

ПРИЛОЖЕНИЕ

Широкое распространение в геномном редактировании получила система CRISPR/Cas, позволяющая вводить двуцепочечные разрывы в любое место ДНК за счёт РНК-направленной активности эндонуклеазы Cas9 [1, 2]. Двуцепочечные разрывы в целевом гене преимущественно репарируются по пути негомологичного соединения концов (Non-homologous end joining, NHEJ), который часто сопровождается появлением инсерций и делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания гена и образованию нефункционального белка [3]. Роль PrimPol в ответе на повреждения ДНК почти не исследовалась в опухолевых клетках. Мутации *PRIMPOL* (5'UTR-вариант и замена Y100H) обнаружены в других культурах клеток карциномы лёгкого человека [4, 5] и описаны в базе COSMIC. В настоящей работе с помощью CRISPR/Cas была получена клеточная линия аденокарциномы лёгкого человека A549 (немелкоклеточный рак лёгких), нокаутная по гену *PRIMPOL*. Особенностью линии является наличие мутации в *KRAS* (замена G12S) [6]. Линию отличает простота ведения культуры и высокая эффективность трансфекции.

Генетические конструкции для редактирования гена *PRIMPOL*. С помощью биоинформационической платформы Benchling.com были подобраны два варианта направляющей РНК с максимальными показателями эффективности и специфичности к гену *PRIMPOL*. Олигонуклеотиды, содержащие последовательности протоспейсеров, сконструировали следующим образом: последовательность 5'-CACC-3' для создания липких концов, гуаниновый нуклеотид, который повышает эффективность целевой активности комплекса Cas9-sgRNA, и затем последовательность протоспейсера; другой олигонуклеотид содержал последовательность 5'-AAAC-3' для создания липких концов, последовательность, комплементарную протоспейсеру, и цитозиновый нуклеотид. В состав гена *PRIMPOL* входят 13 экзонов, целевые участки редактирования находились в экзоне 5 (протоспейсер 1 – 5'-TTAACAAACCTGCCAACCC-3') и экзоне 3 (протоспейсер 2 – 5'-AACGAGCATCTCATTATGAG-3'). После отжига олигонуклеотидов с последовательностью протоспейсеров с комплементарными последовательностями (табл. П1) полученные дуплексы с липкими концами клонировали с использованием эндонуклеазы BbsI («СибЭнзим», Россия) в плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458; плазмида любезно предоставлена Ф. Чжаном; Addgene #48138; <http://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138), кодирующую нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes* и репортерный ген усиленного зелёного флуоресцирующего белка (EGFP) [7].

Таблица П1. Последовательности олигонуклеотидов протоспейсеров для встраивания в плазмиду pX458

Название	Экзон	Последовательность (5' → 3')
PRIMPOL_1_for	5	CACCGTTAACAAACCTGCCAACCC
PRIMPOL_1_rev		AAACGGGTTGGCAGGTTGTTAAC
PRIMPOL_2_for	3	CACCGAACGAGCATCTCATTATGAG
PRIMPOL_2_rev		AAACCTCATAATGAGATGCTCGTTC

Получение моноклональных линий клеток А549, нокаутных по гену *PRIMPOL*. Клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей единую направляющую РНК (sgRNA) к гену *PRIMPOL*, с помощью лиофлактамина 3000 («Invitrogen», США) по протоколу производителя. Трансфицированные GFP⁺ клетки отбирали на клеточном сортере S3e Cell Sorter («BioRad», США). Для получения моноклональных линий отобранные клетки рассаживали по 96-луночным планшетам в разведениях 0,5, 1 и 2 клетки на лунку и культивировали в течение 3 недель. Из полученных моноклонов

выделяли геномную ДНК, амплифицировали целевые области гена *PRIMPOL* длиной около 500 п.о. и секвенировали по Сэнгеру. Эффективность внесения инсерций и делеций в результате двуцепочечных разрывов и запуска репарационного процесса системой CRISPR/Cas оценивали с помощью метода TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) с использованием платформы DESKGEN (<https://tide.nki.nl/>).

