

УДК 577.218

УРОВЕНЬ sgРНК КАК ОСНОВНОЙ ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ CRISPRi НОКДАУНА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562^{1, 2}

© 2021 г. Y. Wang^a, Y. Xie^b, Z. C. Dong^a, X. J. Jiang^a, P. Gong^a, J. Lu^a, F. Wan^a, *^aCollege of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China^bCollege of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China

*e-mail: fwan@imau.edu.cn

Поступила в редакцию 10.02.2020 г.

После доработки 07.04.2020 г.

Принята к публикации 27.04.2020 г.

В работе определяли вклад уровня экспрессии неактивной нуклеазы Cas9 (dCas9) и гид-РНК (sgРНК) в эффективность нокдауна системой CRISPR-интерференции (CRISPRi). С этой целью получены клоны клеток K562, продуцирующие белок KRAB-dCas9 на различных уровнях под контролем индуцибельной системы Tet-on или конститутивного промотора SFFV. Отдельные клоны были отобраны с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) для дальнейшего изучения. В качестве мишеней sgРНК-экспрессирующих лентивирусных векторов из двух библиотек использовали шесть генов в четырех клеточных линиях с различными уровнями экспрессии KRAB-dCas9. Уровни экспрессии KRAB-dCas9/sgРНК и эффективность нокдауна оценивали методом проточной цитометрии. В клоне клеток с наивысшим уровнем экспрессии KRAB-dCas9 воспроизводимо и статистически значимо наблюдали наиболее эффективный нокдаун. Эти данные указывают на то, что уровень KRAB-dCas9 может определять эффективность CRISPRi. В этом клоне меняли уровень экспрессии sgРНК, манипулируя с множественностью инфекции (МОИ) при лентивирусной трансдукции. Обнаружено, что эффективность нокдауна не коррелировала ни с уровнем экспрессии целевого гена, ни с уровнем KRAB-dCas9, который оставался относительно постоянным (коэффициент вариации 2.2%). В случае генов *mmadhc*, *rpia* и *znf148* эффективность нокдауна составила 74.72, 72.28 и 39.08% соответственно и коррелировала с уровнем экспрессии sgРНК. В ходе анализа линейной регрессионной модели установлено, что на эффективность нокдауна влияет уровень экспрессии как KRAB-dCas9, так и sgРНК. Однако детальные расчеты показывают, что наибольший вклад вносит уровень sgРНК, что позволяет считать его основным фактором, влияющим на эффективность CRISPRi.

Ключевые слова: CRISPR-интерференция, нокдаун, индуцируемая тетрациклином система, множественность инфекции, РНК-гид

DOI: 10.31857/S0026898421010146

ВВЕДЕНИЕ

Технология CRISPRi постепенно вытесняет методы, основанные на малых интерферирующих РНК (siРНК), в механистических исследованиях функций генов [1]. Однако пока нет исследований по выявлению факторов, определяющих эффективность системы CRISPRi. В целом, на

эффективность нокдауна могут влиять уровни двух основных игроков системы: белка dCas9 и направляющей РНК (single-guide RNA; sgРНК).

При репрессии транскрипции гена-мишени обычно используют один из трех белков: KRAB, MeCP2, dCas9 и его синтетические производные [2, 3]. KRAB привлекает KAP1, который служит

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0026898421010146 для авторизованных пользователей. Принятые сокращения: ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ; BFP (blue fluorescent protein) – синий флуоресцентный белок; CRISPRi (CRISPR interference) – CRISPR-интерференция; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; FACS (fluorescence-activated cell sorting) – флуоресцентная сортировка клеток; FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная телячья сыворотка; IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) – среда Дульбекко с модификацией Искова; MFI (median fluorescence intensity) – средняя интенсивность флуоресценции; MOI (multiplicity of infection) – множественность инфекции; PEI (polyethylenimine) – полиэтиленимин; sgRNA (single-guide RNA) – направляющая РНК; siРНК (small interfering RNA) – малая интерферирующая РНК.

каркасом для различных факторов, индуцирующих образование гетерохроматина [4]; MeCP2 связывается с метилированной ДНК и привлекает гистондеацетилазу и корепрессор SIN3A [5]. Показано, что комбинация dCas9 с KRAB и MeCP2 повышает эффективность нокдауна [2, 3]. Наиболее часто в CRISPRi используют следующие комбинации репрессорных факторов: dCas9, KRAB-dCas9 и dCas9-KRAB. Хотя процесс KRAB-dCas9 и sgPНК-опосредованного нокдауна CRISPRi не изучен досконально, можно предполагать, что его механизм такой же, как и в случае с эндонуклеазной системой CRISPR: сначала происходит экспрессия компонентов системы sgPНК и Cas9, затем образование комплекса sgPНК с белком Cas9, который транспортируется в ядро, где ищет мишень и после связывания с ней вносит двухцепочечный разрыв в ДНК [6]. Cas9 обеспечивает стабильность sgPНК, а уровень содержания комплексов Cas9 с sgPНК в ядре определяет эффективность редактирования генома. Следует ожидать, что подобные процессы происходят и при CRISPRi. Представляется важным установить, как уровни содержания репрессоров на основе dCas9 и sgPНК влияют на эффективность CRISPRi.

В исследовании для оценки эффективности CRISPRi использованы различные клоны клеток с различным уровнем белка KRAB-dCas9 и субклоны с различным уровнем экспрессии sgPНК. Для идентификации основного фактора, влияющего на эффективность CRISPRi, применен линейный регрессионный анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток и получение плазмид. Линии клеток HEK-293T и K562 приобретены у National Infrastructure of Cell Line Resource (Китай). Клетки HEK-293T культивировали при 37°C в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), содержащей 4.5 г/л глюкозы ("Gibco", США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; "Gibco"). Клетки K562 культивировали в модифицированной по Искову среде Дульбекко (IMDM; "Gibco") с добавлением 10% FBS. Клеточные культуры проверяли каждые 3 месяца на контаминацию микоплазмами и каждый раз получали отрицательный результат. Чтобы создать вектор с доксициклинуиндуцируемой экспрессией белка KRAB-dCas9, промотор в плазмиде SFFV-KRAB-dCas9 (плазмиды #60954, "Addgene", США; любезно предоставлена Jonathan S. Weissman) заменили на промотор pTRE3G (плазмиды #96964, "Addgene"; любезно предоставлена Elena Cattaneo) с помощью классического метода клонирования. Праймеры указаны в табл. S1 Приложения (см. Приложение на сай-

те http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf).

