

Оптимизация условий трансфекции клеточной культуры CFTE29o⁺ для разработки редактирования мутации F508del в гене *CFTR**

Смирнихина С.А.^{1*}, Банников А.В.¹, Лавров А.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», e-mail: smirnikhinass@gmail.com

² — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Технологии геномного редактирования, включая недавно появившийся метод CRISPR/Cas9, являются наиболее перспективными для разработки этиотропного лечения муковисцидоза. Для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки обычно используют традиционные методы трансфекции. Целью данной работы была оптимизация невирусной доставки плазмиды pEGFP-N1 в клетки трахеального эпителия человека CFTE29o⁺ с гомозиготной мутацией F508del. Эффективность липофекции различными реагентами, Metafectene, Metafectene Pro, Unifectine-56 и Maxifectine-56, была низкой и плохо воспроизводимой. Электропорация, даже при «мягких» условиях, приводила к высокой смертности клеток. Подходящим методом для CFTE29o⁺ оказалась кальций-фосфатная трансфекция, эффективность которой составила 46,3—48,0%. Высокая эффективность метода позволяет трансфицировать плазмиды CRISPR/Cas9 для их дальнейшей сравнительной характеристики в целях оптимизации геномного редактирования F508del в гене *CFTR*.

Ключевые слова: CFTE29o⁺, кальций-фосфатная трансфекция, липофекция, электропорация, GFP

Введение

Муковисцидоз (МВ, OMIM 219700) — тяжелое ауто-сомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR*, приводящими к нарушению транспорта ионов хлора и натрия через клеточную мембрану. На сегодняшний день существуют перспективные разработки патогенетического лечения, однако ивакафтор и комбинированный препарат люмакафтор-ивакафтор отличаются невысокой эффективностью, высокой стоимостью и подходят для лечения пациентов лишь с определенными мутациями в гене *CFTR* [1—3]. Этиотропного лечения МВ не существует, и для его разработки технологии геномного редактирования являются наиболее перспективными.

Геномное редактирование — новый мощный инструмент, позволяющий создавать целевые изменения геномов с использованием специфичных нуклеаз. Наиболее часто используют методы на основе нуклеаз цинковых пальцев (ZFN) [4], эндонуклеаз эффекторов, подобных активатору транскрипции (TALEN) [5], а также недавно появившийся метод с использованием групп регулярно перемежающихся коротких палиндромных повторов (CRISPR) и CRISPR-ассоциированного белка 9 (Cas9) [6]. Последний метод является довольно простым, что позволяет быстро и недорого разработать систему целевого геномного редактирования на основе CRISPR/Cas9. Система состоит из двух обязательных компонентов: sgRNA (единая направляющая РНК), не-

обходимой для распознавания и связывания с целевой последовательностью ДНК, и нуклеазы Cas9, способной создать двуцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК в месте связывания sgRNA с ДНК. Репарация ДЦР осуществляется либо негомологичным соединением концов, либо при наличии донорной ДНК путем направленной гомологичной репарации [7].

В настоящее время существует несколько вариантов белков Cas9, доступных для системы CRISPR/Cas9 локусов вокруг наиболее часто встречающейся при МВ мутации F508del [8], которые можно использовать для редактирования мутации. Сравнение эффективности пяти разработанных комбинаций Cas9 и sgRNA необходимо провести на модельной системе, в качестве которой выбрана клеточная культура трахеального эпителия человека CFTE29o⁺ с гомозиготной мутацией F508del. Для доставки компонентов CRISPR/Cas9 в клетки используют традиционные подходы трансфекции: липофекцию, электропорацию, нуклеофекцию и кальций-фосфатную трансфекцию, а также вирусную трансдукцию. Невирусные методы безопасны и просты в использовании и позволяют в большинстве случаев получить высокую эффективность трансфекции, пригодную для сравнительной оценки разных конструкций CRISPR/Cas9 [9].

Целью первого этапа явилась оптимизация невирусной доставки плазмиды, содержащей репортерный ген *GFP*, в культуру клеток CFTE29o⁺.

* Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Материалы и методы

В работе использовали две клеточные культуры — CFTE290⁺ (Российская коллекция клеточных культур, ФГБУН Институт цитологии РАН) и НЕК293N (любезно предоставлена к.б.н. М.Ю. Скобловым из лаборатории функциональной геномики ФГБНУ «МГНЦ»). Обе культуры культивировали в DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (PAA Laboratories GmbH, Австрия) и 4 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия).

