

МЕТОД ИНДУЦИРУЕМОГО НОКДАУНА СУЩЕСТВЕННЫХ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *OSC Drosophila melanogaster*

© 2024 г. С. В. Марфина^{а, б}, Е. А. Михалева^а, Н. В. Акуленко^{а, *}, С. С. Рязанский^{а, **}

^а Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

^б Российский химико-технологический университет им Д.И. Менделеева, Москва 125047 Россия

*e-mail: n.akulenko11@gmail.com

**e-mail: s.ryazansky@gmail.com

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 21.11.2023 г.

Предложен основанный на РНК-интерференции метод индуцируемого нокдауна генов, существенных для поддержания гомеостаза, в культуре клеток. В подходе используется встроенная в геном с помощью CRISPR-Cas9-мутагенеза конструкция, в которой экспрессия предшественника siРНК находится под контролем индуцируемого ионами меди металлотионеинового промотора. Эндогенный источник siРНК позволяет осуществить нокдаун в культурах клеток, которые имеют низкую эффективность трансфекции экзогенными siРНК. Эффективность подхода продемонстрирована на культуре соматических клеток яичников дрозофилы на двух генах, которые необходимы для оогенеза: *Cul3*, кодирующего компонент убиквитин-лигазного комплекса со множественными функциями в протеостазе, и *cut*, кодирующего фактор транскрипции, участвующий в регуляции дифференцировки фолликулярных клеток яичников.

Ключевые слова: нокдаун, siРНК, CRISPR-Cas9, дрозофила, OSC

DOI: 10.31857/S0026898424020137, **EDN:** NDBKYZ

ВВЕДЕНИЕ

Генетические технологии подавления экспрессии генов разделяют на методы нокаута, при которых в рамку считывания или регуляторные области вносятся мутации, и нокдауна, снижающие количество образуемой мРНК при сохранении последовательности гена. Среди методов нокаута CRISPR-Cas9 выделяется сравнительно простой и эффективностью, заслуженно позволивших ему стать универсальным инструментом редактирования генома [1, 2]. В этом методе нуклеаза Cas9 в комплексе с “направляющей” РНК (single guide RNA, sgРНК) связывается с участком генома, комплементарным sgРНК, и вносит в него двухцепочечный разрыв. При его восстановлении клеточной

системой негомологичного соединения концов в месте разрыва образуются микроделеции или инсерции. В ходе репарации по механизму гомологичной рекомбинации при наличии экзогенной донорной матрицы ДНК с плечами, гомологичными последовательностям вокруг места разрыва, эта матрица может встроиться в место разрыва. Оба способа позволяют отредактировать последовательности гена, полностью останавливая его экспрессию.

Основным подходом при нокдауне является использование классической РНК-интерференции (РНКи) [3]. При РНКи мРНК расщепляется нуклеазой Argonaute (Ago), которая распознает мРНК-мишень благодаря ассоциированной с Ago короткой интерферирующей РНК (small interfering RNA, siРНК), комплементарной мРНК. В культуре клеток РНКи осуществляется трансфекцией siРНК или длинного двухцепочечного РНК-предшественника (дцРНК), который клеточным аппаратом процессинга нарезается до siРНК. Используется также трансфекция плазмид, кодирующих дву- или одноцепочечные, имеющие шпилечную вторичную структу-

Сокращения: shРНК — короткие шпилечные РНК; siРНК — короткие интерферирующие РНК; OSC — соматические клетки яичников дрозофилы; CRL — мультибелковый убиквитин-лигазный комплекс (Cullin-RING-ligase).

ру (short hairpin RNA, shРНК), предшественники siРНК. Использование последовательности определенных пре-миРНК в качестве шаблона для дизайна вторичной структуры shРНК позволяет значительно ускорить их процессинг до siРНК [4]. В другом подходе нокдауна применяется лишенный нуклеазной активности dCas9 (dead Cas9), но сохраняющий способность связывать sgРНК и комплементарный ей участок генома. Белки dCas9, слитые с ингибирующими доменами факторов транскрипции, в комплексе с sgРНК, комплементарной промоторной области, позволяют ингибировать транскрипцию генов [5]. Разрабатываются встраиваемые в геном кассеты с геном *dCas9* под индуцируемым промотором [6]. Все чаще применяют и другие методы нокдауна с использованием, например, белка Cas13a [7].

Методы нокаута с помощью CRISPR-Cas9 и нокдауна с помощью РНКи не лишены недостатков. Так, CRISPR-Cas9-мутагенез в общем случае мало применим для редактирования полиплоидных геномов, часто встречающихся в клеточных культурах [8, 9]. Кроме того, в результате адаптивной эволюции в редактированном геноме со временем могут накапливаться компенсаторные мутации, затрудняющие анализ фенотипа [10]. В ряде случаев стоит задача подавить активность гена на небольшой срок, что невозможно осуществить необратимым нокаутом. Наконец, нокаут существенных для жизнеспособности генов, представляющих особый интерес, приводит к возникновению гетерозиготных по мутации клеточных культур и лишь к незначительному снижению экспрессии изучаемого гена [10]. Основная проблема использования РНКи связана с неэффективной трансфекцией дцРНК, которая может быть очень низкой для ряда клеточных культур [11], включая и культуру OSC соматических клеток яичников дрозофилы.