Скрининговая трансфекция показала, что sgRNA1 и sgRNA2 оптимальны для редактирования. Согласно анализу методом TIDE, делеции и инсерции произошли в 35,3% и 40% целевых локусов после трансфекции плазмидами, кодирующими sgRNA1 и sgRNA2 соответственно.

На следующем этапе получали моноклоны клеток А549 с использованием sgRNA1, направленной на экзон 5 гена *PRIMPOL*. Сайт расщепления sgRNA1/Cas9 расположен рядом с сайтом рестриктацзы BssECI C⁺CNNGG (рис. П1, а). Внесение делеций и инсерций подтверждали с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Полученные ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BssECI («СибЭнзим») по протоколу производителя и анализировали в 2%-ном агарозном геле.

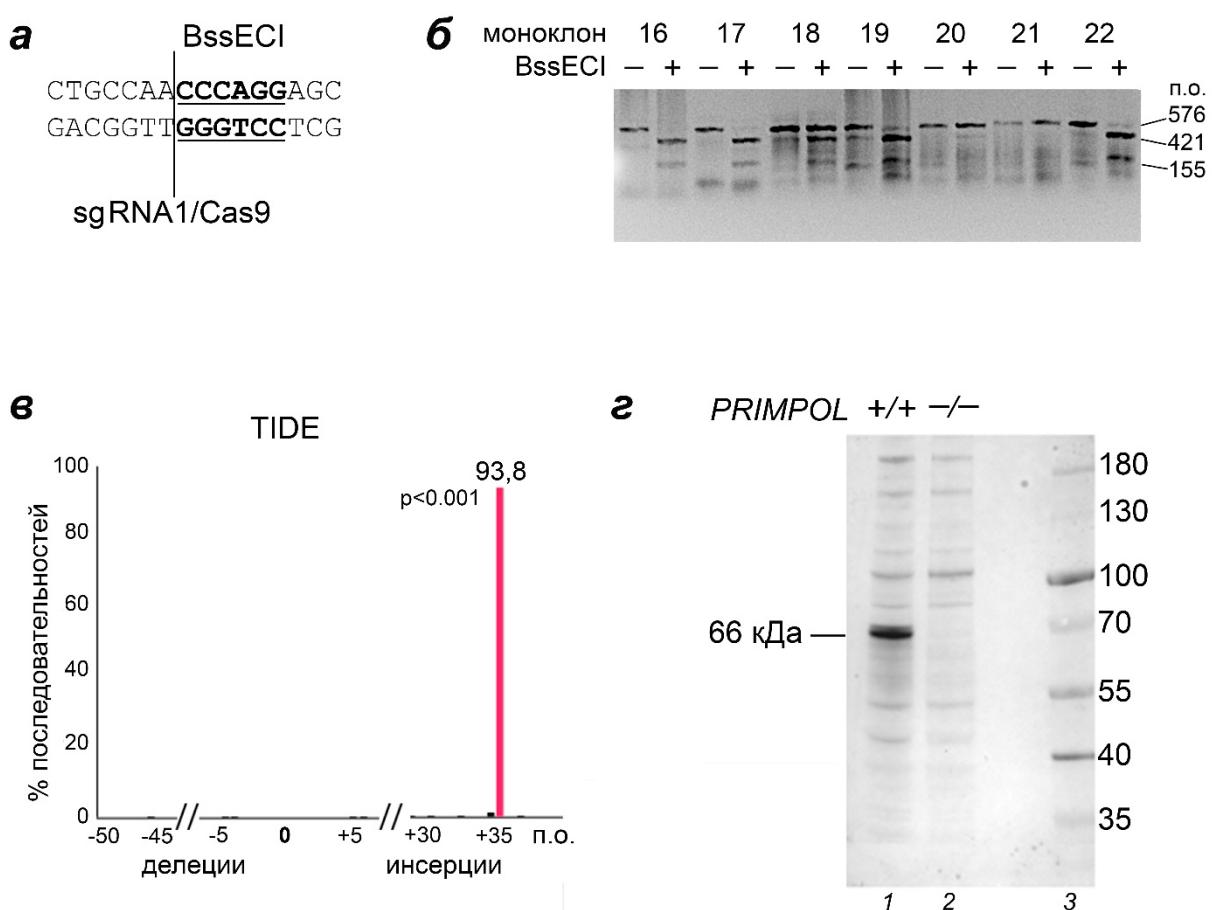


Рис. П1. Анализ моноклональных линий. *a* – Расположение сайтов расщепления sgRNA1/Cas9 и BssECI в экзоне 5 гена *PRIMPOL*. *b* – Анализ моноклональных линий методом RFLP. ПЦР-продукт экзона 5 гена *PRIMPOL* размером 576 п.о. обрабатывали BssECI. В случае отсутствия редактирования и сохранения сайта рестрикции происходило расщепление ПЦР-продукта на фрагменты длиной 421 и 155 п.о., в случае же успешного редактирования гена системой sgRNA1/Cas9 сайт рестрикции исчезал. *c* – Анализ ПЦР-продуктов экзона 5 гена *PRIMPOL* моноклональной линии 21 методом TIDE. Столбец в центре диаграммы (положение «0») отражает количество ПЦР-продуктов в образце, идентичных таковым в клетках дикого типа (нередактированные последовательности). Столбец розового цвета показывает наличие инсерции ($p < 0,001$),

