

Редактирование генома методом CRISPR/Cas для создания сублинии клеток рака легкого человека A549, нокаутной по гену p21

Персиянцева Н.А.¹, Казанский Д.Б.¹, Татарский В.В.², Замкова М.А.^{1,2}

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

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

Технология CRISPR/Cas, являющаяся наиболее эффективной среди существующих методов редактирования генома, позволяет модифицировать таргетные участки молекулы ДНК и находит применение в различных отраслях биологии, генетики, сельского хозяйства, биотехнологии и медицины. С ее помощью создаются модели клеточных линий, необходимые для исследования роли определенных генов в развитии и терапии злокачественных и других заболеваний. Одним из таких генов является p21 (CDKN1A), регулируемый опухолевым супрессором p53 и негативно контролирующей прогрессию клеточного цикла. Неоднозначное влияние белка p21 на процессы канцерогенеза и ключевое участие в ответе клеток на терапию определяют его как перспективную мишень для исследований в этих областях. В нашей работе мы получили сублинию клеток рака легкого A549, нокаутную по гену p21, с помощью метода CRISPR/Cas. Ее использование планируется в экспериментах по изучению роли белка p21, а также опосредуемых им механизмов влияния других генов, в ответе клеток на терапию онкологических заболеваний, в частности, становлении фенотипа старения при применении низких доз терапии и выхода отдельных клеток из этой стадии (формирование рецидива опухоли), а также определении механизмов возникновения устойчивости опухолевых клеток.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, sgRNA, p21, нокаут, рак, терапия онкологических заболеваний, клеточное старение.

Для цитирования: Персиянцева Н.А., Казанский Д.Б., Татарский В.В., Замкова М.А. Редактирование генома методом CRISPR/Cas для создания сублинии клеток рака легкого человека A549, нокаутной по гену p21. *Медицинская генетика* 2023; 22(11): 35-39.

Автор для корреспонденции: Замкова М. А.; e-mail: zamkovam@gmail.com

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-24-00212, <https://rscf.ru/project/22-24-00212/>.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.11.2023

Genome editing by CRISPR/Cas to generate A549 human lung cancer subline knockout for the p21 gene

Persiyantseva N.A.¹, Kazansky D.B.¹, Tatarskiy V.V.², Zamkova M.A.^{1,2}

1 – National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin
23, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russian Federation

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

The CRISPR/Cas technology, which is the most efficient among the existing genome editing methods, allows modifying target regions of the DNA molecule and is used in various fields of biology, genetics, agriculture, biotechnology, and medicine. Models of cell lines required for studying the role of certain genes in the development and therapy of malignant and other diseases can be created using CRISPR/Cas method. One of such genes is p21 (CDKN1A), which is regulated by the p53 tumor suppressor and negatively controls cell cycle progression. The ambiguous influence of the p21 protein on the processes of carcinogenesis and its key role in the response of cells to therapy make it a promising target for research in these areas. In our work, we obtained a subline of lung cancer cells A549, knockout for the p21 gene, using the CRISPR/Cas method. It is planned to use it in experiments to study the role of the p21 protein, as well as the mechanisms mediated by it, the influence of other genes, in the cell response to cancer therapy. In particular, the formation of the senescence phenotype after treatment with low-dose therapy and the escape of individual cells from this stage (formation of tumor recurrence), as well as determining the mechanisms for the emergence of tumor cell resistance.

Keywords: CRISPR/Cas, sgRNA, p21, knockout, cancer, cancer therapy, cellular aging.

For citation: Persiyantseva N.A., Kazansky D.B., Tatarskiy V.V., Zamkova M.A. Genome editing by CRISPR/Cas to generate A549 human lung cancer subline knockout for the p21 gene. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(11): 35-39. (In Russ.)

Corresponding author: Zamkova M.A.; e-mail: zamkovam@gmail.com

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-24-00212, <https://rscf.ru/project/22-24-00212/>.

