

## Получение опухолевых линий A549 и MCF7 с нокаутом гена опухолевого супрессора TP53 с помощью CRISPR/Cas9

Хамидуллина А.И.<sup>1</sup>, Гандалипов Э.Р.<sup>2</sup>, Абраменко Я.Е.<sup>1</sup>, Чернов К.В.<sup>2</sup>, Кирюхина Т.А.<sup>1</sup>, Брутер А.В.<sup>1</sup>, Татарский В.В.<sup>1</sup>

1 – Институт биологии гена Российской академии наук  
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

2 – Национальный исследовательский университет ИТМО  
197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, лит. А

Опухолевой супрессор p53 является центральным звеном защиты клетки от злокачественной трансформации. Мутации кодирующего гена *TP53* наблюдаются приблизительно в половине опухолей человека и способствуют не только опухолевой прогрессии, но также устойчивости или чувствительности к противоопухолевым препаратам. Получение изогенных линий, имеющих разный статус *TP53*, необходимо не только для исследования его роли, но и для скрининга новых противоопухолевых препаратов и их комбинаций. Получение изогенных моделей с помощью системы CRISPR/Cas9 часто связано с одноклеточным клонированием, что приводит к клональным эффектам из-за гетерогенности опухолевых культур. В данной работе описано получение новых нокаутов *TP53* в линиях MCF7 и A549 с помощью системы CRISPR/Cas9 и отбора по устойчивости к нутлину-3, позволяющей отбирать нокаутные клетки без этапа клонального отбора. Фенотипически нокаут был подтвержден по полному отсутствию белка p53, снижению экспрессии p53-зависимого гена *CDKN1A* и изменению чувствительности к ДНК-повреждающим противоопухолевым препаратам.

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9; онкосупрессор p53; нокаут гена *TP53*; рак молочной железы; рак лёгких.

**Для цитирования:** Хамидуллина А.И., Гандалипов Э.Р., Абраменко Я.Е., Чернов К.В., Кирюхина Т.А., Брутер А.В., Татарский В.В. Получение опухолевых линий A549 и MCF7 с нокаутом гена опухолевого супрессора *TP53* с помощью CRISPR/Cas9. *Медицинская генетика* 2023; 22(11): 27-34.

**Автор для корреспонденции:** Хамидуллина А.И.; e-mail: 94alvina@gmail.com

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00990, <https://rscf.ru/project/22-24-00990/>.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 03.11.2023

## Creation of A549 and MCF7 tumor sublines with knockout of TP53 using CRISPR/Cas9

Khamidullina A.I.<sup>1</sup>, Gandalipov E.R.<sup>2</sup>, Abramenko Y.E.<sup>1</sup>, Chernov K.V.<sup>2</sup>, Kirukhina T.A.<sup>1</sup>, Bruter A.V.<sup>1</sup>, Tatarskiy V.V.<sup>1</sup>

1 – Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences  
34/5 Vavilova st., Moscow, 119334, Russian Federation

2 – Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies, ITMO University  
49, bldg. A, Kronverksky Pr., St. Petersburg, 197101, Russian Federation

The tumor suppressor p53 is the central point of cellular defense against oncogenic transformation. Mutations of *TP53* gene are present in approximately half of human tumors and promote not only tumor progression, but also resistance to anticancer drugs. Creation of isogenic models, differing in their *TP53* status, is valuable not only for studying its role in carcinogenesis, but also for screening of anticancer drugs and their combinations. Establishment of isogenic models using the CRISPR/Cas9 system is usually done through single cell cloning, which can lead to clonal effects, because of heterogeneity of the cell cultures. In this article we present the process of creation of new knockout cell sublines of MCF7 and A549 using CRISPR/Cas9 and selection using nutlin-3, which allows selecting cell sublines without clonal selection. Phenotypically the knockout of *TP53* was confirmed by total absence of p53, absence of induction of p53-dependent gene *CDKN1A*, and shift in sensitivity to DNA-damaging drugs.

**Key words:** Tumor Suppressor Protein p53, Gene Knockout, Breast Cancer, Lung Cancer, CRISPR/Cas9.

**For citation:** Khamidullina A.I., Gandalipov E.R., Abramenko Y.E., Chernov K.V., Kirukhina T.A., Bruter A.V., Tatarskiy V.V. Creation of A549 and MCF7 tumor sublines with knockout of *TP53* using CRISPR/Cas9. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(11): 27-34. (In Russ.)

