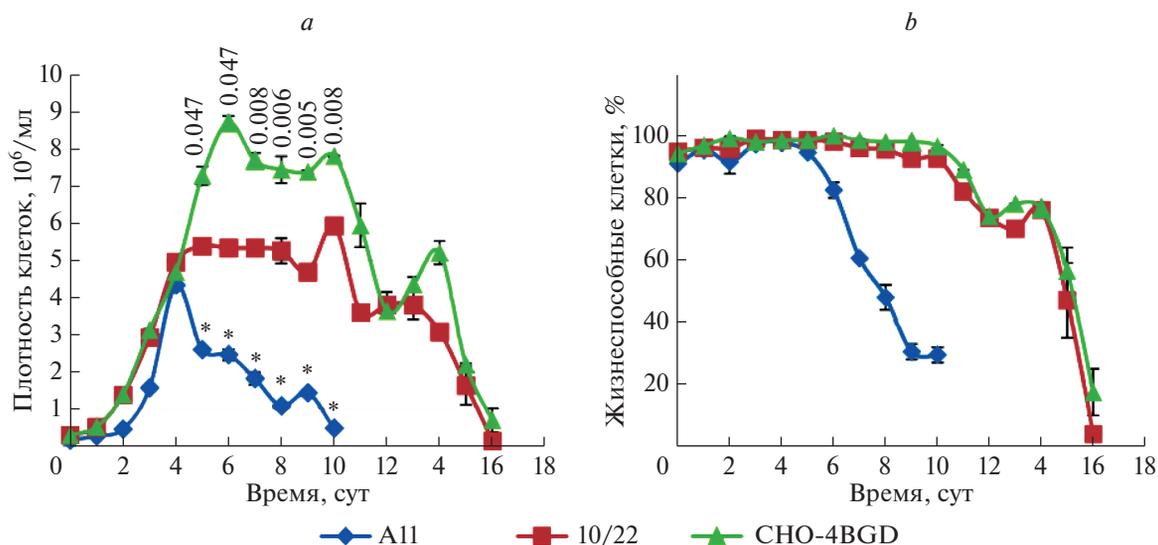


Рис. 2. Динамика плотности и жизнеспособности клеток в процессе длительного культивирования. *a* – Плотность живых клеток; *b* – доля живых клеток. Планками погрешностей обозначено стандартное отклонение ($n = 2$), числами обозначено значение p при сравнении данных для CHO-4BGD и 10/22 по двустороннему парному критерию Стьюдента, для остальных временных точек $p > 0.05$. Клеточная плотность для CHO-4BGD и 10/22 по сравнению с A11 достоверно выше на 5–10 сутки культивирования, $* p < 0.05$ (однофакторный дисперсионный анализ).

Fig. 2. Dynamics of cell density and viability during long-term cultivation. *a* – Density of living cells; *b* – proportion of living cells. Two-tailed paired Student's t -test, $* p < 0.05$ ($n = 2$), comparison of data for CHO-4BGD and 10/22. Cell density for CHO-4BGD and 10/22 was significantly higher compared to A11 for days 5–10 of culture (one-way ANOVA, $n = 2$).

шем плотности клеток линий CHO-4BGD и 10/22 начинали падать и достигали сходного уровня. Для линии A11 концентрация глюкозы превышала 6 мМ на момент прекращения культивирования, то есть массовая смерть клеток линии A11 наступала до истощения источника углерода. В случае CHO-4BGD и 10/22 концентрация глюкозы падала ниже 5 мМ на 12 сутки культивирования; обе эти культуры были устойчивы к стрессу, вызванному голоданием.

Антиапоптотическая инженерия клеток CHO для использования в биофармацевтическом производстве – предмет многих исследований (см. обзор [20]). В ранее опубликованных работах изменения вносили только в один или в два гена и наблюдали явное увеличение устойчивости клеток к стрессу, вызванному голоданием, а к ЭР-стрессу только при инактивации *Vak-1* и *Vax* [3] или при сверхэкспрессии *Vcl-2* или *Vcl-xL*. Воздействие на другие гены апоптоза обычно приводило к выраженным побочным эффектам. Например, нокаут гена каспазы-7 вызывал арест клеточного цикла на стадии G2/M, существенно замедляя скорость деления [21]. Блокирование апоптоза, вызываемого ЭР-стрессом, обычно выполнялось сверхэкспрессией шаперонов *Hsp27* и *Hsp70* [22] или деубиквитиназы *CYLD* [23]. Оценка влияния таких белков на жизнеспособность клеток возможна только при индукции ЭР-стресса сверхэкспрессией гетерологичных белков, например цепей иммуноглобулина, или при воз-