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

Accepted: 03.11.2023

Введение

Редактирование генома широко применяется в фундаментальных и прикладных научных исследованиях, в биотехнологии и медицине [1]. Данный метод используется для модификации определенных генов с целью установления их роли в различных процессах, в частности, в развитии онкологических заболеваний; применяется в качестве подхода для терапии генетических болезней [2]; позволяет вносить изменения в геном лимфоцитов *ex vivo* при иммунотерапии рака [3] и др. В исследуемый участок ДНК с помощью специфических нуклеаз вносится двухцепочечный разрыв, который в дальнейшем «застраивается» либо путем негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), либо, при наличии специфической матрицы, с помощью гомологичной репарации (homology-directed repair (HDR)). Таким способом можно внести различные изменения последовательности гена, которые приведут к изменению структуры и функционирования его белкового продукта или к его полному отсутствию (нокаут гена). В настоящее время редактирование ДНК осуществляется с использованием нуклеаз типа «цинковые пальцы» (ZFNs), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и метода CRISPR/Cas. В отличие от первых двух в системе CRISPR/Cas таргетный участок ДНК распознается не белком, а молекулой РНК. Технология CRISPR/Cas является инновационной и обладает преимуществами над ZFNs и TALEN, в частности, более высокой эффективностью и сравнительно более простой процедурой конструкции самой системы [4].

Широко используемой областью применения метода CRISPR/Cas является создание моделей для определения роли того или иного гена в развитии злокачественных процессов, механизмов установления резистентности клеток, а также перепрограммирования транскрипции генов, становления фенотипа старения при действии низких доз химиолучевой терапии и т.п. [5]. Регулятор прогрессии клеточного цикла белок p21 (ген *CDKN1A*) играет ключевую роль в процессах канцерогенеза, поддерживая баланс между пролиферацией и апоптозом [6]. Показано, что он имеет двойное влияние на развитие опухоли [7]. С одной стороны, выступает в качестве опухолевого супрессора, индуцируя апоптоз и снижая рост опухоли *in vitro* [8] и *in vivo* [9], с другой стороны, в ряде работ отмечаются противоположные эффекты p21 на развитие опухоли — активация апоптоза и ингибирование пролиферации клеток при снижении экспрессии гена *p21* [10, 11]. Кроме того, p21

является основным участником развития ответа клеток на терапию — при незначительных повреждениях ДНК (низкие дозы терапии) его уровень повышается, что приводит к остановке деления и развитию стадии клеточного старения [12, 13], тогда как при применении высоких доз терапии происходит снижение уровня p21 и активация апоптоза [14]. Следствием повышения уровня белка p21 является поддержание жизнедеятельности клетки [15], а также развитие устойчивости к терапии [16]. Однако обнаруженное снижение уровня p21 после устранения повреждений, вызванных терапией, имеет негативные для организма последствия, так как коррелирует с возвратом опухолевых клеток к повторному делению с последующим развитием рецидива опухоли [17]. Внесение изменений в экспрессию гена *p21* с помощью редактирования его последовательности может использоваться для комбинированной терапии определенных опухолей с целью улучшения эффективности терапии первой линии.

Целью нашей работы является создание модельной клеточной сублинии рака легкого A549 с нокаутированным геном *p21* с помощью технологии CRISPR/Cas. Данную модель можно использовать не только для изучения роли самого белка p21, но и установления наличия p21-опосредованного механизма влияния других генов и белков, манипуляции с которыми предположительно повысят эффективность противоопухолевой терапии на процессы канцерогенеза, развития ответа клеток на действие химиолучевой терапии, способности подвергшихся терапии клеток к формированию рецидива опухоли и др.

Методы

Ведение клеточных культур. Клетки линии рака легкого A549 культивировали в среде DMEM (C455п, Панэко, Россия), с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (S1810, Biowest, Южная Америка) и комбинации антибиотиков пенициллин-стрептомицин (A065', Панэко, Россия).

Создание конструкции. sgRNA клонировали в вектор pX458 (Addgene plasmid #48138), содержащий последовательность нуклеазы Cas9 и GFP, по сайту рестрикции BbsI. sgRNA к гену *p21* подбирали, используя программу CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Подбор осуществляли таким образом, чтобы сайт для распознавания нуклеазой находился на стыке интрона и экзона (см. результаты). Смысловая и анти-смысло-

вая последовательности sgRNA, отобранной для создания сублинии клеток, приведены ниже:

смысловая: 5'-CACCGTGCAGGCGCCATGTCA GAACCGG-3'

анти-смысловая: 5'-AAACCCGGTTCTGACATGG CGCCTGCAC-3'

К каждой цепи был добавлен соответствующий участок сайта рестрикции. Синтез олигонуклеотидов проводили в компании Евроген (Москва, Россия). Цепи отжигали (95°C – 5сек, 95°C – 1°C/цикл – 70 циклов) для получения двухцепочечной молекулы ДНК и клонировали в указанный выше вектор.