**Corresponding author:** Khamidullina A.I.; e-mail: 94alvina@gmail.com

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-24-00990, <https://rscf.ru/project/22-24-00990/>.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

**Accepted:** 03.11.2023

## Введение

Транскрипционный фактор p53 является важнейшим белком-онкосупрессором, предотвращающим возникновение и развитие опухолей. Он регулирует экспрессию многих генов напрямую, связываясь с определёнными геномными последовательностями, и через не прямые механизмы [1]. В основном, p53 оказывает влияние на процессы прогрессии клеточного цикла, репарации повреждений ДНК, апоптоза, аутофагии, старения, гликолиза [2]. В нормальных клетках белок p53 поддерживается на низком уровне за счёт протеасомной деградации, главным образом, E3 убиквитин-лигазой MDM2 и перелокализации из ядра в цитоплазму [3]. При активации белка в результате про-онкогенных стрессов (например, ДНК повреждения) p53 стабилизируется за счёт пост-трансляционных модификаций, прежде всего фосфорилирования и ацетилирования, и транслоцируется в ядро, где он связывается со своими респонсивными элементами, активируя и репрессируя экспрессию зависимых от него генов.

P53 прежде всего регулирует гены, ответственные за ДНК-репарацию, клеточный цикл и апоптоз, позволяя клетке, или, остановившись в клеточном цикле, репарировать ДНК повреждение, или вызвать программируемую клеточную гибель, способствуя элиминированию мутировавших клеток. Остановка клеточного цикла происходит, прежде всего, за счёт экспрессии гена *CDKN1A*, кодирующего белок p21<sup>Cip1</sup>, который ингибирует активность CDK1 и CDK2-циклиновых комплексов [4]. В случае, если повреждение ДНК слишком значительно, p53 увеличивает экспрессию про-апоптотических генов, таких как *PUMA*, *NOXA*, *BAX* и *FASLG* [5]. Выбор между индукцией остановки клеточного цикла и активацией программируемой клеточной гибели определяется паттерном пост-трансляционных модификаций, прежде всего ацетилирования.

Мутации p53 являются наиболее распространёнными в человеческих опухолях. По разным данным до 50% опухолей несут в себе мутации в гене *TP53*, продуктом которого является p53 [6]. Большинство мутаций не приводит к полной делеции гена, но нарушает его функцию. По данным базы данных COSMIC, наиболее распространённые мутации *TP53* – миссенс замены (62,83%), нонсенс замены (10,84%) и делеции со сдвигом рамки считывания (5,34%) [7]. Мутации *TP53* разделяют на так называемые структурные и ДНК-контактные мутации. Структурные мутации приводят к изменению конформации белка, уменьшая его термостабильность и нарушая фолдинг, в ре-

зультате чего белок теряет способность связываться с ДНК. Наиболее распространёнными среди таких мутаций являются замены R175H, R249S, G245S, Y220C [8]. ДНК-контактные мутации (R273H, R273C, R248W) локализованы в ДНК-связывающем домене и напрямую препятствуют связыванию p53 с белком. Ввиду того, что p53 действует в виде тетрамера, точковые мутации часто приводят не только к инактивации самого мутантного белка, но и входящего в тетрамер белка дикого типа (доминантно-негативные мутанты) [9].

Мутации *TP53* часто приводят не только к потере активности белка, но и часто к приобретению новых про-онкогенных функций. Это явление настолько распространено, что первые годы после открытия *TP53* считался онкогеном. Мутированный p53 может связываться с новыми респонсивными элементами [10], активирует транскрипцию [11] и такие онкогенные белки, как Akt и Ras [12].

Мутации *TP53* способствуют не только опухолевой прогрессии и трансформации, но и устойчивости к химиотерапии, прежде всего, к ДНК-повреждающим агентам. Потеря активности p53 приводит к снижению экспрессии про-апоптотических генов, помимо вышеупомянутых *PUMA*, *NOXA*, *BAX*, также прокаспазы-3 [13], и повышению экспрессии анти-апоптотических генов, таких как *BCL2* и *BCL2L1* [14]. Так, в опухолях с мутациями *TP53* часто повышена экспрессия генов мультилекарственной устойчивости, таких как *ABCB1* (продуктом которого является MDR1), что способствует устойчивости к таким препаратам, как доксорубин [15]. Инактивация p53 приводит к повышению активности сигнального пути EGFR и киназы MAPK p38, способствуя устойчивости к митотическому ингибитору паклитакселу [16].