Упаковка лентивирусных частиц. За 1 сутки до трансфекции во флаконы T175 высевали 2.1×10^7 клеток HEK-293T. Клетки трансфицировали упаковывающими плазмидами pSPAX2 (11.6 мкг) и pMD2.G (2.8 мкг) (#12260 и #12259 "Addgene" соответственно; любезно предоставлены Didier Trono) и целевыми плазмидами (11.6 мкг) с использованием полиэтиленимина (PEI; 1 мг/мл), имеющего соотношение азота к фосфору (N/P) 20 [2, 7]. Супернатанты, содержащие вирусные частицы, собирали через 48 и 72 ч после трансфекции и фильтровали с использованием 0.45-мкм фильтров. После этого на дно центрифужной пробирки, содержащей 32 мл вирусосодержащего супернатанта, вносили 4 мл 20%-ного раствора сахарозы и проводили ультрацентрифугирование при $82700 \times g$ и 4°C в течение 2 ч [8]. Осадок ресуспендировали в 100 мкл предварительно охлажденного PBS без Ca^{2+}/Mg^{2+} . Титр препарата лентивирусных частиц определяли методом проточной цитометрии, как описано ранее [8].

Клональная селекция после лентивирусной трансдукции. С целью получить единичные клоны с конститутивной экспрессией белка KRAB-dCas9 1×10^5 клеток K562 трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими SFFV-KRAB-dCas9, с использованием полибрена (конечная концентрация 10 мкг/мл) при MOI 20 в 6-луночных планшетах. Через 72 ч после трансдукции клетки анализировали и сортировали в 96-луночные планшеты с использованием сортировщика клеток BD FACSAria II ("BD Biosciences", США). Единичные клоны, появившиеся через 14 суток, культивировали для дальнейшего анализа.

Для получения единичных клонов с индуцибельной экспрессией KRAB-dCas9 1×10^5 клеток K562 инфицировали лентивирусными частицами, экспрессирующими трансактиватор промотора pTRE3G (pLVX-Tet3G). Трансдуцированные клетки растили в течение 10 суток в присутствии G418 (конечная концентрация 100 мкг/мл). Полученные клоны трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими pTRE3G-KRAB-dCas9, с использованием полибрена и выделяли отдельные клоны, как описано выше.

Проточная цитометрия. Проточную цитометрию проводили на приборе Beckman CytoFLEX S ("Beckman Coulter", США). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo 10 и CytoExpert 2.0.

Иммуноблоттинг и иммуноферментный анализ (ИФА). Для определения содержания белка KRAB-dCas9 клетки клона K562-idCas9 #49 индуцировали доксициклином в концентрациях 200 нМ и 2000 нМ в течение 48 ч. Общий белок

выделяли в лизисном буфере RIPA с 1 мМ PMSF и определяли концентрацию с использованием BCA Protein Assay kit (#PC0020, “Solarbio Life Science”, Китай). Для иммуноблоттинга белковые лизаты (20 мкг) разделяли электрофорезом в 8%-ном SDS-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0.22 мкм при 150 В в течение 90 мин. Мембрану инкубировали сначала с поликлональными антителами против Cas9 (#632607, “Clontech Laboratories Inc.”, США) и α -тубулина (#AC012, “ABclonal”, США), а затем со вторичными антителами IRDyeTM-800CW (Lot No. C50113-06, “BD Biosciences”). Мембрану сканировали с помощью системы визуализации OdysseyTM CLx (“Li-COR Bioscience”, США). Содержание белка KRAB-dCas9 количественно определяли с использованием набора CRISPR/Cas9 для ИФА (#P-4060-48, “EpiGenetek”, США) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка эффективности CRISPRi нокадауна.

Одиночные клоны инфицировали лентивирусом, экспрессирующим sgPHK, (MOI 20, если не указано иное) с полибренном (конечная концентрация 10 мкг/мл). После 72-часовой трансдукции клоны отбирали пуромицином (конечная концентрация 5 мкг/мл) в течение 72 ч. Уровень экспрессии генов-мишеней определяли количественной ПЦР с использованием метода относительной количественной оценки. Праймеры для ПЦР указаны в табл. S1 Приложения (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf). В первую очередь специфичность праймеров проверяли путем анализа кривых плавления продуктов ПЦР и их разделения электрофорезом в агарозном геле. Далее определяли эффективность реакции ПЦР, анализируя серию разведений кДНК в качестве матрицы. Уровень экспрессии оценивали с помощью пакета программ, поставляемого с прибором LightCycler 96 (“Roche”, Швейцария). Относительный уровень экспрессии целевого гена определяли путем деления на усредненный уровень мРНК GAPDH и β -актина, используемых в качестве референсных генов. Эффективность нокадауна рассчитывали по формуле:

$$[1 - (mPHK_{ц} / mPHK_{к})] \times 100\%,$$

где $mPHK_{ц}$ – относительный уровень мРНК целевого гена в опыте; $mPHK_{к}$ – относительный уровень мРНК в отрицательном контроле – клеточном клоне, не инфицированном лентивирусом.

Статистический анализ. Дисперсионный анализ (ANOVA) выполняли при сравнении данных, полученных от четырех клеточных клонов. Линейный регрессионный анализ выполняли с целью выявления взаимосвязи между эффективностью нокадауна и уровнем экспрессии либо KRAB-dCas9,

либо sgPHK. Все статистические анализы проводили с использованием пакета программ SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью понять, какой из факторов: уровень белка KRAB-dCas9 или уровень sgPHK – оказывает наибольшее влияние на эффективность нокадауна CRISPRi, мы применили иерархическую схему экспериментов, согласно которой сначала сравнивали эффективность нокадауна в клонах с различным уровнем содержания белка KRAB-dCas9, а затем сравнивали эффективность нокадауна в субклонах клеток с различным уровнем экспрессии sgPHK (рис. 1а). В первой серии экспериментов получены клоны клеток K562 с конститутивной или индуцибельной экспрессией гена химерного белка KRAB-dCas9-mCherry.