столбцы чёрного цвета показывают наличие последовательностей с инсерциями и делециями, которые с высокой вероятностью являются «шумом» секвенирования ($p > 0,001$). *г* – Анализ экспрессии PrimPol в моноклональной линии 21 с помощью иммуноблоттинга. Эндогенную PrimPol в тотальных экстрактах клеток детектировали с помощью поликлональных антител к полноразмерной PrimPol человека. Молекулярная масса PrimPol соответствует 66 кДа. Дорожка 1 – клетки дикого типа, дорожка 2 – моноклональная линия 21, дорожка 3 – маркер молекулярного веса.

Анализ семи моноклональных линий показал наличие двух потенциально гомозиготных нокаутных линий 20 и 21 (рис. П1, *б*, дорожки 9–12), у которых целевая область геномной ДНК была устойчива к действию BssECI. Секвенирование экзона 5 гена *PRIMPOL* и анализ TIDE (рис. П1, *в*) моноклона 21 подтвердили наличие вставки размером 35 п.о., приводящей к сдвигу рамки считывания, и отсутствие аллеля дикого типа.

Иммуноблоттинг. Наличие эндогенного белка PrimPol в лизатах клеток A549 дикого типа и моноклональной линии 21 анализировали с помощью иммуноблоттинга с поликлональными кроличьими антителами к полноразмерному рекомбинантному белку PrimPol. Клетки в количестве 5×10^7 промывали холодным буфером PBS, добавляли 3 объёма холодного PBS и механически разрушали пестиком в 1,5-мл пробирке со стеклянной пудрой. Полученную суспензию центрифугировали при 14 тыс. об./мин в течение 10 мин при 0 °C и измеряли концентрацию белка методом Брэдфорда. Проводили электрофорез в 13%-ном денатурирующем полиакриламидном геле, нанося 40 мг свежего лизата в одну лунку. Перенос белков на поливинилиденфторидную мембрану осуществляли в буфере для переноса (47,9 мМ Tris, 38,6 мМ глицин, 0,0385%-ный додецилсульфат натрия, 20%-ный этанол) при 200 mA и 4 °C в течении 1,5 ч.