Мутации *TP53* являются важным фактором не только для развития опухолей, но и для их лечения. Скрининг противоопухолевых лекарств, которые одинаково эффективны для опухолей с p53 дикого типа и опухолей с мутированным p53, является важной задачей. *TP53*-статус играет значимую прогностическую роль для выбора лечения рака лёгких [17] и рака молочной железы (РМЖ) [18].

В связи с этим целью данного исследования являлось получение изогенных клеточных линий с делецией *TP53* и изучение их свойств. Были поставлены следующие задачи: установить условия успешного получения сублиний MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека) и A549 (аденокарцинома лёгкого человека) с нокаутом *TP53* с помощью технологии CRISPR/Cas9 и доказать подавление p53 и p53-зависимых генов в полученных линиях.

## Методы

### Клеточные линии

В работе были использованы линии опухолевых клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы) и A549 (аденокарцинома лёгкого). Обе линии из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC). Все клетки культивировались в ростовой среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция), 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко) при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для экспериментов использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста.

### Получение сублиний с нокаутом TP53

Для получения нокаутов использовалась плазмида на основе вектора PX458 (предоставлена Feng Zhang (Addgene plasmid #48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID:Addgene\_48138) [19] с распознающей последовательностью гидовой РНК CGACGCTAGGATCTGACTG, соответствующей экзону 2 гена TP53. Транфекция клеток проводилась с помощью реагента GenJect 39 (Molecula, Россия). Спустя двое суток проводили сортировку клеток на приборе BD FACSAria™ II system (BD Biosciences, США) для выделения GFP-позитивной популяции, а еще через три дня обрабатывали клетки реагентом Nutlin-3 (нутлин-3, S1061, Selleck Chemicals, США) в концентрации 10 мкМ, что вызывало гибель клеток с интактным p53. После отбора с нутлином-3 в селеквантах анализировали уровень p53 с помощью иммуноблоттинга или рассаживали на поклеточное клонирование для получения одноклеточных клонов.

### Иммуноблоттинг

Для проведения иммуноблоттинга клетки, посаженные в количестве  $5 \times 10^5$  (подсчёт клеток проводили с помощью камеры Горяева) в 5 мл ростовой среды в 6 см чашках Петри (SPL Life Sciences, Южная Корея), отбирали и лизировали в течение 30 минут на льду в 100 мкл буфера RIPA, содержащего 50 mM трис-HCl pH 8,0, 150 mM хлорида натрия, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), 1% NP-40, 2 mM фенилметилсульфонил фторида (VWR Life Science) и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, США). Общую концентрацию белков в лизированных образцах определяли методом Брэдфорда. Образцы наносились в полиакриламидный гель для последующего электрофоретического разделения (50 мкг на образец) в трис-глициновом буфере,

содержащем 0,1% SDS. Далее с геля белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,2 мкм (Bio-Rad, США). Мембраны инкубировали в 5% нежирном молоке в трис-солевом буфере (TBS) в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего с первичными антителами против p53 (клон DO-7, #48818, Cell Signaling Technology, США) и β-актина (AC004, ABclonal, США), разведёнными в трис-солевом буфере с добавлением Tween 20 (TBST; 1:2000) и 1% бычьего сывороточного альбумина, в течение ночи при +4°C. Затем мембраны отмывали в TBST и в течение часа инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (#7076, Cell Signaling Technology), при комнатной температуре. Сигнал детектировали с помощью субстрата Clarity Western ECL (Bio-Rad) на гель-документирующей системе iBright FL1500 Imaging System (Invitrogen, США).