Систему Tet-on использовали при создании клеточных линий, экспрессия химерного белка KRAB-dCas9-mCherry в которых индуцировалась доксициклином: сначала с помощью лентивирусной трансдукции и последующей селекцией G418 в клетки K562 ввели конструкцию, кодирующую *транс*-активатор (плазида Tet3G) промотора pTRE3G, далее в эти клетки путем лентивирусной трансдукции ввели конструкцию, экспрессирующую KRAB-dCas9-mCherry под контролем индуцибельного промотора pTRE3G (рис. 1б). Из двенадцати 96-луночных планшетов путем FACS с использованием mCherry в качестве репортерного белка случайным образом выбраны 60 клонов (K562-idCas9 от #1 до #60) для дальнейших экспериментов. Индукцию экспрессии трансгена определяли с помощью проточной цитометрии в присутствии доксициклина (рис. S1 и S2 Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf). На основании степени изменения уровня экспрессии трансгена, вычисленного как отношение средней интенсивности флуоресценции (MFI) клеток после индукции доксициклином к интенсивности без индукции доксициклином (индуцированный MFI/неиндуцированный MFI), провели ранжировку выбранных 60 клонов (рис. 1в) и для дальнейшего анализа выбрали 5 клонов (K562-idCas9 #9, #25, #49, #54, #60) с различной степенью изменения уровня экспрессии трансгена.

Сначала подтвердили индуцибельную экспрессию KRAB-dCas9-mCherry в K562-idCas9 #49 и #60 по содержанию mCherry, коэкспрессируемого с KRAB-dCas9, с помощью проточной цитометрии (рис. 2а). Далее детектировали dCas9 с помощью иммуноблоттинга и ИФА (рис. 2б, в). Белок KRAB-dCas9, как и ожидалось, в основном локализовался в ядре. Сигнал MFI mCherry соответствовал сигналу ИФА. Это значит, что mCherry служит адекватным репортером уровня экс-

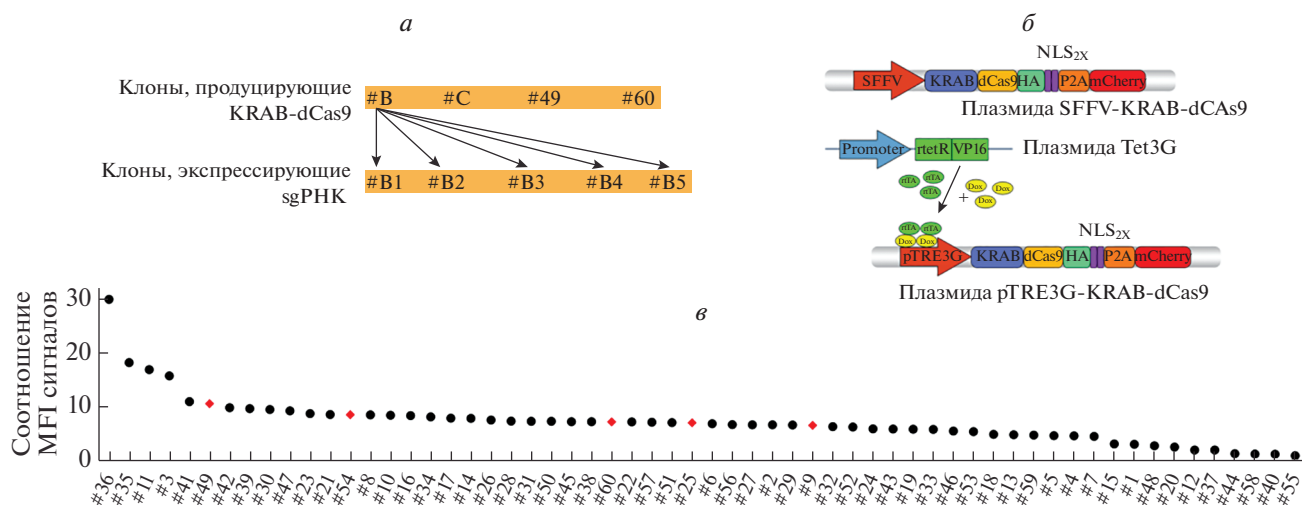


Рис. 1. Схемы лентивирусных конструкций и отбора клеточных клонов с индуцибельной экспрессией компонентов системы CRISPRi. Получение и селекция клонов с индуцируемой экспрессией dCas9. *a* – Схема эксперимента. #B – K562-dCas9 #B; #C – K562-dCas9 #C; #49 – K562-idCas9 #49; #60 – K562-idCas9 #60. #B1, #B2, #B3, #B4 и #B5 обозначают субклоны клона K562-dCas9 #B, инфицированные лентивирусным вектором, несущим sgPNC, при различных MOI. *б* – Схема лентивирусных векторов, кодирующих KRAB-dCas9 под контролем индуцибельных и конститутивных промоторов. *в* – 60 клонов с индуцибельной экспрессией dCas9 ранжированы по соотношению индуцированного MF1/неиндуцированный MF1, красными ромбиками отмечены отдельные клоны, использованные в дальнейшем анализе. Экспрессию индуцировали доксициклином в конечной концентрации 2 000 нМ в течение 48 ч.