Транфекцию проводили плазмидой pEGFP-N1 (Clontech, США). Количество флуоресцентных клеток оценивали через 48–72 часа после трансфекции на проточном цитометре (Flowmax, Partec, Германия).

Липофекцию с использованием Metafectene, Metafectene Pro (оба Biontex, Германия), Unifectine-56 и Maxifectine-56 (оба Unifect Group, Россия) проводили в культуре CFTE290⁺ при 80–90% конфлюентности в 6- (4 мкг плазмиды на лунку) или 12-луночном планшете (1 мкг плазмиды на лунку) согласно протоколу производителя. В работе использовали два соотношения ДНК:реагент — 1:2 и 1:4. Ростовую среду меняли через 3–6 часов после трансфекции.

Для электропорации клетки CFTE290⁺ или НЕК293N в количестве 4×10^5 ресуспендировали в 400 мкл буфера для электропорации (Eppendorf, Германия) и проводили электропорацию в 2 мм кюветах (Eppendorf, Германия) при разном напряжении (150 В/мм, 200 В/мм, 300 В/мм) в течение 50 мкс с использованием электропоратора Multiporator (Eppendorf, Германия), после чего рассеивали по лункам 6-луночных планшетов.

Кальций-фосфатную трансфекцию клеток CFTE290⁺ проводили в лунках 12-луночных планшетов при 80–90% конфлюентности. За 1 час до трансфекции ростовую среду в лунках меняли на DMEM без сыворотки с добавлением 4 мМ L-глутамина. Непосредственно перед трансфекцией готовили реакцию преципитации: смешивали воду, раствор плазмиды (1 мкг на лунку) и 1М CaCl₂ (250 мМ), затем к полученной смеси добавляли равный объем 2хHBS (280 мМ NaCl, 1,5 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ HEPES, 10 мМ KCl, 12 мМ D-глюкозы). После этого раствор быстро перемешивали и добавляли из расчета 100 мкл на лунку 12-луночного планшета. Все используемые растворы были холодными (+4°C). Через 1, 2, 4 или 6 часов после трансфекции среду меняли на полную ростовую, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки.

Для оценки выживаемости клетки CFTE290⁺ в количестве 10^5 ресуспендировали в 100 мкл гипосмолярного буфера для электропорации и проводили электропорацию без плазмиды в 1 мм кюветах (Eppendorf, Германия) при разных комбинациях напряжения (50 В/мм, 75 В/мм, 100 В/мм, 150 В/мм, 200 В/мм, 300 В/мм) и длительности удара (40, 45 и 50 мкс) с использованием электропоратора Multiporator, после чего оценивали количество погибших клеток путем окрашивания 0,1% рас-

твором трипанового синего в растворе 0,9% NaCl (все ПанЭко, Россия) после инкубации 10 мин при 37°C в камере Горяева (МиниМед, Россия).

В исследовании использовали среднее, стандартное отклонение и стандартную ошибку среднего. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения MS Excel 2007 (Microsoft, США).

Результаты

Подбор оптимальных условий трансфекции клеточной культуры CFTE290⁺ начали с липофекции. В работе использовали несколько реагентов для трансфекции от разных производителей для того, чтобы выбрать наиболее эффективный для клеточной культуры CFTE290⁺. Обычно производители рекомендуют оптимизировать соотношение плазмидной ДНК и реагента для увеличения эффективности трансфекции каждой конкретной культуры. Мы использовали 4 реагента в двух соотношениях ДНК:реагент — 1:2 и 1:4. Эксперименты со всеми реагентами проводили параллельно в трех повторах при 90–100% конфлюентности клеток. Как видно на рис. 1, наиболее эффективным реагентом оказался Метафектен (Metafectene) в соотношении 1:2 (эффективность 15,88%). Остальные условия продемонстрировали заметно худшую эффективность — доля клеток, экспрессирующих GFP, составила от 5,11% до 7,48%.