### Цитотоксичность

Для определения ответа клеток на действие ДНК-повреждающих препаратов бендамустина (Astellas Pharma, Япония), блеомицина (Nippon Kayaku, Япония), 5-фторурацила (Верофарм, Россия), паклитаксела, иринотекана, карбоплатина, эпопозида (Teva Pharmaceutical Industries, Израиль), доксорубина (Sigma-Aldrich) применяли стандартный МТТ-тест. Клетки культивировали в 96-луночных планшетах (SPL Life Sciences) в концентрации  $5 \times 10^3$  на лунку. Количество живых клеток определяли с помощью МТТ-теста после 72-часовой инкубации клеток в присутствии различных доз вышеуказанных ДНК-повреждающих агентов. Контрольной группой в опыте служили клетки, культивируемые без добавления тестируемых веществ (с добавлением эквивалентной концентрации ДМСО) в нормальных условиях. После окончания инкубации добавляли тетразолиевый краситель (ПанЭко) до конечной концентрации 0,5 мг/мл, и клетки инкубировали 2 часа при 37°C до возникновения фиолетовой окраски (образования формазана). Далее аккуратно удаляли среду из лунок и в каждую лунку добавляли 0,1 мл ДМСО. Клетки с ДМСО инкубировали в течение 30 минут, равномерно перемешивая на орбитальном шейкере с целью высвобождения формазана из клеток. Значения абсорбции определяли при длине волны 570 нм на спектрофотометре CLARIOstar® Plus (BMG LABTECH, Германия).

### ОТ-ПЦР в реальном времени

Для изучения ответа клеток на ДНК-повреждающие агенты, проводилась ОТ-кПЦР по гену CDKN1A. Клетки в количестве  $2 \times 10^5$  в 2 мл ростовой среды высаживались

на 3,5 см чашки Петри (SPL Life Sciences), и после прикрепления к ним добавляли ДНК-повреждающие агенты. Через 24 часа клетки открепляли, лизировали в растворе ExtractRNA (Евроген, Россия) в течение 10 минут, после чего проводили экстракцию РНК согласно протоколу производителя. Осадок РНК растворяли в 20 мкл воды, очищенной от нуклеаз (Thermo Fisher Scientific, США), измеряли концентрацию при помощи нанофотометра Implen N50 (Implen, США) и использовали 2 мкг РНК от каждого образца для реакции обратной транскрипции. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реактивов MMLV RT kit (Евроген) согласно протоколу производителя. После проведения обратной транскрипции 2 мкл кДНК каждого образца было немедленно использовано для проведения кПЦР с помощью 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген) согласно протоколу производителя, в качестве нормировочного гена использовался *GAPDH*. Последовательность праймеров к *CDKN1A*: F-AGTCAGTTCSTTGTGGAGCC, R-CATTAGCGCATCACAGTCGC, последовательность праймеров к *GAPDH*: F-AGAGATGATGACCSTTTGGC, R-CCATCACCATCTTCCAGGAGCG. Проводилась кПЦР на приборе CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad), в качестве меры изменения экспрессии генов высчитывался показатель  $\Delta\Delta C_q$ . Статистическая об-

работка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и GraphPad Prism.

#### Иллюстрации

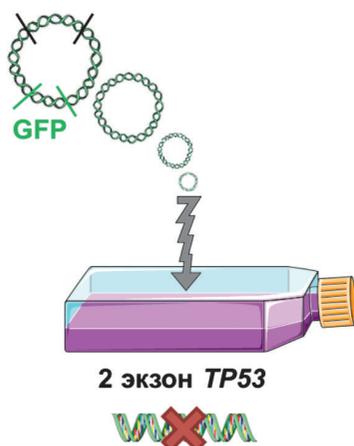
Для создания схемы отбора (рис. 1) использовались шаблоны Servier Medical Art. Исходные шаблоны находятся в свободном доступе и лицензированы Creative Commons Attribution 3.0 (<https://smart.servier.com/>).

#### Результаты

Для получения сублиний A549 и MCF7 с нокаутом *TP53* (A549 *TP53*<sup>-/-</sup>, MCF7 *TP53*<sup>-/-</sup>) клетки исходных родительских линий (A549 WT (wild type, дикий тип), MCF7 WT) трансфицировали плазмидой, кодирующей Cas9, и гидовой РНК против второго экзона гена *TP53*. Спустя 48 ч клетки сортировали, отбирая популяцию клеток с высоким уровнем флуоресценции GFP. Эффективность трансфекции оценивалась как % GFP-положительных к общему числу клеток и составила порядка 70% для обеих линий, из которых были отобраны клетки с наиболее интенсивным свечением GFP. Далее полученные отсортированные клетки инкубировали в обычных условиях в ростовой среде до достиже-

### Вектор PX458

#### гидовая РНК

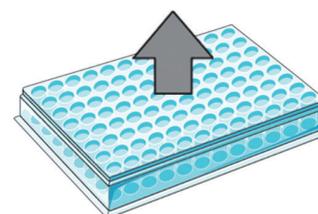
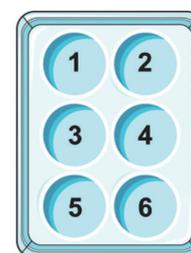


#### Трансфекция

Изображение сортера с сайта <https://www.bdbiosciences.com>



#### Сортинг



#### Поклеточный отбор

**Рис. 1.** Схема получения клеток с нокаутом *TP53* с помощью CRISPR/Cas9 системы с последующей сортировкой и поклеточной селекцией клонов.