Для детекции PrimPol использовали поликлональные антитела кролика, полученные компанией «Алмабион» (Россия). Четырёхкратную иммунизацию кролика проводили 2 мг (суммарно) полноразмерного белка PrimPol, антитела очищали с помощью Protein A-сефарозы. В качестве контроля загрузки использовали антитела к GAPDH («BioRad», каталожный номер 12004168). Мембранные блокировали 5%-ным раствором сухого молока в PBS и инкубировали в течение 2 ч при 22 °C с антителами к PrimPol в разведении 1 : 300 или антителами к GAPDH в разведении 1 : 5000, после чего промывали PBS и инкубировали со вторичными антителами против IgG кролика в разведении 1 : 1000 («Abcam», Великобритания, ab97020). Визуализацию сигнала PrimPol на мембране проводили набором AP Conjugate Substrate Kit («BioRad») по протоколу производителя. Визуализацию сигнала GAPDH проводили с помощью системы ChemiDoc Imaging System («BioRad»).

В линии клеток дикого типа был обнаружен сигнал на уровне 66 кДа, соответствующий расчётной молекулярной массе PrimPol (рис. П1, *г*, дорожка 1). Полоса полностью исчезала в моноклональной линии 21 (рис. П1, *г*, дорожка 2), что свидетельствует об успешном получении линии с нокаутом *PRIMPOL*.

Анализ неспецифического редактирования. В процессе геномного редактирования может происходить неспецифическое редактирование. Последовательности пяти наиболее вероятных неспецифических сайтов редактирования sgRNA1 были предсказаны Benchling.com (табл. П2). Вероятность редактирования для них составляла 0,3–1,5%.

Таблица П2. Последовательности вероятных сайтов неспецифического редактирования sgRNA1

Последовательность сайта редактирования	Процент вероятности	Ген	Белок
TTTAACAAACCTGCCAACC C	100%	<i>CCDC111</i>	PrimPol
CTTGACAAACCGGCTAACCC C	1,5%	<i>MTMR9</i>	Myotubularin Related Protein 9
ATCCACACACACCTGCCGACC C	1,4%	<i>MICU1</i>	Mitochondrial Calcium Uptake 1
TTCAACACAGCTGCCAGCC C	0,6%	<i>ZFP512B</i>	Zinc finger protein 512B
TTAAACTCACCTTCCAACC C	0,4%	<i>MYO1B</i>	Myosin IB
CTTAACAGAACTGCCAAGC C	0,3%	<i>RIC3</i>	RIC3 Acetylcholine Receptor Chaperone

Отсутствие инсерций и делеций в данных областях в моноклональной линии 21 было подтверждено с помощью секвенирования. Для амплификации таргетных последовательностей ДНК использовали пары праймеров из табл. П3.

Таблица П3. Праймеры для ПЦР с геномной ДНК, использованные для проверки сайтов неспецифического редактирования системой sgRNA/Cas9

Ген	Праймер 1	Праймер 2
<i>RIC3</i> (ENSG0000016640 5)	GCTTTAGGTAAAGGACTGTCC	GAGAACATTGGTTGTGGG G
<i>MYO1B</i> (ENSG0000012864 1)	AATAATGCTGTGTCCTGAGT C	TATTATTCAGGACTTCCT GC
<i>ZNF512B</i> (ENSG0000019670 0)	CAGTTCCCATAATCAAATGAC C	CTTGCTTCTGTTTCTACCTC
<i>MICU1</i> (ENSG0000010774 5)	CTAACACAGATCCTCCTGG	TCGCTTACCCAAACAGTAA C
<i>MTMR9</i> (ENSG0000010464 3)	GTGACTCTGGATTAAAGTG C	TTAACACTAGCCATCTGTG C
<i>RP11-252M24,1</i> (ENSG0000028045 5)	TTATTGGACCTTCCAAACC C	AGATAAGGAAAACCTAGGC AG
<i>RP11-75C10,6</i> (ENSG0000027980 1)	GAGAAAGTTCACAGTTGA GG	AGCAATATCCCTCCCTATCC