прессии KRAB-dCas9. Для проведения CRISPRi экспериментов у компании “Addgene” были приобретены две библиотеки sgPNC: hCRISPRi-v2 [9] и Dolcetto [10]. Каждая библиотека содержит несколько sgPNC, нацеленных на интересующие нас гены. Ранжированные sgPNC представлены в табл. 1. Пилотные эксперименты по CRISPRi нокдауну проводили с использованием лентивирусных частиц, несущих sgPNC высшего ранга против *UBE4A* и *DPH2* из библиотеки hCRISPRi-v2. K562-idCas9 #9, #25, #54 были исключены из дальнейшего анализа на основании низкой эффективности CRISPRi нокдаун в пилотных экспериментах (рис. S3а–г Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf). В клоне K562-idCas9 #49, обладающем относительно высоким уровнем экспрессии

KRAB-dCas9-mCherry, эффективность нокдауна гена *DPH2* в присутствии 100 нМ доксициклина составила 24% (рис. S3д Приложения). Клоны K562-idCas9 #49, а также #60, который имеет относительно низкую экспрессию KRAB-dCas9-mCherry (рис. 2е), выбрали для дальнейшего анализа.

Аналогичным образом анализировали клоны клеток, конститутивно экспрессирующие KRAB-dCas9-mCherry, и выбрали три клона: K562-dCas9 #A, K562-dCas9 #B и K562-dCas9 #C. В пилотных экспериментах по нокдауну установлено, что в клоне K562-dCas9 #A нокдауна генов *UBE4A* и *DPH2* не наблюдается (рис. S3е Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf), поэтому он был исключен из дальнейшего анализа.

Таблица 1. Последовательности спейсеров sgPNC

sgPNC	Последовательность (5' → 3')	Ранг	Библиотека
DPH2	GATGTTTAGCAGCCCTGCCG	2/10	hCRISPRi-v2
UBE4A	GACAGGGTTCGAAGTTCAAGA	1/10	hCRISPRi-v2
MMADHC	GAAAATACGGCAATACCGA	1/10	hCRISPRi-v2
RPIA	GGTGCACAGTCTGGGACCCG	1/10	hCRISPRi-v2
ZNF148	GCAGGCCGAGCGCTTACCG	1/10	hCRISPRi-v2
LSM4	CAGTTGCCCTGCCCTCACCA	1/3	Dolcetto
NPEPPS	TGGCGGGCGGGCTGCCTACG	3/3	Dolcetto
LIMA1	GATGCTTTCTCCATGTGGCA	1/3	Dolcetto

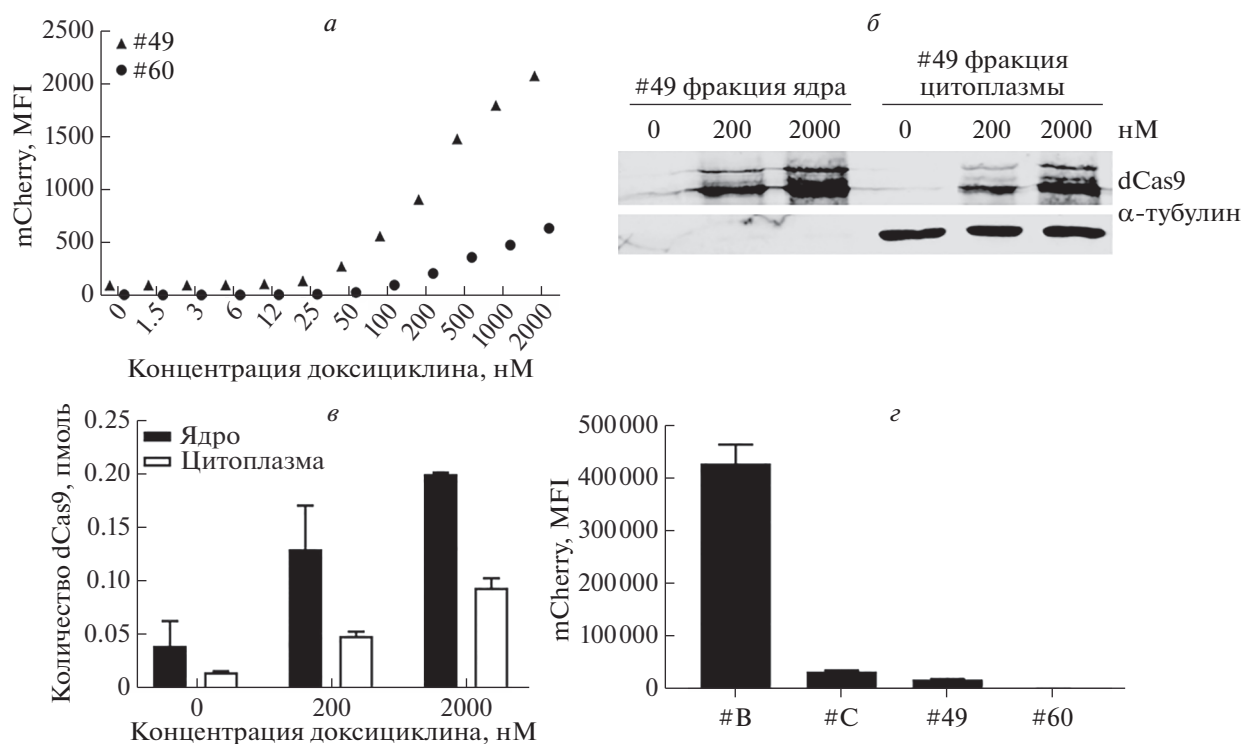


Рис. 2. Оценка уровня KRAB-dCas9 в клеточных клонах с индуцибельной и конститутивной экспрессией соответствующего гена. *а* – MFI-сигнал mCherry в клонах K562-idCas9 #49 и K562-idCas9 #60 в ответ на различные концентрации доксициклина. Треугольниками обозначен клон K562-idCas9 #49, кружками – клон K562-idCas9 #60. *б, в* – Результаты определения содержания KRAB-dCas9 в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток методами иммуноблоттинга и ИФА в клоне K562-idCas9 #49, обработанном доксициклином в конечной концентрации 200 нМ и 2 000 нМ. *г* – MFI-сигнал mCherry в двух клонах с конститутивной экспрессией dCas9 и в двух клонах с индуцибельной экспрессией dCas9 после обработки доксициклином в конечной концентрации 100 нМ. Обозначения клонов: #B – K562-dCas9 #B; #C – K562-dCas9 #C; #49 – K562-idCas9 #49; #60 – K562-idCas9 #60.