**Fig. 1.** Scheme for obtaining *TP53* knockout cells using the CRISPR/Cas9 system, followed by sorting and cell-by-cell selection of clones.

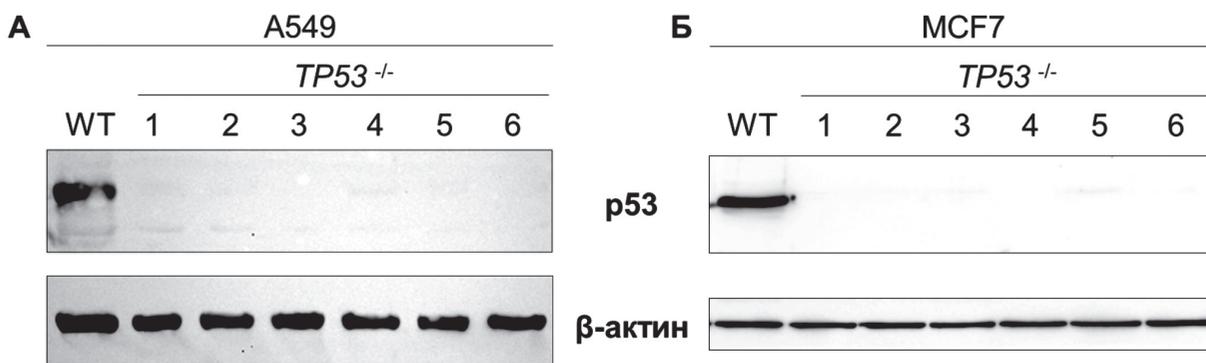
ния ими монослоя. При рассадке к клеткам добавляли нутлин-3, ингибитор p53-MDM2 взаимодействия. Таким образом, ожидалось, что p53-отрицательные клетки будут иметь преимущество, в то время как клетки, в которых сохранился p53, будут погибать. Добавление нутлина-3 способствовало увеличению эффективности отбора клеток, в которых произошёл нокаут *TP53*. Часть отобранных описанным путём клеток была заморожена, другая часть была рассеяна для поклеточной селекции клонов в 96-луночном планшете. Схема получения клеток с нокаутом *TP53* представлена на рис. 1.

После проведения поклеточного клонирования каждой линии мы отобрали по 6 селектантов для определения уровня p53 в образцах. Во всех шести отобранных образцах A549 и 6 образцах MCF7 наблюдалось полное отсутствие p53 (рис. 2).

Высокая эффективность нокаутирования *TP53* при отборе с нутлином-3 привела нас к решению проверить подавление p53 в клетках до стадии поклеточной селекции. На примере клеток MCF7, отобранных по-

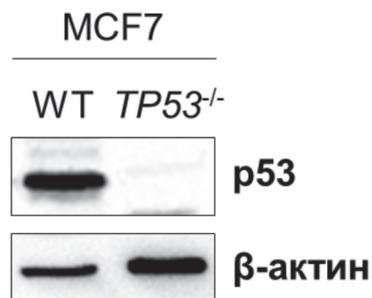
сле трансфекции и сортировки, но до стадии моноклонального отбора, мы определили, что отбор с нутлином-3 достаточен для элиминации клеток с неполным нокаутом *TP53* в этой популяции (рис. 3). Притом более ранние попытки получить сублинии с нокаутом *TP53* не показывали полного подавления целевого гена во всей клеточной популяции. Вероятно, это связано с выбранным временем для добавления нутлина-3, который в случае A549 и MCF7 был добавлен к клеткам одновременно с их рассадкой, т.е. до их прикрепления.