Дальнейшую оптимизацию условий липофекции проводили только с использованием Метафектена в соотношении ДНК:реагент 1:2. Согласно протоколу производителя, эффективность трансфекции адгезивных культур можно увеличить, если производить трансфекцию свежерассеянных клеток, которые еще не успели адгезироваться. Действительно, эффективность липофекции свежерассеянных клеток была выше, однако в данном эксперименте эффективность трансфекции клеток даже в суспензии оказалась ниже (12,31%), чем в предыдущем эксперименте с адгезированными клетками (15,88%), что указывает на плохую воспроизводимость метода (рис. 2). Низкая эффективность и плохая

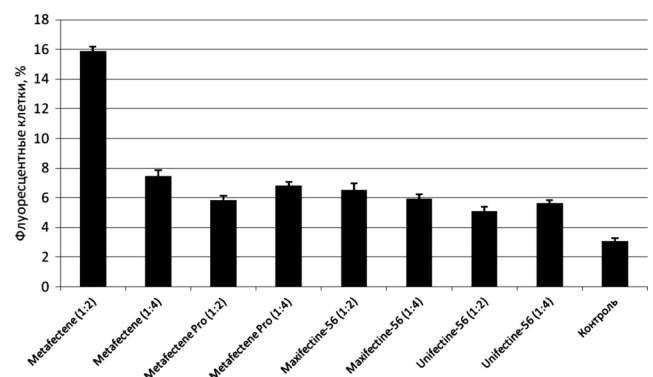


Рис. 1. Эффективность липофекции CFTE290⁺ плазмидой pEGFP-N1. В скобках указано соотношение ДНК:реагент. Данные приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего (n = 3).

воспроизводимость метода подтверждена повторными экспериментами, в том числе с плазмидой в различных концентрациях и с разной глубиной очистки для исключения снижения эффективности липофекции из-за возможных загрязнений плазмиды (рис. 2).

Из проведенных экспериментов видно, что эффективность липофекции культуры CFTE290⁻ плазмидой pEGFP-N1 очень низкая и плохо воспроизводима, поэтому следующим этапом стал подбор оптимальных условий электропорации.

Анализ выживаемости клеток при различных условиях электропорации без плазмиды показал, что клетки хорошо переносят процедуру в широком диапазоне условий (таблица), однако при электропорации клеток с разным количеством плазмиды pEGFP-N1 при разных условиях получали один и тот же результат — гибель практически всех клеток, за исключением случая с трансфекцией малого количества плазмиды — 0,1 мкг на 4*10⁵ клеток при 300 В/мм, 50 мкс. Однако в последнем случае эффектив-

ность трансфекции была крайне низкой — единичные клетки (данные не представлены). При электропорации клеточной линии HEK293N этой же плазмидой получена 50% эффективность трансфекции при минимальной гибели клеток (данные не представлены). Это указывает на неприменимость электропорации для культуры CFTE290⁻ и обусловлено высокой чувствительностью клеток данной культуры к электропорации в сочетании с большим количеством чужеродной ДНК.

Таблица

Выживаемость клеток CFTE290⁻ при электропорации в гипоосмолярном буфере без плазмиды

Длительность удара	Напряжение					
	50 В/мм	75 В/мм	100 В/мм	150 В/мм	200 В/мм	300 В/мм
50 мкс	91%	87%	97%	89%	79%	67%
45 мкс	92%	92%	93%			
40 мкс	87%	80%	91%			

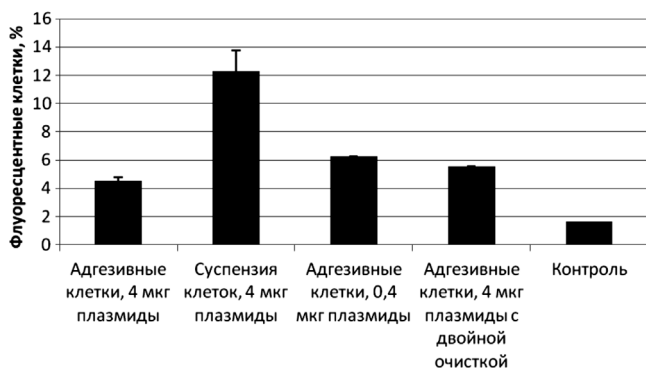


Рис. 2. Эффективность липофекции CFTE290⁻ плазмидой pEGFP-N1. Данные приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего.