Чтобы оценить влияние уровня экспрессии KRAB-dCas9 на эффективность нокдауна в CRISPRi-системе использовали клетки с конститутивной K562-dCas9 #B, #C и индуцибельной K562-idCas9 #49, #60 экспрессией KRAB-dCas9. В индуцибельных клонах уровни KRAB-dCas9 были ниже, чем в конститутивных клонах (рис. 2*в*). Для CRISPRi-экспериментов из каждой библиотеки случайным образом выбрали по три sgРНК против целевых генов с высоким рейтингом (табл. 1). После лентивирусной трансдукции sgРНК векторами проводили селекцию клонов клеток с помощью пурамицина и оценивали эффективность нокдауна методом количественной ПЦР. Наиболее эффективное подавление экспрессии генов *mmadhc*, *rpia*, *znf148*, *lsm4* и *lima1* наблюдали в клоне K562-dCas9 #B с наивысшим уровнем экспрессии KRAB-dCas9 (рис. 3*а*). В остальных клонах наблюдали относительно низкую эффективность нокдауна или его отсутствие, что выражалось в относительно высоком уровне экспрессии целевого гена (рис. 3*а*). Эти данные указывают на то, что высокий уровень экспрес-

сии KRAB-dCas9 – важное условие эффективного процесса CRISPRi.

Для оценки статистической значимости различий между четырьмя клеточными клонами использовали ANOVA. Установлено, что K562-dCas9 #B значимо отличался от K562-dCas9 #C и K562-idCas9 #60, а *p*-value при сравнении K562-dCas9 #B и K562-idCas9 #49 составляло 0.054, из чего можно сделать вывод, что K562-dCas9 #B отличается также и от K562-idCas9 #49. Это еще раз подтверждает наш вывод о том, что K562-dCas9 #B работает как эффективный компонент CRISPRi-системы (табл. 2).

Мы проанализировали также, влияет ли уровень экспрессии целевого гена на эффективность нокдауна, и не обнаружили значимой корреляции (рис. 3*б*). Относительный уровень экспрессии генов-мишеней в четырех клеточных клонах отличался друг от друга, вероятно, как следствие процедуры клонирования [11] (рис. 3*в*). Непрерывный мониторинг уровня экспрессии KRAB-dCas9 показал, что K562-dCas9 #C теряет экспрессию трансгена с течением времени, тогда как

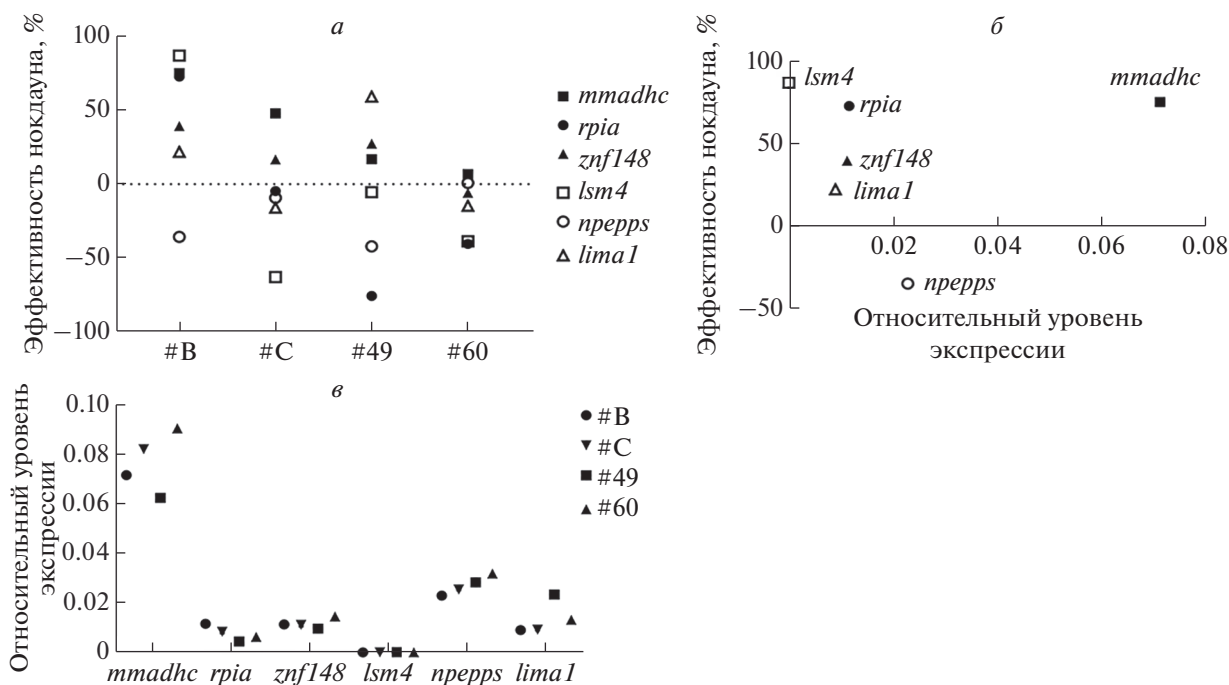


Рис. 3. Для эффективного нокдауна CRISPRi необходим достаточный уровень KRAB-dCas9. *a* – Эффективность нокдауна 6 генов в четырех клонах. Обозначения клонов: #B – K562-dCas9 #B; #C – K562-dCas9 #C; #49 – K562-idCas9 #49; #60 – K562-idCas9 #60. *б* – Влияние уровня экспрессии целевого гена на эффективность CRISPRi нокдауна в клоне K562-dCas9 #B. *в* – Относительный уровень экспрессии 6 целевых генов в четырех клонах. Обозначения клонов, как на виде (*a*).

в других клонах этого не происходило (табл. S2 Приложения).