Далее, мы проверили ответ клеток A549 WT и сублинию с нокаутом *TP53* на воздействие ДНК-повреждающими соединениями. Все они вызывают повреждение ДНК, в ответ на которое активируется p53. Результаты МТТ-теста показали, что концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) большинства соединений в клетках с нокаутом *TP53* увеличилась для бендамустина, ирентекана, карбоплатина и доксорубицина и уменьшалась для этопозида и 5-фторурацила (таблица).



**Рис. 2.** Подтверждение эффективного подавления синтеза белка p53 в моноклональных клеточных селектантах линий A549 (А) и MCF7 (Б). Иммуноблоттинг.

**Fig. 2.** Confirmation of effective inhibition of p53 protein synthesis in monoclonal sublines of A549 (A) and MCF7 (B) cell lines. Immunoblotting.

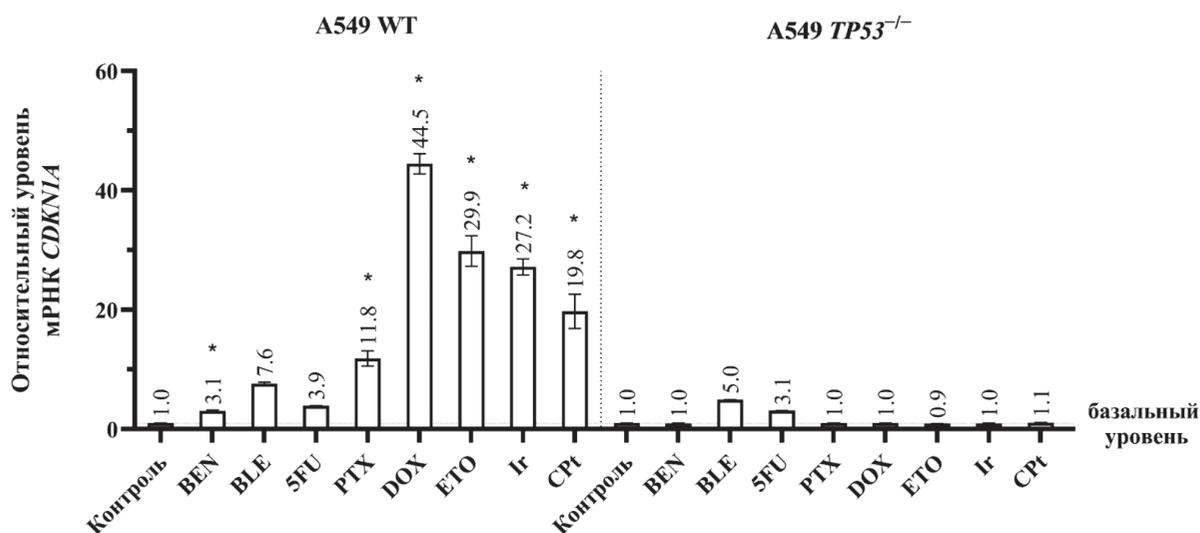


**Рис. 3.** Подтверждение эффективного подавления синтеза белка p53 в трансфицированных MCF7, обработанных 10 мкМ нутлина-3. Иммуноблоттинг.

**Fig. 3.** Confirmation of effective inhibition of p53 protein synthesis in transfected MCF7 cells treated with 10  $\mu$ M nutlin-3. Immunoblotting.

Для доказательства ингибирования p53-зависимых генов была проведена ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки экспрессии одного из основных генов, зависящих от p53 – *CDKN1A* (продуктом яв-

ляется p21<sup>Cip1</sup>). При действии ДНК-повреждающих агентов экспрессия *CDKN1A* значительно повышалась в клетках дикого типа, но не в клетках с нок-аутом (рис. 4).



**Рис. 4.** Индукция экспрессии мРНК *CDKN1A* в ответ на действие различных ДНК-повреждающих агентов в клетках линии A549 дикого типа и A549 TP53<sup>-/-</sup>.

**Примечание:** BEN — 150 мкМ бендамустин, BLE — 80 мкМ блеомицин, 5FU — 750 нМ 5-фторурацил, PTX — 5 нМ паклитаксел, DOX — 100 нМ доксорубин, ETO — 200 нМ этопозид, Ir — 9 мкМ иринотекан, CpT — 24 мкМ карбоплатин. Знаком (\*) отмечены образцы, для которых отличия между диким типом и TP53<sup>-/-</sup> были значимы согласно t-критерию Уэлча (p<0,05).