С целью преодоления неэффективности трансфекции мы разработали метод индуцированного нокдауна генов в культуре клеток OSC дрозофилы на основе кассеты, в которой экспрессия РНК-предшественника siРНК, способной сворачиваться в пре-миРНК-подобную шпильчатую структуру, находится под контролем индуцируемого промотора гена металлотионеина. Кассета интегрируется в определенное место генома с помощью CRISPR-Cas9-мутагенеза. Экспрессия shРНК и подавление целевого гена запускаются добавлением в среду ионов меди. Предлагаемый подход позволяет осуществлять нокдаун критически необходимых для жизнедеятельности генов в культурах клеток, которые имеют низкую эффективность трансфекции.

Эффективность предлагаемого метода показана на гене *Cul3*, кодирующем компонент убиквитин-лигазного мультибелкового комплекса CRL (cullin-RING-ligase complex). Комплексы CRL регулируют множество молекулярных процессов, включая клеточное деление, передачу сигналов, транскрипцию, метаболизм, протеолиз, дифференцировку и развитие [12]. Эффективность метода продемонстрирована также на примере гена *cut*, кодирующего фактор транскрипции, необходимый на разных стадиях дифференцировки соматических фолликулярных клеток в оогенезе дрозофилы [13, 14]. Предложенный метод является альтернативой индуцируемому нокдауну с помощью dCas9 или Cas13. Значимость данной работы определяется непрекращающейся актуальностью исследований общебиологических закономерностей развития на модельном объекте — дрозофиле, а также возможностью использовать предлагаемый подход на культурах клеток других видов, включая человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток. Линия соматических клеток яичников дрозофилы OSC[Cas9+] с геномной встройкой плазмиды pAc-sgRNA-Cas9 (Addgene, #49330) [15] была получена нами ранее на основе культуры клеток OSC (любезно предоставлена М. Сиоми, Университет Токио, Япония) [16]. Линию OSC[Cas9+] поддерживали при 25 °C в среде Shields and Sang M3 (“Sigma-Aldrich”, США, #S3652) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, “Gibco”, США, #10270106), 10%-ным экстрактом мух, 10 мкг/мл инсулина (“Sigma-Aldrich”, США, #I9278), 0.6 мг/мл L-глутатиона (“Sigma-Aldrich”, США, #G6013), 50 ед/мл пенициллина, 50 г/мл стрептомицина и 1 мкг/мл пурамицина. Экстракт мух получали гомогенизированием 1 г 3–7-дневных мух в 7 мл среды M3. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 1500 g; надосадочную жидкость нагревали (10 мин при 60 °C) и очищали центрифугированием при 1500 g в течение 1.5 ч при 4 °C; супернатант еще раз центрифугировали при 4000 g в течение 15 мин при 4 °C. Трансфекцию плазмид проводили с помощью FuGENE-HD (“Promega”, США, #E2311) согласно инструкции производителя. Отбор клеток с интегрированной в геном кассетой с геном устойчивости к гигромицину или бластицидину проводили на среде в присутствии 200 мкг/мл гигромицина (“Calbiochem”, США, #400050) или 10 мкг/мл бластицидина (“Applichem”, Германия, #A3784). Экспрессию MT-shRNA-bsd индуцировали, добавляя в среду раствор CuSO₄ до конечной концентрации 0.5–2 mM; уровень

экспрессии измеряли через 3 дня после индукции.

Нокаут генов *Cul3* и *EloB* в культуре клеток OSC. Выбор последовательностей sgPHK для внесения двухцепочечного разрыва в гены *Cul3* и *EloB* проводили с помощью программы “TargetFinder” [17]. Синтезированные олигонуклеотиды (sgRNA^{Cul3}: 5'-CTTCGATAAAACACAGCGTTGATAT и 5'-AAACATATCAACGCTGTGTTTTATC; sgRNA^{EloB}: 5'-CTTCGTCAGGACAACGATGTCATGG и 5'-AAACCCATGACATCGTTGTCCTGAC) отжигали, фосфорилировали по 5'-концу и клонировали в вектор pU6-BbsI-chiRNA (“Addgene”, США, #45946) [17], предварительно линейаризованному по сайтам BbsI. Нокаут генов с помощью Cas9 в линии OSC[Cas9+] проводили согласно [18]. В качестве донорной ДНК использовали ПЦР-фрагмент с последовательностью гена *hyg* под собственным промотором, полученный с плазмиды pМН4 (“Addgene”, США, #52529) [19] с помощью праймеров: *hyg_Cul3*: 5'-CTTCTTTTTTAAAGCAACTACTGTATTTATGCCTTCCCCTTCGAATAGGAACCGCCTATATGGATCTTCCGGATGGCTCGAG и 5'-GAGCTGGGTGCATCTTTATCCTTTTCACTTTCAA CTGCCTTGC CGGCCATAAAACACAGCGGAAGTTCCTATTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCCATAT; *hyg_EloB*: 5'-ATCGCAGGCATAAAAGTGTCAGCCCGTGGACCAGCGGTTATACAATCAGGACAACGATGGATCTTCCGGATGGCTCGAG и 5'-CTGCGCCTTGGCCGTGGACACCGTCACGCCGTAGTCCTGCAACGTGCTGTCTGCCTCCATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTAGGAACCTTCCATAT. На 5'-конце праймеров находится участок, комплементарный 60 нуклеотидам последовательностей гена ниже или выше места внесения двухцепочечного разрыва, а 3'-конец (подчеркнуто) комплементарен последовательности вектора pМН4. Смесь ПЦР-фрагмента и плазмиды pU6/sgPHK трансфицировали клетки OSC[Cas9+], как описано выше.