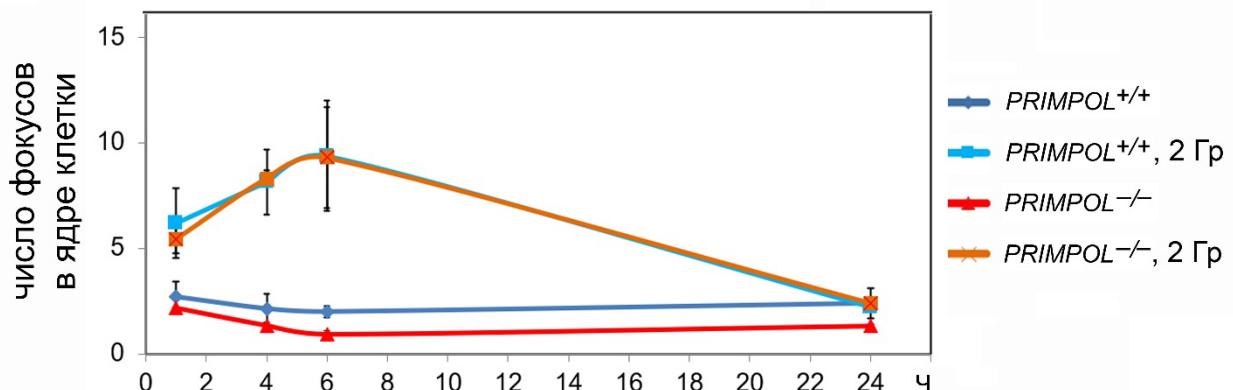


Рис. П2. Оценка чувствительности клеток A549 к ионизирующему излучению с помощью иммунофлуоресцентного анализа радиационно-индукционных фокусов, содержащих RAD51 (максимальное число фокусов RAD51 (через 6 ч) > 3 раза ниже максимального числа локусов γH2AX (через 1 ч))

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, M. K., Dey, D., Dasgupta, A., Kazi, T. A., Gupta, R., Sinharoy, S., Acharya, K., Chattopadhyay, D., Ravichandiran, V., Roy, S., and Ghosh, D. (2019) CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing, *Life Sci.*, **232**, 116636, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116636.
2. Musunuru, K. (2017) The hope and hype of CRISPR-Cas9 genome editing: a review, *JAMA Cardiol.*, **2**, 914-919, doi: 10.1001/jamacardio.2017.1713.
3. Bothmer, A., Phadke, T., Barrera, L. A., Margulies, C. M., Lee, C. S., Buquicchio, F., Moss, S., Abdulkерim, H. S., Selleck, W., Jayaram, H., Myer, V. E., and Cotta-Ramusino, C. (2017) Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus, *Nat. Commun.*, **8**, 13905, doi: 10.1038/ncomms13905.
4. Liu, J., Lee, W., Jiang, Z., Chen, Z., Jhunjhunwala, S., Haverty, P. M., Gnad, F., Guan, Y., Gilbert, H. N., Stinson, J., Klijn, C., Guillory, J., Bhatt, D., Vartanian, S., Walter, K., Chan, J., Holcomb, T., Dijkgraaf, P., Johnson, S., Koeman, J., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Stern, H. M., Hoeflich, K. P., Wu, T. D., Settleman, J., de Sauvage, F. J., Gentleman, R. C., Neve, R. M., Stokoe, D., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Shames, D. S., and Zhang, Z. (2012) Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events, *Genome Res.*, **22**, 2315-2327, doi: 10.1101/gr.140988.112.
5. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., Blanco-Franco, L., Guerra, S., Martínez-Jiménez, M. I., Méndez, J., and Blanco, L. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
6. Yoon, Y.-K., Kim, H.-P., Han, S.-W., Oh, D. Y., Im, S.-A., Bang, Y.-J., and Kim, T.-Y. (2010) KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach, *Mol. Carcinog.*, **49**, 353-362, doi: 10.1002/mc.20607.
7. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **8**, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.