**Fig. 4.** Induction of *CDKN1A* mRNA expression in response to various DNA-damaging agents in wild-type A549 and A549 TP53<sup>-/-</sup> cells.

**Note:** BEN - 150 μM bendamustine, BLE - 80 μM bleomycin, 5FU - 750 nM 5-fluorouracil, PTX - 5 nM paclitaxel, DOX - 100 nM doxorubicin, ETO - 200 nM etoposide, Ir - 9 μM irinotecan, CpT - 24 μM carboplatin. The (\*) sign indicates samples for which the differences between the wild type and TP53<sup>-/-</sup> were significant according to Welch's t test (p < 0.05).

**Таблица.** Сравнение IC<sub>50</sub> основных ДНК-повреждающих агентов в клетках A549

**Table.** Comparison of IC<sub>50</sub>s of major DNA-damaging agents in A549 cells

	IC <sub>50</sub> ± CO		P (t-критерий Уэлча)
	A549 WT	A549 TP53 <sup>-/-</sup>	
Бендамустин	116,9 ± 3,9 мкМ	184,8 ± 6,5 мкМ	<0.0004
Блеомицин	1,08 ± 0,2 мкМ	1,33 ± 0,3 мкМ	стат. нед.
5-фторурацил	409,8 ± 32,12 нМ	293,5 ± 29,4 нМ	<0,01
Паклитаксел	1,29 ± 0,4 нМ	1,86 ± 0,3 нМ	стат. нед.
Доксорубин	25,3 ± 3,4 нМ	51,4 ± 7,2 нМ	<0,01
Этопозид	0,19 ± 0,1 мкМ	1,06 ± 0,3 мкМ	<0,05
Иринотекан	6,12 ± 0,7 мкМ	9,46 ± 0,5 мкМ	<0,0003
Карбоплатин	27,1 ± 4,3 мкМ	49,3 ± 8,9 мкМ	<0,05

**Примечание:** CO — стандартное отклонение, стат. нед. — статистически недостоверное различие.

**Note:** SD — standard deviation, stat. weeks — statistically insignificant difference.

## Обсуждение

Скрининг цитотоксических веществ на опухолевых линиях различного гистогенеза является необходимым этапом разработки новых противоопухолевых лекарств. С разработкой новых таргетных препаратов и использованием генетических панелей и полногеномного секвенирования выбор лечения осуществляется не только по гистологическому типу опухоли, но и, прежде всего, присутствию определенных драйверных мутаций в онкогенах и опухолевых супрессорах. Статус *TP53* является важным маркером, определяющим прогноз во многих опухолях [1] и стратегию лечения в отдельных типах опухолей. Мутации *TP53* часто приводят к резистентности, к лечению и поэтому анализ влияния статуса *TP53* на чувствительность клеток к противоопухолевым препаратам является важным этапом скрининга [20]. Однако распространенность описанных изогенных линий с разным статусом *TP53*, используемых в скрининге ограничена, так как большинство таких линий получены для конкретных фундаментальных исследований. Большинство скрининговых исследований ограничивается линией карциномы толстой кишки HCT116 и ее изогенной линией HCT116 p53<sup>-/-</sup>. В нашей работе был получен ряд клонов линий MCF7 и A549 с нокаутом *TP53* с помощью CRISPR/Cas9 (рис. 2). Данные линии были выбраны потому, что в обеих присутствуют две копии гена *TP53* дикого типа (по данным базы данных Depmap.org). Также нами была получена линия MCF7 с нокаутом *TP53* без клеточного клонирования, в которой не присутствуют клональные эффекты, которые могут влиять на результаты исследований (рис. 3). Эффект подавления p53 был подтвержден по индукции p53-зависимого гена *CDKN1A* при действии ДНК-повреждающих агентов. В клетках с p53 дикого типа наблюдалась сильная индукция *CDKN1A* при действии всех исследованных веществ, особенно доксорубицина, этопозида, иринотекана и карбоплатина. В клетках с нокаутом p53 индукция отсутствовала для всех веществ, за исключением блеомицина и 5-фторурацила, где она тем не менее была снижена по сравнению с диким типом (рис. 4).

Фенотипическое проявление нокаута *TP53* на чувствительность к цитотоксическим веществам было отмечено почти для всех исследованных веществ, но редко превышало двукратное изменение IC<sub>50</sub>. Наиболее значительно изменилась чувствительность к доксорубину (увеличение в два раза) и этопозиду (снижение в 5 раз) (табл. 1), что, вероятно, связано с разным

паттерном индукции других p53-зависимых генов этими веществами.