Конструирование вектора pAc-MT-shRNA-bsd. Донорная плазмида для гомологичной репарации вносимых Cas9 двухцепочечных разрывов сконструирована на основе различных векторов. Сначала на основе pWalium20 получили кассету MT-shRNA-bsd, содержащую последовательности shPHK под промотором MT и ген устойчивости к антибиотику бластицидину *bsd*. Для этого олигонуклеотиды, кодирующие shPHK (*Cul3*: 5'-ctagcagtTACGATCATGGATGAGTTTAAatagtata ttcaagcataTTAAACTCATCCATGATCGTAgcg и 5'-aattcgctACGATCATGGATGAGTTTAAatagtctgtataataactTTAAACTCATCCATGATCGTAactg; *cut*: 5'-ctagcagtAAGGAAGTGAACACACTCAAAtagttatattcaagcataTTTGAGTGTGTTCACTTCCTTgcg

и 5'-aattcgctAAGGAAGTGAACACACTCAAAtagttctgaatataactaTTTGAGTGTGTTCACTTCCTTactg; участки, из которых вырезается siPHK, показаны прописными буквами) отжигали и клонировали в вектор pWalium20 (“DGRC”, США, #1472) [4, 20], линейаризованный по сайтам EcoRI и NheI, в результате чего получали плазмиду pWalium20-shRNA. В качестве источника последовательностей шпилечных структур использовали базу данных FlyRNAi проекта “The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School” [20]. Замена гена *mini-white* на ген *bsd* производилась клонированием по Гибсону (NEBuilder HiFi kit, NEB, США) двух фрагментов ДНК: pWalium20-shRNA, линейаризованной по сайтам HindIII для вырезания *mini-white*; ПЦР-фрагмента с геном *bsd*, полученного синтезом с использованием праймеров 5'-CTCGAGATCGATGATATCAAAATAAACATATGCTGTTGG и 5'-CGAATTGGGTACAAGCTCCATATGTTAGAAACA AATTTAT и плазмиды pМН4 (“Addgene”, США, #52529) [19] в качестве матрицы. Полученная плазмида называлась pWalium20-shRNA-bsd. Последовательность большей части промотора 10×UAS-hsp70 заменили на промотор MT клонированием по Гибсону двух фрагментов: pWalium20-shRNA-bsd, линейаризованной по сайтам BglII и BamHI для вырезания 5×UAS-hsp70; ПЦР-фрагмента с последовательностью MT, полученного с праймеров 5'-GGATGTTTTCTA GAACACCTTTAGTTGCACTGAGATGAT и 5'-ATACGAAGTTATGGATCCGTTGCAGGACAGGATGT, и плазмиды pMT-OsTIR1-P2A-H2B-AID-EYFP (любезно предоставлена К. Ленером, Университет Цюриха, Швейцария) в качестве матрицы. В процессе конструирования итоговой донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd из вектора pAc-sgRNA-Cas9 предварительно по сайтам SacI был вырезан фрагмент с частью гена *Cas9*, а потом в него клонированием по Гибсону вставили кассету MT-shRNA-bsd. Для этого использовали pAc-sgRNA-Cas9-SacI, линейаризованную по сайту SmaI, и ПЦР-фрагмент с кассетой, полученный с праймерами 5'-CGACGTCCCCCGGGAATTAACCCTCACTAAAGG и 5'-CGAGGTGCGTACGGCATATGTTAGAAACAATTTATTT, и плазмиды pWalium20-MT-shRNA-bsd в качестве матрицы. Полученную плазмиду pAc-MT-shRNA-bsd можно использовать в качестве вектора для клонирования других последовательностей shPHK по сайтам EcoRI и XbaI. С целью конструирования плазмиды для экспрессии sgPHK^{puro} к *puro* синтезированные олигонуклеотиды (5'-CTTCGGCGAGGGTGCCTACGGCCC и 5'-AAACGGGCCGTACGCACCCTCGCC) отжигали, фосфорилировали по 5'-концу и клонировали в вектор pU6-BbsI-chiRNA (“Addgene”, США, #45946), предварительно линейаризованный по сайтам BbsI. Все полученные плазмиды

проверяли секвенированием по Сэнгеру. Смесь плазмид pU6/sgРНК^{puro} и pAc-MT-shRNA-bsd трансфицировали клетки OSC[Cas9+], как описано выше.

Измерение уровня экспрессии генов с помощью qRT-ПЦР. Около 1.5 мкг тотальной РНК, выделенной из 10^6 клеток с помощью реактива Extract RNA (“Евроген”, Россия), подвергали обработке ДНКазой I (“Ambion”, США). кДНК получена с использованием обратной транскриптазы Mint (“Евроген”, Россия) и смеси случайных гексамеров в качестве праймеров. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени полученной кДНК проводили на ПЦР-амплификаторе DT-96 (“ДНК-технология”, Россия) с праймерами к *Cul3* (5'-CTTCGATAAAACACAGCGTTGATAT и 5'-GCGTGAAGCCTTTGACATTTTC), *EloB*: (5'-AAACCCATGACATCGTTGTCCTGAC и 5'-GAGCTGAAGCGAATGATTGAG), *cut* (5'-CTTCGTTGTTTCGCGGAGTCCGTGCT и 5'-CCAGGAACATCTTCATGCGAATG) и *rp49* (5'-ATGACCATCCGCCAGCATAС и 5'-GCTTAGCATATCGATCCGACTGG). Изменение уровня относительной экспрессии генов *Cul3*, *EloB* и *cut* к *rp49* рассчитывали как $2^{-\Delta\Delta C_t}$ по сравнению с их относительной экспрессией в исходных клетках OSC[Cas9⁺].