Трансфекция и сортировка клонов. Трансфекцию вектора pX458, содержащего sgRNA, Cas9 и маркер GFP, в клетки A549 осуществляли с помощью реагента липофектамина 3000 (L3000015, Lipofectamine 3000, Invitrogen), согласно протоколу производителя.

Через 48 часов после трансфекции проводили сортировку единичных клеток по маркеру GFP на точном цитофлуориметре (BD FACSAria™ III, США) в плоскодонные 96-луночные планшеты (30196', SPL Lifesciences, Корея). На следующий день клоны под микроскопом оценивали на наличие одиночных клеток (лунки, в которые попали две или более клетки, не брали для дальнейшего роста культуры). Нарращивание клонов осуществляли в течение двух-трех недель.

Вестерн блот анализ. Клетки каждого клона ресуспендировали в лизирующем буфере RIPA (150 мМ хлорид натрия, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 50 мМ TRIS, pH 8,0). 20 мкг белка наносили в лунку для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Белки из геля переносили на мембрану PVDF (1620177, Bio-Rad, США), предварительно активированную метанолом. Электрофорез и перенос белков проводился в системе Биорад (Mini-PROTEAN®, Bio-Rad, США). Для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану с белками блокировали в нежирном молоке (Bio-Rad, США). Далее проводили окраску антителами к белку p21 (2947, Cell Signaling, США) и актину (AC026, Abclonal, Китай) в течение ночи при температуре +4°C. После отмывки от первичных антител, мембрану инкубировали со вторичными антителами анти-кролик (7074, Cell Signaling, США) при комнатной температуре в течение 40 минут. После отмывки от вторичных антител мембрану проявляли с помощью хемилюминесцентного HRP-субстрата (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США) на хемилюминесцентном ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, США).

Результаты исследования и их обсуждение

Для получения модельной сублинии клеток рака легкого A549, в которой отсутствует белок p21 (нокаут), нами был выбран метод CRISPR/Cas, на настоящий момент являющийся наиболее эффективной технологией для создания нокаутных линий клеток [18]. Как отмечено в материалах и методах, последовательность sgRNA подбиралась на стыке интрона и экзона гена *p21* (рис. 1А). Это делалось для того, чтобы нуклеаза не узнавала и не делала разрывов в последовательности экзогенного гена *p21*, полученной из кДНК и не имеющей в своем составе интрона. Таким образом, это позволяет одновременно экспрессировать белок Cas и экзогенный ген *p21* в одной клетке при отсутствии эндогенного *p21*. При введении нуклеазы в клетки может быть использована трансфекция плазмиды или трансдукция вируса, содержащего таргетную плазмиду [18]. Широко используемые ленти- и ретровирусная трансдукции сопровождаются встраиванием последовательности Cas в геном клетки. При введении в такую клетку экзогенного гена, содержащего сайт узнавания для нуклеазы, она будет делать в нем разрывы, что сделает невозможным получение белка. В нашем случае этого не произойдет. Введение в нокаутную по гену *p21* клетку экзогенного гена *p21* может понадобиться в различных исследованиях, в частности, для получения модели индуцированного терапией клеточного старения, когда для становления фенотипа старения необходимо наличие белка p21; с целью возобновления экспрессии гена для подтверждения ранее полученного эффекта и т.п. Экспрессия экзогенного гена под индуцибельным промотором позволит в дальнейшем отменить его экспрессию, если это необходимо для исследования, например, при изучении зависимости выхода клеток из стадии старения от уровня белка p21.

Через 48 часов после трансфекции клетки, положительные по маркеру GFP, были отсортированы в 96-луночный планшет из расчета одна клетка в одну лунку (рис. 1Б). Анализ клонов на наличие в них белка p21 методом вестерн блоттинга показал его отсутствие в клоне №7 (рис. 1В). Таким образом, мы получили сублинию клеток A549, нокаутную по гену *p21*. Кроме того, мы показали эффективность подобранной нами sgRNA, что в последующем позволит нам создавать сублинии других опухолевых клеток, в которых будет отсутствовать эндогенный белок p21.