действии бутирата натрия. Мы предполагаем, что блокирование индукции апоптоза, вызываемого ЭР-стрессом, можно проводить путем сверхэкспрессии неспецифических антиапоптотических факторов семейства *Bcl-2*. Усиление макроаутофагии при голодании клеток и, предположительно, при развитии ЭР-стресса также может отсрочить переход клеток к программируемой смерти [24]. По опубликованным данным, индукция аутофагии сверхэкспрессией пары *Bec1in-1* и *Vcl-2* [25], но не *Atg9A* [26] позволила существенно увеличить время жизни клеток CHO в культуре.

В представленной работе проведено параллельное блокирование индукции внутреннего пути апоптоза, сверхэкспрессия *BCL2*, ингибирующая развитие апоптоза при любом способе его инициации, и сверхэкспрессия белка *Bec1in-1*, индуцирующего процесс макроаутофагии. Одна из полученных линий клеток CHO-4BGD имела существенно улучшенные ростовые характеристики по сравнению с родительской линией, содержащей нокауты генов *BAK1* и *BAX*, и потенциально может быть использована для получения линий-продукторов фармацевтически значимых белков с использованием амплифицируемого маркера DHFR и/или метаболически эффективного маркера устойчивости GS (глутаминсинтетаза). Определение связи между требуемыми уровнями экспрессии генов *BCL2*, *BECN1* и оптимальным уровнем индукции аутофагии и ингибирования апоптоза,

вызываемого голоданием или стрессом эндоплазматического ретикулума, будет предметом дальнейшего изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levenberg S., Yarden A., Kam Z., Geiger B.* p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*, 1999, 18(4), 869–876. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202396>
2. *Simon L., Karim M.N.* Control of starvation-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 78(6), 645–657. <https://doi.org/10.1002/bit.10250>
3. *MacDonald M.A., Barry C., Groves T., Martinez V.S., Gray P.P., Baker K., Shave E., Mahler S., Munro T., Marcellin E.* Modeling apoptosis resistance in CHO cells with CRISPR-mediated knockouts of *BAK1*, *BAX*, and *BOK*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2022, 119(6), 1380–1391. <https://doi.org/10.1002/bit.28062>
4. *Fussenegger M., Fassnacht D., Schwartz R., Zanghi J.A., Graf M., Bailey J.E., Portner R.* Regulated overexpression of the survival factor bcl-2 in CHO cells increases viable cell density in batch culture and decreases DNA release in extended fixed-bed cultivation. *Cytotechnology*, 2000, 32(1), 45–61. <https://doi.org/10.1023/A:1008168522385>
5. *Kim Y.G., Kim J.Y., Mohan C., Lee G.M.* Effect of Bcl-xL overexpression on apoptosis and autophagy in recombinant Chinese hamster ovary cells under nutrient-deprived condition. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 103(4), 757–766. <https://doi.org/10.1002/bit.22298>
6. *Safari F., Akbari B.* Knockout of caspase-7 gene improves the expression of recombinant protein in CHO cell line through the cell cycle arrest in G2/M phase. *Biol. Res.*, 2022, 55(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40659-021-00369-9>
7. *Sung Y.H., Hwang S.J., Lee G.M.* Influence of down-regulation of caspase-3 by siRNAs on sodium-butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Metab. Eng.*, 2005, 7(5–6), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.08.001>
8. *Tan J.G., Lee Y.Y., Wang T., Yap M.G., Tan T.W., Ng S.K.* Heat shock protein 27 overexpression in CHO cells modulates apoptosis pathways and delays activation of caspases to improve recombinant monoclonal antibody titre in fed-batch bioreactors. *Biotechnol. J.*, 2015, 10(5), 790–800. <https://doi.org/10.1002/biot.201400764>
9. *Hwang S.O., Lee G.M.* Effect of Akt overexpression on programmed cell death in antibody-producing Chinese hamster ovary cells. *J. Biotechnol.*, 2009, 139(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.09.008>
10. *Baek E., Noh S.M., Lee G.M.* Anti-apoptosis engineering for improved protein production from CHO cells. *Methods Mol. Biol.*, 2017, 1603, 71–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6972-2_5
11. *Su M., Mei Y., Sinha S.* Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. *J. Oncol.*, 2013, 102735. <https://doi.org/10.1155/2013/102735>
12. *Chen Q., Kang J., Fu C.* The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2018, 3, 18. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0018-5>
13. *Gordy C., He Y.W.* The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*, 2012, 3(1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1127-x>
14. *Di Malta C., Cinque L., Settembre C.* Transcriptional regulation of autophagy: mechanisms and diseases. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00114>
15. *Marquez R.T., Xu L.* Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.*, 2012, 2(2), 214–221.
16. *Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2011, 18(4), 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
17. *Zhu J., Cai Y., Xu K., Ren X., Sun J., Lu S., Chen J., Xu P.* Beclin1 overexpression suppresses tumor cell proliferation and survival via an autophagydependent pathway in human synovial sarcoma cells. *Oncol. Rep.*, 2018, 40(4), 1927–1936. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6599>
18. *Orlova N.A., Dayanova L.K., Gayamova E.A., Sinegubova M.V., Kovnir S.V., Vorobiev I.I.* Targeted knockout of the *DHFR*, *GLUL*, *BAK1*, and *BAX* genes by the multiplex genome editing in CHO cells. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2022, 502(1), 40–44. <https://doi.org/10.1134/S1607672922010082>
19. *Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G.* Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnol.*, 2014, 14, 56. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-56>
20. *Shin S.W., Kyeong M., Lee J.S.* Next-Generation cell engineering platform for improving recombinant protein production in mammalian cells. In: *Cell Culture Engineering and Technology*, Ed. R. Pörtner. Cham: Springer International Publishing, 2021, 189–224. https://doi.org/10.1007/978-3-030-79871-0_7
21. *Safari F., Farajnia S., Behzad Behbahani A. Zarredar H., Barezati-Mowahed M., Dehghani H.* Caspase-7 deficiency in Chinese hamster ovary cells reduces cell proliferation and viability. *Biol. Res.*, 2020, 53(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00319-x>
22. *Lee Y.Y., Wong K.T., Tan J., Toh P.C., Mao Y., Brusica V., Yap M.G.* Overexpression of heat shock proteins (HSPs) in CHO cells for extended culture viability and improved recombinant protein production. *J. Biotechnol.*, 2009, 143(1), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.05.013>