Определение встройки трансгена в геноме с помощью ПЦР. Геномную ДНК из 10^6 клеток OSC[*Cul3-KO*] или OSC[*EloB-KO*] выделяли фенол-хлороформным методом и использовали для ПЦР с HotTaq-полимеразой (“Евроген”, Россия) со следующими праймерами: 5'-GCGTGAAGCCTTTGACATTTTC (праймер

“1” на рис. 1), 5'-ATATGTGCTTGCGTGTGGTG (“2”), 5'-GAAAGGAGGTACCGGTATGA AAAAGCCTGAACCTCACC (“3”), 5'-AAATTTATTTTAAAGTTTATTTTAAATAAT TTCTATTCCTTTGCCCTCGGAC (“4”), 5'-GAGCTGAAGCGAATGATTGAG (“5”) и 5'-CGCCTTGTCCGCTAGATAAC (“6”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Неэффективность нокаута *Cul3* в культуре клеток OSC

В рамках работы, направленной на изучение функций генов *Cul3* и *EloB*, которые кодируют компоненты мультибелкового убиквитин-лигазного комплекса CRL, участвующего в регуляции многочисленных клеточных процессов [12], мы провели нокаут этих генов в культуре соматических клеток яичников OSC[Cas9⁺] с конститутивной экспрессией *Cas9*. При проведении нокаута кассету с геном устойчивости к гиромизину *hyg* внебрили в кодирующую часть генов *Cul3* и *EloB* в OSC (рис. 1а). Отбор клеток со вставленной в геном кассетой проводили на среде с гиромизинном. Анализ количества транскриптов в полученных культурах методом qRT-ПЦР показал, что нокаут генов приводит к падению уровня их экспрессии, но в случае *Cul3-KO* количество транскриптов снижается только в 2 раза, тогда как в *EloB-KO* – в 10 раз (рис. 1б). Можно предположить, что линия *Cul3-KO*, в отличие от линии *EloB-KO*, гетерозиготна по мутантному гену. Однако ПЦР-анализ геномов показал, что интактные аллели дикого типа

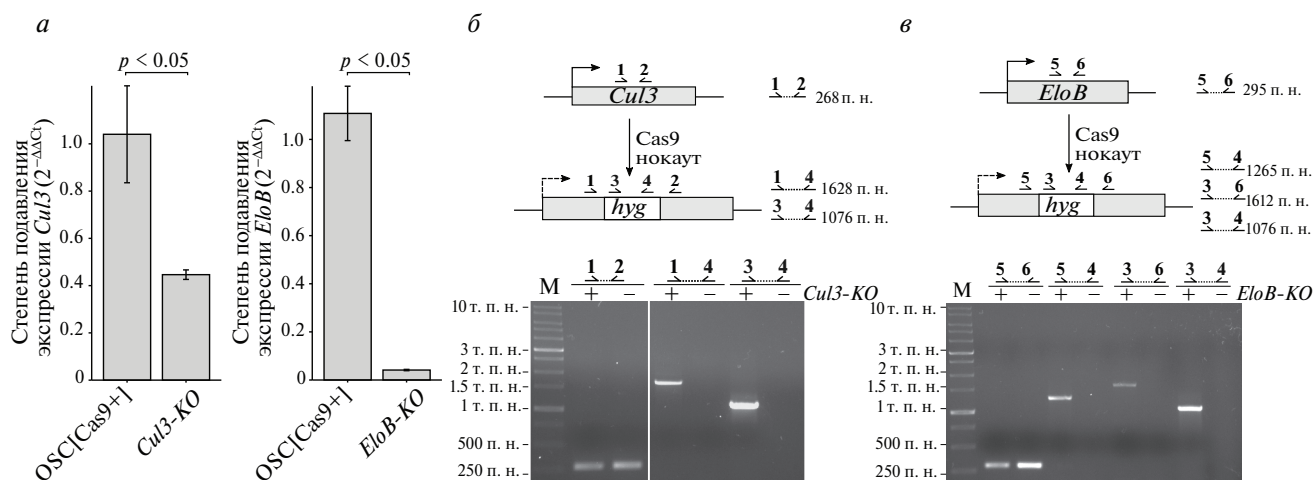


Рис. 1. Результаты нокаута генов *Cul3* и *EloB* в OSC. Изменение уровня экспрессии генов *Cul3* и *EloB* в нокаутных клетках относительно исходной линии OSC[Cas9⁺] (а). Уровень экспрессии, измеренный методом qRT-ПЦР, нормировали на экспрессию *rp49*. Показаны средние значения измерений по двум биологическим повторностям с тремя техническими повторностями в каждом; погрешности измерения показаны стандартной ошибкой среднего. Статистическую значимость различий оценивали по методу Уилкоксона. ПЦР-анализ генома клеток *Cul3-KO* (б) и *EloB-KO* (в) показал наличие в обеих линиях как аллелей дикого типа, так и мутантного аллеля со вставкой гена *hyg*. Показана схема расположения использованных праймеров к последовательности генов, размер ампликонов и результат ПЦР (электрофорез в агарозном геле).