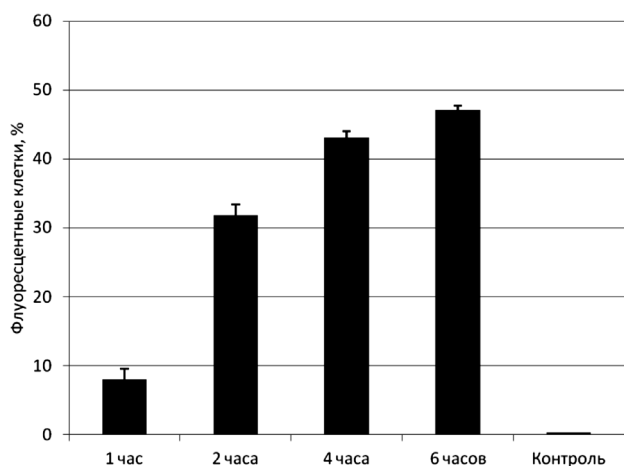


Рис. 3. Эффективность кальций-фосфатной трансфекции культуры CFTE290⁻ плазмидой pEGFP-N1 в зависимости от времени инкубации в ростовой среде, содержащей преципитат фосфата кальция с плазмидной ДНК. Данные приведены как среднее со стандартной ошибкой среднего (n = 2).

Очень высокая смертность и низкая эффективность трансфекции при «мягких» условиях электропорации не позволяют использовать этот метод для трансфекции культуры CFTE290⁻.

Кальций-фосфатная трансфекция является одним из самых первых методов, разработанных для увеличения проникновения ДНК в клетки [10], однако в настоящее время она считается менее эффективной, по сравнению с липофекцией и электропорацией [9]. Тем не менее, мы проверили её эффективность для культуры CFTE290⁻, которая была иммортализована именно этим методом [11]. Стандартные условия кальций-фосфатной трансфекции с использованием 1 мкг плазмиды pEGFP-N1 показали, что она действительно наиболее эффективна для данной культуры. Наибольшая эффективность наблюдается при смене ростовой среды через 6 часов после трансфекции. В этом случае эффективность составила 46,3—48,0% (рис. 3), что было подтверждено во всех последующих экспериментах (данные не приводятся).

Заключение

Показано, что клеточная культура CFTE290⁻ не переносит электропорацию, липофекция как метод трансфекции также является низкоэффективным способом доставки плазмиды. Наибольшую эффективность (46—48%) продемонстрировала кальций-фосфатная трансфекция. Метод отличается простотой, невысокой стоимостью, высокой эффективностью и хорошей воспроизводимостью. Высокая эффективность метода позволяет трансфицировать плазмиды CRISPR/Cas9 для их дальнейшей сравнительной характеристики в целях оптимизации геномного редактирования мутации F508del в гене *CFTR*.

Список литературы

1. Whiting P, Al M, Burgers L, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2014 Mar;18(18):1-106.
2. Mayer M. Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the 'breakthrough'. *Evid Based Med.* 2016 Jun;21(3):83-86.
3. Cholon DM, Esther CR Jr, Gentzsch M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Expert Rev Precis Med Drug Dev.* 2016;1(3):235-243.
4. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6;93(3):1156-1160.
5. Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(12):e82.
6. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet.* 2014 Sep 15;23(R1):R40-46.
7. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281-2308.
8. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002 Jun;19(6):575-606.
9. Kaestner L, Scholz A, Lipp P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015 Mar 15;25(6):1171-1176.
10. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973 Apr;52(2):456-467.
11. Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993 May;8(5):522-529.

Optimization of transfection for CFTE29o⁻ cell culture to develop editing of F508del mutation in *CFTR* gene

Smirnikhina S.A.¹, Bannikov A.V.¹, Lavrov A.V.^{1,2}

¹ — Laboratory of Mutagenesis, Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

² — The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

Genome editing technologies, including the newly appeared CRISPR/Cas9, are the most promising for development of etiotropic treatment of cystic fibrosis. Traditional transfection methods are commonly used to deliver components of CRISPR/Cas9 system. We aimed at optimizing non-viral delivery of plasmid pEGFP-N1 into human tracheal epithelial cells CFTE29o⁻ with homozygous F508del mutation. Efficiency of lipofection with various reagents, Metafectene, Metafectene Pro, Unifectine-56 and Maxifectine-56, was very low and poorly reproducible. Electroporation, even in «soft» conditions, led to high cell mortality. Calcium phosphate transfection turned out to be suitable for CFTE29o⁻ showing efficiency of 46.3–48.0%. High efficacy of this method allows to transfect CRISPR/Cas9 plasmids for their further comparative characterization in order to optimize genome editing of F508del mutation in *CFTR* gene.

Key words: CFTE29o⁻, Electroporation, Transfection, Gene Transfer Techniques, Green Fluorescent Proteins