Закключение

Нами была получена сублиния клеток рака легкого A549, нокаутная по гену *p21*, методом CRISPR/Cas. В дальнейшем, используя полученную нокаутную сублинию A549, мы планируем исследовать роль белка *p21*, а также опосредуемых им механизмов влия-

ния других генов, в ответе клеток на терапию онкологических заболеваний, в частности, формирования фенотипа старения при применении низких доз терапии и выхода отдельных клеток из этой стадии (формировании рецидива опухоли), а также определении механизмов возникновения устойчивости опухолевых клеток.

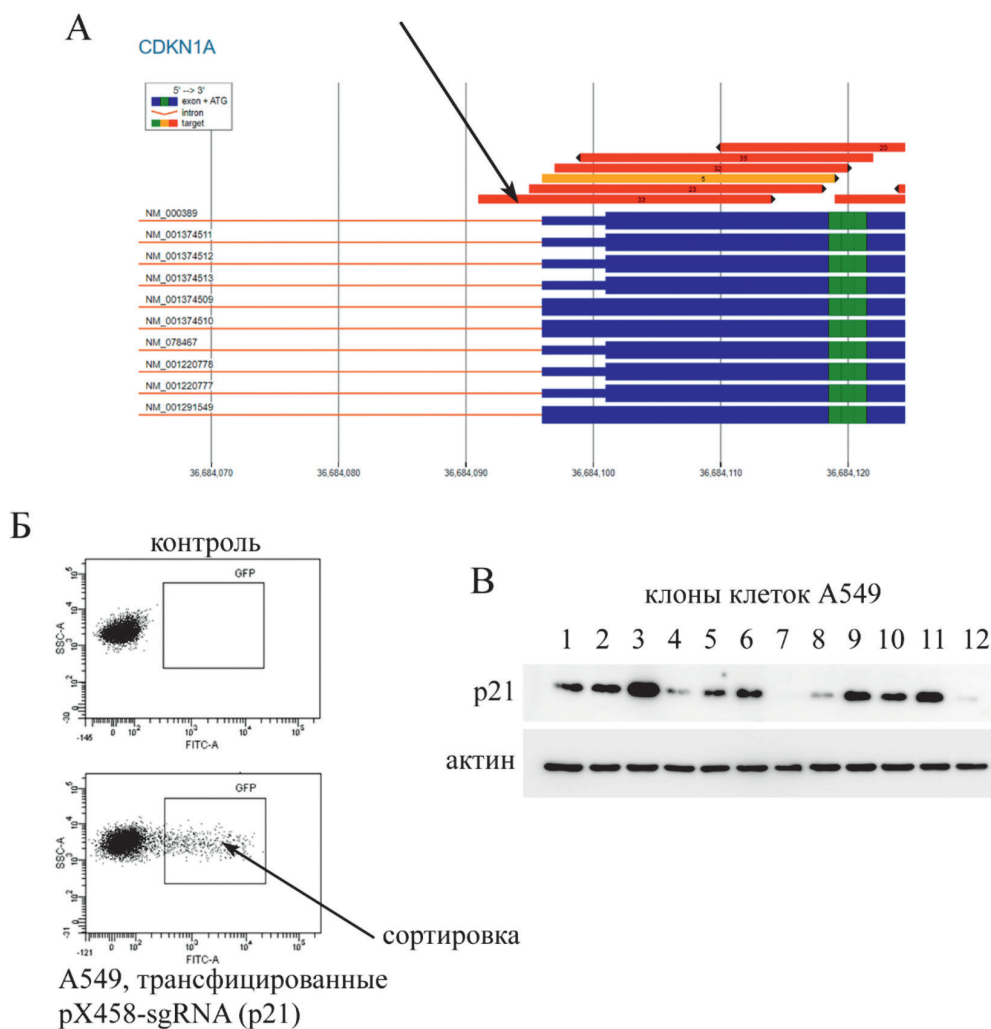


Рис. 1. Получение клонов клеток сублинии A549, нокаутных по гену *p21*. А) Подбор sgRNA к последовательности гена *p21* с помощью программы CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (рисунок с сайта программы). Стрелкой показана выбранная нами sgRNA. Б) Анализ трансфекции и сортировка клеток, положительных по маркеру GFP. В) Проверка полученных клонов клеток на наличие в них белка *p21* методом вестерн-блоттинга. Окраска на актин использовалась в качестве контроля нанесения образцов.