23. Lu Y., Zhou Q., Han Q. Wu P., Zhang L., Zhu L., Weaver D.T., Xu C., Zhang B. Inactivation of deubiquitinase CYLD enhances therapeutic antibody production in Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 102 (14), 6081–6093. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9070-x>
24. Lee J.S., Lee G.M. Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109(12), 3093–3102. <https://doi.org/10.1002/bit.24567>
25. Lee J.S., Ha T.K., Park J.H., Lee G.M. Anti-cell death engineering of CHO cells: co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110(8), 2195–207. <https://doi.org/10.1002/bit.24879>
26. Lee J.S., Lee G.M. Estimation of autophagy pathway genes for autophagy induction: overexpression of Atg9A does not induce autophagy in recombinant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Eng. J.*, 2012, 68, 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.021>

Knockout of *BAX*, *BAK1* Genes and Overexpression of *BCL2*, *BECN1* Genes Increase Lifespan and Maximum Density of CHO-S Cell Culture

S. V. Kovnir^a, L. K. Dayanova^{a, b}, E. A. Gayamova^a, L. N. Dybovsky^a, I. I. Vorobiev^{a, b}, and N. A. Orlova^{a, #}

^aSkryabin Institute of Bioengineering, Fundamentals of Biotechnology Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

^bShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

[#]e-mail: nobiol@gmail.com

Abstract—Two genome edits have resulted in the CHO cell line 4BGD with homozygous knockouts of the *BAK1*, *BAX*, *DHFR* and *GLUL* genes, and overexpression of the *BCL2* and *BECN1* genes. This line is capable of long-term growth without changing the culture medium and exhibits a fivefold increase in the integral cell density compared to the parental cell line under the same cultivation regime. Overexpression of the *BCL2*, *BECN1* gene pair leads to a significant increase in cell density on days 6–10 of cultivation compared to the cell line with a knockout of the *BAK1*, *BAX*, *DHFR* and *GLUL* genes, while the integral cell density increases by 34%.

Keywords: genetic editing, pro-apoptotic factors, anti-apoptotic factors