сохранились в обеих линиях (рис. 16, в). Поэтому вероятно, что более высокая степень подавления экспрессии *EloB* по сравнению с *Cul3* при нокауте объясняется либо тем, что в линии *EloB-KO* гетерозиготна лишь небольшая доля клеток, либо *EloB-KO* является доминантной мутацией.

Культура OSC в основном представлена диплоидными клетками, но встречаются и полиплоидные клетки [21]. Чтобы осуществить нокаут всех копий генов в диплоидном геноме, можно использовать вместо одной две кассеты, содержащие гены устойчивости к разным антибиотикам [22]; при этом в каждую хромосому попадает только одна из кассет. Последующая селекция на устойчивость к двум антибиотикам позволяет отобрать клетки, геном которых содержит обе кассеты с разными генами устойчивости на разных хромосомах. Для полиплоидных клеточных культур разработан подход с использованием интегрированной в геном кассеты с закодированной одной или несколькими sgPHK к интересующему гену [23]. В этом случае, Cas9, загруженная постоянно экспрессирующейся sgPHK, будет вносить двухцепочечные разрывы в одну из копий генома до тех пор, пока там присутствует исходная копия гена.

Гетерозиготность линии *Cul3-KO*, вероятно, объясняется важностью *Cul3* для обеспечения жизнедеятельности клетки, что делает невозможным селекцию гомозиготных клеток. Даже использование двух кассет с разными антибиотиками, интегрируемых в разные аллели [22], или кассет с постоянной экспрессией sgPHK [23] не позволит достичь полного нокаута жизненно важных генов, или такая линия будет нестабильной. В этих случаях для инактивации генов лучше применять нокаун с использованием dCas9 или PHKi. Однако с такими культурами, как OSC дрозодилы, не удастся добиться ощутимого подавления экспрессии с помощью классического способа PHKi путем трансфекции дцPHK. В связи с этим нами разработан метод нокадауна, запускаемый со встроенной в геном shPHK, находящейся под контролем индуцибельного промотора. Встройка кассеты с закодированной shRNA в геном осуществляется методом CRISPR-Cas9.

Конструирование вектора для индуцированного нокадауна генов

Мы сконструировали кассету, кодирующую заданную shPHK под контролем индуцируемого металлотионеинового промотора, на основе вектора pWalium20, которая была разработана для внедрения в геном и экспрессии shPHK в определенных тканях дрозодилы [20]. Закодированная в векторе shPHK создана на основе

последовательности пре-miR-1, предшественника микроPHK дрозодилы miR-1 со шпилькоподобной вторичной структурой. Экспрессия этой PHK находится под контролем минимального промотора *hsp70* и регуляторного элемента *UAS*. Последовательность *UAS-hsp70-shPHK* в векторе pWalium20 фланкирована инсуляторами, что позволяет проводить эффективную экспрессию shPHK с трансгена в разных участках генома независимо от локального уровня гетерохроматинизации.

Схема получения кассеты представлена на рис. 2а. В векторе pWalium20 ген *mini-white*, первоначально необходимый для исследований *in vivo* и отбора трансгенных особей по цвету глаз, был заменен на ген устойчивости к антибиотику бластимицину (*bsd*) для отбора клеток с нужной вставкой на селективной среде. Промотор *UAS-hsp70* заменен на металлотионеиновый промотор MT, индуцируемый ионами Cu^{2+} . Для интеграции полученной кассеты MT-shRNA-bsd в геном с использованием CRISPR-Cas9-мутагенеза необходимо выбрать место встройки, а также сконструировать донорную плазмиду, в которой кассета окружена плечами, гомологичными участкам вблизи сайта ее встройки по механизму гомологичной репарации двухцепочечного разрыва ДНК. В качестве места встройки был выбран ген устойчивости к антибиотику пурамицину *puro*, который находится в составе ранее встроенной плазмиды pAc-sgRNA-Cas9 с конститутивно экспрессирующимся Cas9 в OSC (линия клеток OSC[Cas9+]). Таким образом, pAc-sgRNA-Cas9, встроенная в геном OSC, служит одновременно источником Cas9, а также платформой для встройки кассеты с shPHK. Донорная плазида pAc-MT-shRNA-bsd получена с использованием pAc-sgRNA-Cas9, в ген *puro* которой клонирована фланкированная инсуляторами кассета MT-shPHK-bsd. Конструкция MT-shRNA-bsd в донорной плазмиде окружена плечами, необходимыми для гомологичной рекомбинации с геном *puro* в геноме. Последовательность sgPHK к гену *puro* (sgPHK^{puro}) была клонирована в вектор pU6-BbsI-chiRNA.

В нашем методе индуцируемого нокадауна нуклеаза Cas9, заряженная sgPHK^{puro} к гену *puro*, вносит в него двухцепочечный разрыв, который далее репарируется по механизму гомологичной рекомбинации с использованием донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd в качестве матрицы (рис. 2б). Это приводит к интеграции в *puro* кассеты MT-shRNA-bsd. Экспрессия shRNA и, следовательно, нокаун целевого гена запускается добавлением ионов Cu^{2+} в среду. В плазмиде pAc-MT-shRNA-bsd одну шпилечную последовательность можно заменить на любую другую, т. е. использовать ее как вектор.