Используя клон K562-dCas9 #B, мы оценили влияние уровня экспрессии sgРНК на эффективность нокдауна. Перед выполнением основных экспериментов подобрали условия переноса трансгена, обеспечивающие наибольшую эффективность трансдукции клеток, путем измерения MFI синего флуоресцентного белка (BFP), ко-экспрессируемого с sgРНК в полицистронном транскрипте. Согласно полученным данным, значения MFI BFP коррелировали с MOI и соответствовали полиномиальной кривой (рис. 4а). По результатам анализа этой кривой скорость переноса трансгена составила 34.1% при MOI 0.5, что близко к ранее сообщавшейся скорости пере-

носа гена: 28.6% при MOI 0.5 в клетках K562 [12]. Эти данные подтверждают эффективную упаковку лентивируса и трансдукцию.

Затем с использованием проточной цитометрии подтвердили положительную корреляцию MOI с уровнем экспрессии sgРНК (рис. 4б). Обнаружили линейную корреляцию BFP MFI с MOI (рис. 4в). Более того, наблюдали линейную зависимость между MOI и эффективностью нокдауна (рис. 4г), из чего следует, что уровень экспрессии sgРНК положительно коррелирует с эффективностью нокдауна. На примере гена *mmadhc* показано, что при MOI 0.5, обычно используемом при скрининге библиотек CRISPRi, может быть достигнута эффективность нокдауна около 45% (рис. 4г).

Таблица 2. Эффективность нокдауна в четырех клеточных клонах

Клеточный клон	Средняя эффективность нокдауна (%)	Стандартное отклонение (%)
K562-dCas9 #B	43.16 ^a	45.55
K562-idCas9 #49	-3.24 ^{ab}	48.65
K562-dCas9 #C	-4.63 ^b	36.48
K562-idCas9 #60	-15.24 ^b	19.92

^{a, ab, b} Отдельно указана статистическая значимость эффективности нокдауна ($p < 0.05$). ^a – Обозначает сравнение между #B и #49, ^b – обозначает сравнение между #49, #C и #60.

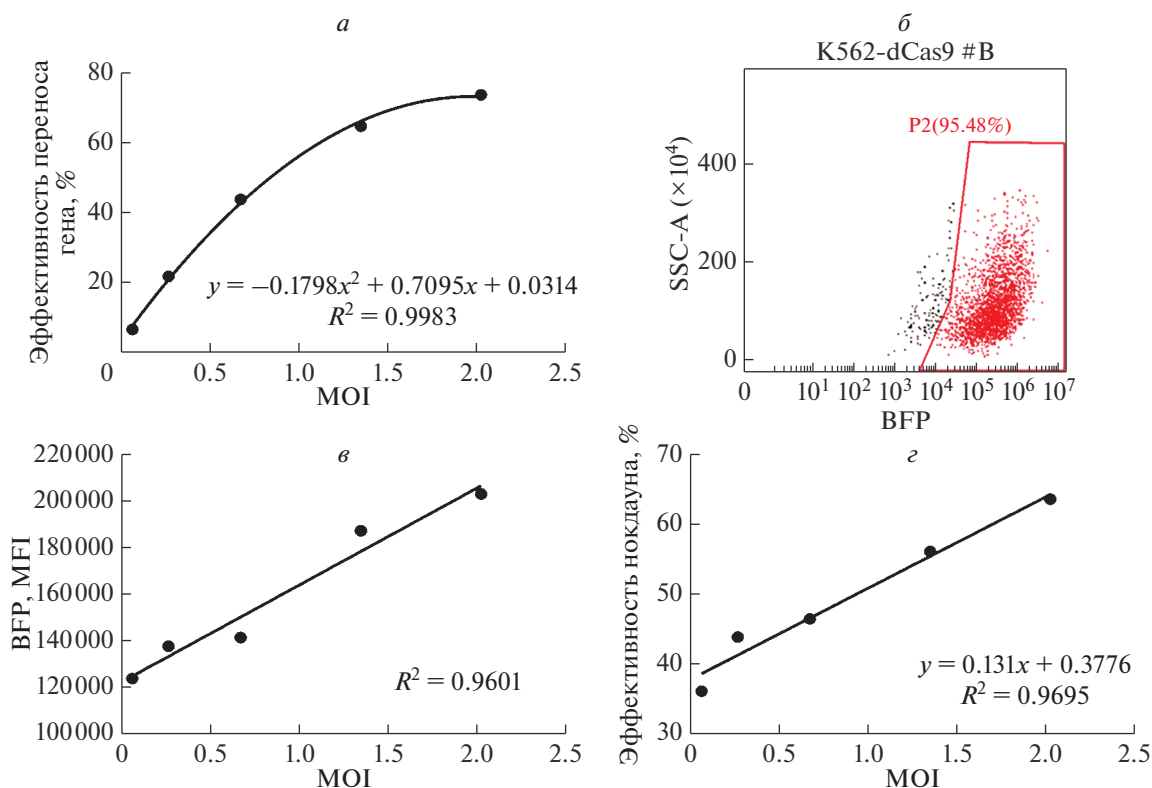


Рис. 4. Эффективность CRISPRi нокдауна коррелирует с уровнем экспрессии sgРНК. *а* – Зависимость эффективности переноса sgРНК против гена *mmadhс* от MOI, определенная по MFI-сигналу BFP в клоне K562-dCas9 #B. *б* – Диаграмма рассеяния для клона K562-dCas9 #B, экспрессирующего sgРНК против гена *mmadhс*. Красной рамкой выделена область клеток с положительным сигналом флуоресценции BFP. *в* – Зависимость MFI-сигнала BFP в клетках, экспрессирующих sgРНК, от MOI лентивируса, несущего sgРНК против гена *mmadhс*, в клоне K562-dCas9 #B. Клетки, экспрессирующие sgРНК, детектировали с помощью проточной цитофлуориметрии. *г* – Зависимость эффективности нокдауна от MOI лентивируса, кодирующего sgРНК против гена *mmadhс*, в клоне K562-dCas9 #B.