Таким образом, в результате исследования нам удалось изучить характеристики сублиний опухолевых клеток MCF7 и A549 с нокаутом гена опухолевого супрессора *TP53*. Нами показано, что для успешного получения сублиний MCF7 и A549 с нокаутом *TP53* с помощью технологии CRISPR/Cas9 оптимально использовать дополнительный отбор клеток с помощью сортировки по уровню флуоресценции GFP в трансфицированных клетках. Более того, использование нутлина-3, ингибитора p53-MDM2 взаимодействия, обеспечивает эффективность выведения сублиний с нокаутом *TP53*, что позволяет избежать этапа клеточного отбора. Данные условия позволяют получить стабильные линии клеток с нокаутом *TP53* и подавленными p53-зависимыми генами. Вместе использованные подходы позволяют оптимизировать методику получения клеточных линий с нокаутом *TP53*, существенно упростив и удешевив технологию.

**Благодарность.** Работа выполнялась с использованием уникальной научной установки «Трансгенбанк» и комплекса для клеточной сортировки на базе FACSAria SORP (программа развития МГУ). Авторы выражают благодарность д.м.н. Штилю А.А. за помощь в приобретении ДНК-повреждающих препаратов для исследования и к.б.н. Поташниковой Д. М. за помощь в сортировке клеток.

**Acknowledgments.** The work was carried out using a unique scientific installation “Transgenbank” and a cell sorting complex based on FACSAria SORP (Moscow State University development program). The authors express their gratitude to Dr. med. Shtilyu A.A. for assistance in purchasing DNA-damaging drugs for research and Ph.D. Potashnikova D.M. for assistance in cell sorting.

## Литература/References

1. Hassin O., Oren M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023 Feb;22(2):127–44.
2. Nag S., Qin J., Srivenugopal K.S., et al. The MDM2-p53 pathway revisited. *J. Biomed. Res.* 2013 Jul;27(4):254–71.
3. Chène P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003 Feb;3(2):102–9.
4. Satyanarayana A., Hilton M.B., Kaldis P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell* 2008 Jan;19(1):65–77.
5. Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):104–13.
6. Hainaut P., Pfeifer G.P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016 Nov 1; 6(11).

7. Tate J.G., Bamford S., Jubb H.C., et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D941–7.
8. Wang H., Guo M., Wei H., et al. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023 Mar 1;8(1):92.
9. Willis A., Jung E.J., Wakefield T., et al. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 2004 Mar 25;23(13):2330–8.
10. Wang B., Xiao Z., Ren E.C. Redefining the p53 response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009 Aug 25;106(34):14373–8.
11. Pfister N.T., Fomin V., Regunath K., et al. Mutant p53 cooperates with the SWI/SNF chromatin remodeling complex to regulate VEGFR2 in breast cancer cells. *Genes Dev.* 2015 Jun 15;29(12):1298–315.
12. Alvarado-Ortiz E., de la Cruz-López K.G., Becerril-Rico J., et al. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:607670.
13. Wong R.P.C., Tsang W.P., Chau P.Y., et al. p53-R273H gains new function in induction of drug resistance through down-regulation of procaspase-3. *Mol. Cancer Ther.* 2007 Mar;6(3):1054–61.
14. Tung M.-C., Lin P.-L., Wang Y.-C., et al. Mutant p53 confers chemoresistance in non-small cell lung cancer by upregulating Nrf2. *Oncotarget* 2015 Dec 8;6(39):41692–705.
15. Cao X., Hou J., An Q., et al. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resist. Updat.* 2020 Mar;49:100671.
16. Park S.-H., Seong M.-A., Lee H.-Y. p38 MAPK-induced MDM2 degradation confers paclitaxel resistance through p53-mediated regulation of EGFR in human lung cancer cells. *Oncotarget* 2016 Feb 16;7(7):8184–99.
17. Steels E., Paesmans M., Berghmans T., et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2001 Oct;18(4):705–19.
18. Ungerleider N.A., Rao S.G., Shahbandi A., et al. Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. *Breast Cancer Res.* 2018 Oct 1;20(1):115.
19. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281–308.
20. Duffy M.J., Synnott N.C., O’Grady S., et al. Targeting p53 for the treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2022 Feb;79:58–67.