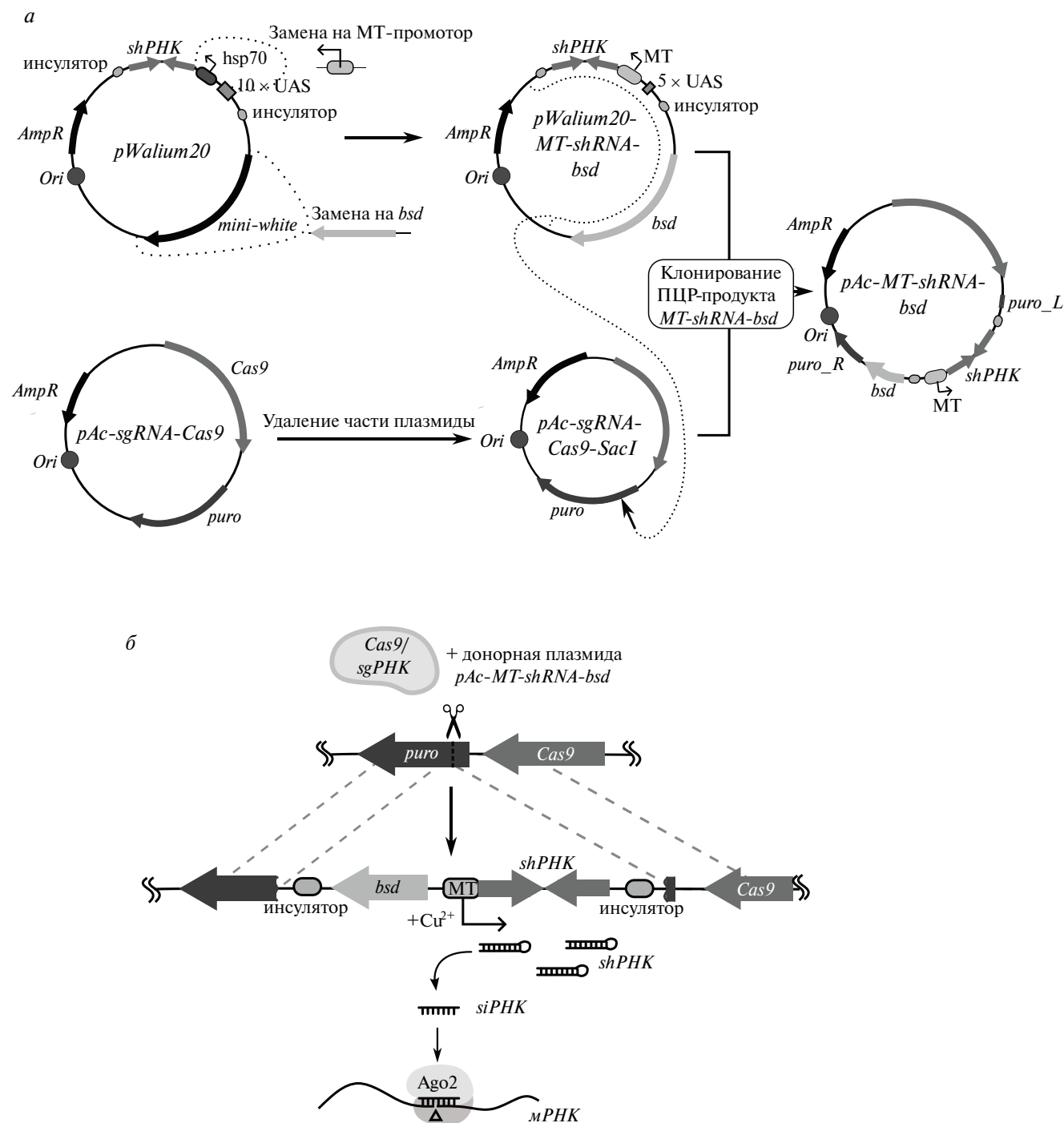


Рис. 2. Схема конструирования донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd, содержащей кассету MT-shRNA-bsd с индуцируемой shPHK (а). Подробное описание представлено в тексте и разделе Экспериментальная часть. *puro_R* и *puro_L* – фрагменты гена *puro* в pAc-MT-shRNA-bsd, которые будут служить плечами для гомологичной рекомбинации. Кассета MT-shRNA-bsd из донорной плазмиды внедряется в предварительно встроенный в геном трансген pAc-sgRNA-Cas9 (показана его часть с генами *puro* и *Cas9*) с помощью Cas9 и активируется добавлением ионов меди (б). Экспрессирующиеся shPHK процессируются до siPHK, которые в комплексе с белком Ago2 дрозофилы связываются с комплементарной мРНК и вызывают ее расщепление по механизму РНКи.

Индуклируемый нокдаун генов *Cul3* и *cut*

Эффективность метода индуцированного нокдауна проверена на гене *Cul3*. Мы клонировали последовательность, кодирующую shPHK

к транскрипту *Cul3*, в вектор pAc-MT-shRNA-bsd. Эту плазмиду, а также плазмиду с последовательностью sgPHK^{puro} с помощью трансфекции вводили в клетки линии OSC[Cas9+].