С целью оценить индивидуальный вклад уровней экспрессии dCas9 и sgРНК в эффективность нокдауна использовали модель линейной регрессии с MFI dCas9 и sgРНК в качестве независимых переменных. Подтверждено, что соблюдается условие равной дисперсии у сравниваемых групп данных. Согласно полученным данным, когда dCas9 служит независимой переменной в линейной модели, $R^2 = 0.243$, $F = 8.367$, $p = 0.008$, а значит уровень содержания dCas9 значимо влияет на эффективность нокдауна. По значению стандартизованного коэффициента, $\beta_1 = 0.525$, можно сделать вывод о том, что при изменении уровня dCas9 на единицу стандартного отклонения эффективность нокдауна изменится на 0.525 стандартного отклонения. Результаты аналогичных расчетов, выполненных для sgРНК в качестве независимой переменной в линейной модели, следующие: $R^2 = 0.949$, $F = 75.84$, $p = 0.003$ и стандартизованный коэффициент $\beta_2 = 0.981$. Это значит, что уровень sgРНК тоже сильно влияет на эффективность нокдауна, и изменение уровня sgРНК на единицу стандартного отклонения соответ-

ствует изменению эффективности нокдауна на 0.981 стандартного отклонения. Таким образом, на основании значений стандартизованного коэффициента β_2 можно сделать вывод о том, что уровень sgРНК оказывает большее влияние на эффективность нокдауна, чем уровень dCas9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе исследований динамики процесса CRISPRi, опосредованного искусственным репрессором KRAB-dCas9, мы оценили влияние уровней химерного белка на основе dCas9 и sgРНК на эффективность нокдауна. Полученные данные могут служить основой для дальнейшей оптимизации скрининга библиотек CRISPRi.

Обнаружено, что уровень экспрессии KRAB-dCas9 значительно влияет на эффективность CRISPRi-системы. На основании полученных результатов, несмотря на ограниченное число проверенных клонов, можно полагать, что для эффективного нокдауна необходим определенный уровень химерного белка dCas9. Безусловно, толь-

ко после проведения дополнительных исследований на большем числе клеточных клонов можно выяснить, действительно ли существует пороговый уровень содержания KRAB-dCas9, выше которого гарантирован эффективный нокдаун.

Требование по определенному уровню KRAB-dCas9 имеет большое значение при скрининге библиотек CRISPRi. Дело в том, что после лентивирусной инфекции обязательно проводят отбор клеток, а проблема состоит в том, что их требуется много, так как число клеток в каждой группе должно тысячекратно превышать количество sgPHK в используемой библиотеке. Именно поэтому при работе с библиотеками большого размера требуется высокоскоростной сортировщик клеток, который, к сожалению, недоступен в большинстве лабораторий. В отсутствие подобного инструмента скрининг библиотеки CRISPRi следует проводить в клеточных клонах, обеспечивающих стабильный и высокий уровень содержания KRAB-dCas9. Однако промотор интегрированного лентивирусного вектора может метилироваться, что приводит к выключению экспрессии трансгена при непрерывном культивировании клеточных линий, что, по-видимому, произошло в одном из клеточных клонов – K562-dCas9 #C. На основании вышеизложенного имеет смысл вести непрерывный мониторинг уровня KRAB-dCas9 и использовать в эксперименте несколько клонов.

Известно, что в отдельных изолированных клонах изменен транскрипционный паттерн клеток, экспрессирующих KRAB-dCas9, поэтому CRISPRi стоит проводить в поликлональных популяциях клеток [11]. Однако влияние изменения паттерна транскрипции, как следствие процедуры клеточного клонирования, можно нивелировать использованием одного и того же клона в дальнейших исследованиях. Помимо использования клонов с высоким уровнем содержания химерного белка dCas9 мощность скрининга CRISPRi можно увеличить за счет постоянной селекции клеток в присутствии антибиотиков – при условии наличия гена устойчивости к ним в используемых трансгенных конструкциях. Альтернативой может быть использование более эффективного химерного репрессора dCas9-KRAB-MeCP2 [13].

Из шести генов, случайно выбранных для CRISPRi, эффективность репрессии *nrepps* и *rpia* была самой низкой в большинстве или во всех клонах. Согласно аннотации, экспрессия гена *nrepps* чувствительна к пуромидину, поэтому вполне вероятно, что при селекции sgPHK трансдуцированных клонов в присутствии пуромидина произошла активация его экспрессии. В случае *rpia* также есть сообщения о сверхэкспрессии этого гена в ответ на обработку доксициклином [14].

Нами обнаружено, что при высоком уровне содержания KRAB-dCas9 эффективность CRISPRi хорошо коррелирует с MOI. В то же время эффективность CRISPRi хорошо коррелировала и с экспрессией sgPHK. Несмотря на отсутствие данных, мы предполагаем, что в CRISPRi, как и в случае системы CRISPR, накопление направляющей PHK в ядре служит ограничивающим фактором для эффективного действия эффектора Cas9 [6, 15]. Нами обнаружено, что уровень sgPHK в большей степени влияет на эффективность CRISPRi, чем уровень dCas9. Логично предположить, что динамика образования рибонуклеопротеидных комплексов и поиска мишени на ДНК сходна в системах CRISPR и CRISPRi.

Для повышения эффективности нокдауна критически важно достигать высокого уровня экспрессии sgPHK, учитывая ее нестабильность в свободном состоянии – когда она не связана с белком Cas9 [6]. Действительно, увеличение стабильности sgPHK повышает эффективность ДНК-интерференции [16]. Использование сильного промотора также должно способствовать увеличению уровня sgPHK.

Корреляция между уровнем экспрессии sgPHK и эффективностью нокдауна в системе CRISPRi может быть использована для скрининга библиотек CRISPRi, причем индуцибельная экспрессия sgPHK позволит лучше контролировать эффективность нокдауна. Это же сообщалось для системы CRISPR, где на платформе индуцибельной sgPHK удается проводить эффективный контроль нокдауна [17], что опять же указывает на сходство между двумя системами: CRISPR и CRISPRi.

Авторы выражают благодарность проф. Jonathan S. Weissman, David E. Root и John G. Doench за любезно предоставленную через “Addgene” библиотеку CRISPRi, а также д-ру Luke A. Gilbert за советы по использованию библиотеки CRISPRi.