Fig. 1. Obtaining a subline of lung cancer cells A549, knockout for the *p21* gene. А) Selection of sgRNA to the *p21* gene sequence using the CHOPCHOP program (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (picture from the program website). The arrow shows the sgRNA we selected. Б) Analysis of transfection and sorting of cells positive for the GFP marker. В) Checking the resulting cell clones for the presence of *p21* protein using Western blotting. Actin staining was used as a control for sample application.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в сортировке единичных клеток в.н.с. Поташниковой Дарье Марковне (МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра клеточной биологии и гистологии, Лаборатория цитологии).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Acknowledgments. The authors would like to thank V.N.S. for assistance in single cell sorting. Potashnikova Daria Markovna (MSU named after M.V. Lomonosov, Faculty of Biology, Department of Cell Biology and Histology, Laboratory of Cytology).

Compliance with ethical standards. This article does not contain descriptions of studies performed by the authors involving humans or using animals as subjects.

Литература/References

1. Asmamaw M., Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics*. 2021; 15: 353-361. doi: 10.2147/BTT.S326422.
2. Cai L., Fisher A. L., Huang H., Xie Z. CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes Dis*. 2016; 3: 244-251. doi: 10.1016/j.gendis.2016.07.003.
3. Stadtmayer E. A., Fraietta J. A., Davis M. M., et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020; 367. doi: 10.1126/science.aba7365.
4. Li H., Yang Y., Hong W., Huang M., Wu M., Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5: 1. doi: 10.1038/s41392-019-0089-y.
5. Katti A., Diaz B. J., Caragine C. M., Sanjana N. E., Dow L. E. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2022; 22: 259-279. doi: 10.1038/s41568-022-00441-w.
6. Shamloo B., Usluer S. p21 in Cancer Research. *Cancers (Basel)*. 2019; 11. doi: 10.3390/cancers11081178.
7. Georgakilas A. G., Martin O. A., Bonner W. M. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*/2017;23: 310-319. doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.001.
8. Tsao Y. P., Huang S. J., Chang J. L., Hsieh J. T., Pong R. C., Chen S. L. Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDI1/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol*. 1999;73: 4983-4990. doi: 10.1128/JVI.73.6.4983-4990.1999.
9. Eastham J. A., Hall S. J., Sehgal I., et al. In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res*. 1995; 55: 5151-5155.
10. Gorospe M., Cirielli C., Wang X., Seth P., Capogrossi M. C., Holbrook N. J. p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997;14: 929-935. doi: 10.1038/sj.onc.1200897.
11. Jiang D., Wang X., Liu X., Li F. Gene delivery of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Waf1 and p27Kip1 suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer*. 2014; 21: 614-623. doi: 10.1007/s12282-012-0438-y.
12. Zamkova M. A., Persiyantseva N. A., Tatarskiy V. V., Shti, A. A. Therapy-Induced Tumor Cell Senescence: Mechanisms and Circumvention. *Biochemistry (Mosc)*. 2023;88: 86-104. doi: 10.1134/S000629792301008X.
13. Roninson I. B. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*. 2023;63: 2705-2715.
14. Cmielova J., Rezacova M. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem*. 2011;112: 3502-3506. doi: 10.1002/jcb.23296.
15. Yosef R., Pilpel N., Papismadov N., et al. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J*. 2017;36: 2280-2295. doi: 10.15252/embj.201695553.
16. Park S. H., Park J. Y., Weiss R. H. Antisense attenuation of p21 sensitizes kidney cancer to apoptosis in response to conventional DNA damaging chemotherapy associated with enhancement of phospho-p53. *J Urol*. 2008;180: 352-360. doi: 10.1016/j.juro.2008.02.038.
17. Rohlfalter V., Roth K., Finkernagel F., et al. A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype. *Oncotarget*. 2015;6: 40005-40025, doi: 10.18632/oncotarget.5552.
18. Giuliano C. J., Lin A., Girish V., Sheltzer J. M. Generating Single Cell-Derived Knockout Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Mol Biol*. 2019;128: e100. doi: 10.1002/cpmb.100.