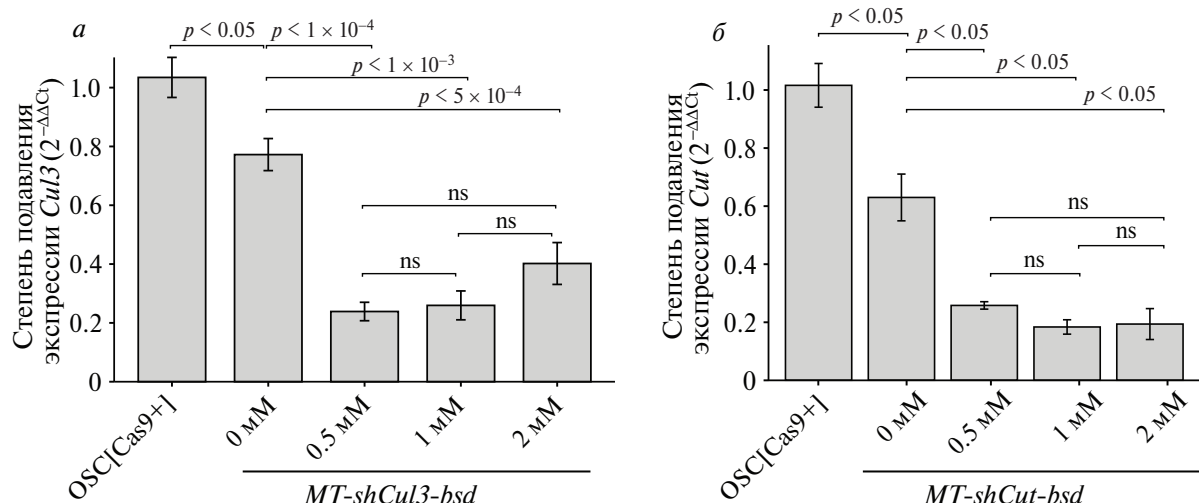


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии генов *Cul3* (а) и *cut* (б) при добавлении ионов меди в концентрации 0.5, 1 и 2 мМ к линиям клеток, в геном которых внедрены кассеты с соответствующими shРНК, по сравнению с экспрессией в OSC[Cas9+]. Уровень экспрессии, измеренный методом qRT-ПЦР, нормировали на экспрессию *rp49*. Показаны средние значения измерений по двум-трем биологическим повторностям с тремя техническими повторностями в каждом; погрешности измерения показаны стандартной ошибкой среднего. Статистическую значимость различий оценивали по методу Уилкоксона; ns — различия средних статистически недостоверны.

Последующий отбор клонов на селективной среде с бластицидином позволил получить поликлональную, устойчивую к бластицидину культуру клеток, содержащую в геноме вставку кассеты MT-shCul3-bsd. Измерение методом qRT-ПЦР уровня экспрессии *Cul3* в клетках со вставкой MT-shCul3-bsd показало, что даже без добавления в среду Cu^{2+} он достоверно ниже по сравнению с исходными клетками OSC[Cas9+] (рис. 3а). По-видимому, это обусловлено присутствием в самой среде ионов Cu^{2+} в количестве, достаточном для запуска экспрессии *shCul3*. Активацию экспрессии *shCul3* и подавление экспрессии *Cul3* индуцировали добавлением ионов Cu^{2+} . С целью определения максимального уровня подавления концентрацию Cu^{2+} варьировали от 0.5 до 2 мМ (2 мМ это концентрация, при которой клетки OSC еще сохраняют жизнеспособность). Уже в присутствии 0.5 мМ Cu^{2+} наблюдалось снижение уровня экспрессии *Cul3* в 3–4 раза относительно клеток без индукции и в 5–6 раз относительно экспрессии в OSC[Cas9+] (рис. 3а). Увеличение концентрации Cu^{2+} до 2 мМ не приводило к дальнейшему более значительному снижению экспрессии *Cul3*. Аналогичный эксперимент по индуцированному нокдауну, проведенный с геном транскрипционного фактора *cut*, также показал снижение количества его транскриптов. Таким образом, метод индуцированного нокдауна позволяет подавить экспрессию генов; в случае *Cul3* эффективность была выше (в 5–6 раз), чем при частичном нокауте *Cul3-KO* (в 2–3 раза).