Работа выполнена при финансовой поддержке National Natural Science Foundation of China (81860652).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evers B., Jastrzebski K., Heijmans J., Grenrum W., Beijersbergen R.L., Bernards R. (2016) CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat. Biotechnol.* **34**, 631–633.
2. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E., Chen Y.W., Whitehead E.H., Guimaraes C.P., Panning B.,

- Ploegh H.L., Bassik M.C., Qi L.S., Kampmann M., Weissman J.S. (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*. **159**, 647–661.
3. Yeo N.C., Chavez A., Lancebyrne A., Chan Y.C., Menn D.J., Milanova D., Kuo C.C., Guo X.G., Sharma S., Tung A., Cecchi R.J., Tuttle M., Pradhan S., Lim E.T., Davidsohn N., Ebrahimkhani M.R., Collins J.J., Lewis N.E., Kiani S., Church G.M. (2018) An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat. Methods*. **15**, 611–616.
 4. Peng H.Z., Ivanov A.V., Oh H.J., Lau Y.C., Rauscher F.J. (2009) Epigenetic gene silencing by the SRY protein is mediated by a KRAB-O protein that recruits the KAP1 co-repressor machinery. *J. Biol. Chem.* **284**, 35670–35680.
 5. Hansen J.C., Ghosh R.P., Woodcock C.L. (2010) Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life*. **62**, 732–738.
 6. Ma H.H., Tu L.C., Naseri A., Huisman M., Zhang S.J., Grunwald D., Pederson T. (2016) CRISPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells. *J. Cell Biol.* **214**, 529–537.
 7. Yang S.Z., Shi H.J., Chu X.R., Zhou X.L., Sun P.N. (2016) A rapid and efficient polyethyleneimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biotechnol. Lett.* **38**, 1631–1641.
 8. Kutner R.H., Zhang X.Y., Reiser J. (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* **4**, 495–505.
 9. Horlbeck M.A., Gilbert L.A., Villalta J.E., Adamson B.S., Pak R.A., Chen Y.W., Fields A.P., Park C.Y., Corn J.E., Kampmann M., Weissman J.S. (2016) Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. *Elife*. **5**, e19760.
 10. Sanson K.R., Hanna R.E., Hegde M., Donovan K.F., Strand C., Sullender M.E., Vaimberg E.W., Goodale A., Root D.E., Piccioni F., Doench J.G. (2018) Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nat. Commun.* **9**, 5416.
 11. Stojic L., Lun A.T., Mangei J., Mascalchi P., Quarantotti V., Barr A.R., Bakal C., Marioni J.C., Gergely F., Odom D.T. (2018) Specificity of RNAi, LNA and CRISPRi as loss-of-function methods in transcriptional analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, 5950–5966.
 12. Kustikova O.S., Wahlers A., Kuhlcke K., Stahle B., Zander A.R., Baum C., Fehse B. (2003) Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood*. **102**, 3934–3937.
 13. Martella A., Firth M., Taylor B.J., Goppert A., Cuomo E.M., Roth R.G., Dickson A.J., Fisher D.I. (2019) Systematic evaluation of CRISPRa and CRISPRi modalities enables development of a multiplexed, orthogonal gene activation and repression system. *ACS Synth. Biol.* **8**, 1998–2006.
 14. Ahler E., Sullivan W.J., Cass A., Braas D., York A.G., Bensing S.J., Graeber T.G., Christofk H.R. (2013) Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One*. **8**, e64561.
 15. Yuen G., Khan F.J., Gao S.J., Stommel J.M., Batchelor E., Wu X.L., Luo J. (2017) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Res.* **45**, 12039–12053.
 16. Mu W., Zhang Y.P., Xue X.T., Liu L., Wei X.F., Wang H.Y. (2019) 5' capped and 3' polyA-tailed sgRNAs enhance the efficiency of CRISPR-Cas9 system. *Protein Cell*. **10**, 223–228.
 17. Aubrey B.J., Kelly G.L., Kueh A.J., Brennan M.S., Oconnor L., Milla L., Wilcox S., Tai L., Strasser A., Herold M.J. (2015) An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo*. *Cell Rep.* **10**, 1422–1432.

LEVELS OF sgRNA AS A MAJOR FACTOR AFFECTING CRISPRi KNOCKDOWN EFFICIENCY IN K562 CELLS

Y. Wang¹, Y. Xie², Z. C. Dong¹, X. J. Jiang¹, P. Gong¹, J. Lu¹, and F. Wan^{1,*}

¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China

²College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China

*e-mail: fwan@imau.edu.cn

To determine how nuclease deactivated Cas9 (dCas9) or sgRNA expression levels affect the knockdown efficiency of CRISPRi, we created K562 cell clones expressing KRAB-dCas9 protein either with the inducible Tet-on system or with the constitutive SFFV promoter. Single clones were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for further study. Six genes with various expression levels were targeted using lentiviral sgRNA from two libraries in four cell clones with various KRAB-dCas9 expression levels. The expression level of dCas9 protein/sgRNA levels and the knockdown efficiency were determined by flow cytometry. The cell clone with the highest KRAB-dCas9 expression level achieved effective CRISPRi knockdown. The data describing this clone were statistically different from that on other clones, indicating the strong KRAB-dCas9 expression might be a prerequisite for CRISPRi. By adopting different multiplicity of infection (MOI) in lentiviral transduction of this clone, we modified the expression level of sgRNA and found that the knockdown

efficiency was neither affected by the target gene expression level nor correlated with KRAB-dCas9 levels, which remained relatively constant across all knockdown experiments (coefficient of variation = 2.2%). As an example, the following levels of the knockdowns: 74.72, 72.28 and 39.08% for *mmadhc*, *rpiA* and *znf148* genes, respectively, were achieved. These knockdown efficiencies correlated well with the respective sgRNA expression levels. Linear regression models built using this data indicate that the knockdown efficiency may be significantly affected by the levels of both KRAB-dCas9 and sgRNA. Notably, the sgRNA levels have greater impact, being a major factor affecting CRISPRi efficiency.

Keywords: CRISPR interference, knockdown, inducible Tet-on system, multiplicity of infection, sgRNA