Отметим, что преимущество предлагаемого метода индуцированного нокдауна состоит в потенциальной возможности проведения обратимого, временного подавления генов. Для восстановления экспрессии достаточно сменить среду с избытком ионов меди на обычную, а также определить промежуток времени, достаточный для снижения количества наработанной shРНК. Предложенную систему с эндогенным источником siРНК можно использовать в широком диапазоне культур клеток с низкой восприимчивостью к трансфекции экзогенными дцРНК. В перспективе культуру клеток со встроенной кассетой можно поддерживать в лаборатории и использовать для проведения экспериментов продолжительное время. Наконец, важная особенность нашего подхода состоит в использовании одного и того же участка генома для встройки кассеты с закодированными шпильками — в нашем случае это ген *puro* в составе предварительно встроенного трансгена. Это позволяет корректно сравнивать эффективность подавления одного и того же гена разными последовательностями shРНК, а также эффективность подавления разных генов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00519).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. *Science*. **339**, 819–823.
2. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. **339**, 823–826.
3. Mohr S., Smith J., Shamu C., Neumüller R., Perrimon N. (2014) RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 591–600.
4. Ni J.-Q., Zhou R., Czech B., Liu L.P., Holderbaum L., Yang-Zhou D., Shim H.S., Tao R., Handler D., Karpowicz P., Binari R., Booker M., Brennecke J., Perkins L.A., Hannon G.J., Perrimon N. (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat. Methods*. **8**, 405–407.
5. Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. **154**, 442–451.
6. Xu X., Qi L.S. (2019) A CRISPR–dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology. *J. Mol. Biol.* **431**, 34–47.
7. Kordyś M., Sen R., Warkocki Z. (2022) Applications of the versatile CRISPR-Cas13 RNA targeting system. *WIREs RNA*. **13**, e1694.
8. Scharf I., Bierbaumer L., Huber H., Wittmann P., Haider C., Pirker C., Berger W., Mikulits W. (2018) Dynamics of CRISPR/Cas9-mediated genomic editing of the AXL locus in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Lett.* **15**, 2441–2450.
9. Boettcher M., McManus M.T. (2015) Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol. Cell*. **58**, 575–585.
10. Housden B.E., Muhar M., Gemberling M., Gersbach C.A., Stainier D.Y.R., Seydoux G., Mohr S.E., Zuber J., Perrimon N. (2017) Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 24–40.
11. Chong Z.X., Yeap S.K., Ho W.Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: a technical review. *Peer J*. **9**, e11165.
12. Harper J.W., Schulman B.A. (2021) Cullin-RING ubiquitin ligase regulatory circuits: a quarter century beyond the F-box hypothesis. *Annu. Rev. Biochem.* **90**, 403–429.
13. Sun J., Deng W.-M. (2005) Notch-dependent down-regulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in *Drosophila* follicle cells. *Development*. **132**, 4299–4308.
14. Knapp E.M., Li W., Sun J. (2019) Downregulation of homeodomain protein Cut is essential for *Drosophila* follicle maturation and ovulation. *Development*. **146**, dev179002.
15. Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.-L. (2014) Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol. Open*. **3**, 42–49.
16. Niki Y., Yamaguchi T., Mahowald A.P. (2006) Establishment of stable cell lines of *Drosophila* germ-line stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 16325–16330.
17. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K., Cummings A.M., O'Connor-Giles K.M. (2014) Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. **196**, 961–971.
18. Kunzelmann S., Böttcher R., Schmidts I., Förstemann K. (2016) A comprehensive toolbox for genome editing in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. **6**, 1777–1785.
19. Böttcher R., Hollmann M., Merk K., Nitschko V., Obermaier C., Philippou-Massier J., Wieland I., Gaul U., Förstemann K. (2014) Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucl. Acids Res.* **42**, e89–e89.
20. Perkins L.A., Holderbaum L., Tao R., Hu Y., Sopko R., McCall K., Yang-Zhou D., Flockhart I., Binari R., Shim H.S., Miller A., Housden A., Foos M., Randkeltv S., Kelley C., Namgyal P., Villalta C., Liu L.P., Jiang X., Huan-Huan Q., Wang X., Fujiyama A., Toyoda A., Ayers K., Blum A., Czech B., Neumuller R., Yan D., Cavallaro A., Hibbard K., Hall D., Cooley L., Hannon G.J., Lehmann R., Parks A., Mohr S.E., Ueda R., Kondo S., Ni J.Q., Perrimon N. (2015) The transgenic RNAi project at Harvard medical school: resources and validation. *Genetics*. **201**, 843–852.
21. Sytnikova Y.A., Rahman R., Chirn G.-W., Clark J.P., Lau N.C. (2014) Transposable element dynamics and PIWI regulation impacts lncRNA and gene expression diversity in *Drosophila* ovarian cell cultures. *Genome Res.* **24**, 1977–1990.
22. Stoyko D., O T., Hernandez A., Konstantinidou P., Meng Q., Haase A.D. (2022) CRISPR-Cas9 genome editing and rapid selection of cell pools. *Curr. Protoc.* **2**, e624.
23. Xia B., Amador G., Viswanatha R., Zirin J., Mohr S.E., Perrimon N. (2020) CRISPR-based engineering of gene knockout cells by homology-directed insertion in polyploid *Drosophila* S2R+ cells. *Nat. Protoc.* **15**, 3478–3498.

METHOD OF INDUCIBLE KNOCKDOWN OF ESSENTIAL GENES IN OSC CELL CULTURE OF *Drosophila melanogaster***S. V. Marfina^{1,2}, E. A. Mikhaleva¹, N. V. Akulenko^{1,*}, S. S. Ryazansky^{1,**}**¹ National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia² Mendelev University of Chemical Technology, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: n.akulenko11@gmail.com

**e-mail: s.ryazansky@gmail.com

In the paper, we propose an RNA interference-based method of inducible knockdown of genes essential for cell viability. The method arranges a genetic cassette in which an inducible metallothionein promoter controls the expression of siRNA precursor. The cassette is inserted into the genomic pre-integrated transgene by CRISPR-Cas9. The expression of siRNA precursor and following silencing of the gene of interest is activated by the supplementation of the medium with copper ions. This technique with the production of endogenous siRNAs allows the gene knockdown in cell cultures that are refractory to conventional transfection strategies of exogenous siRNA. The efficiency of the developed method was demonstrated in the cell culture of *Drosophila* ovarian somatic cells for two genes that are essential for oogenesis: *Cul3*, encoding a component of the multiprotein ubiquitin-ligase complex with versatile functions in proteostasis, and *cut*, encoding a transcription factor regulating the differentiation of the ovarian somatic cells.

Keywords: knockdown, siRNA, shRNA, CRISPR-Cas9, *Drosophila*, OSC