

УДК 577.29

# Специфичная активация экспрессии генов факторов роста в линии клеток человека Hcr1293F с помощью технологии CRISPR/Cas9-SAM приводит к повышению их пролиферации

П. А. Бобровский<sup>1,2\*</sup>, Е. Н. Графская<sup>1</sup>, Д. Д. Харлампиева<sup>1</sup>, В. А. Манувера<sup>1,2</sup>, В. Н. Лазарев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

\*E-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 18.04.2024

Принята к печати 02.08.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27415

**РЕФЕРАТ** Культивируемые линии клеток человека, широко применяемые в биотехнологии и фармакологии, нуждаются в питательных средах сложного состава, содержащих сигнальные белки – факторы роста. Мы опробовали новый подход, позволяющий снизить зависимость роста культивируемых линий клеток человека от экзогенных ростовых факторов. Этот подход основан на получении модифицированной линии клеток, в которой избирательно активирована экспрессия одного из собственных генов ростовых факторов – IGF-1, FGF-2, EIF3I. Модифицировали линию клеток Hcr1293F, вариант линии клеток HEK293 (клетки эмбриональной почки человека), широко используемый для получения рекомбинантных белков. Экспрессию генов выбранных ростовых факторов в этих клетках активировали с помощью технологии CRISPR/Cas9 с синергичными медиаторами активации – CRISPR/Cas9-SAM, что привело к увеличению экспрессии выбранных генов и продукции целевых белков. Модифицированные линии клеток, культивируемые в стандартных условиях, характеризуются повышенной пролиферацией. При совместном культивировании трех модифицированных линий наблюдается синергичный эффект. На наш взгляд, полученные результаты говорят о перспективности выбранного нами подхода получения модифицированных клеточных линий для использования в биотехнологии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** CRISPR/Cas9-SAM, HEK293, пролиферация, IGF-1, FGF-2, EIF3I.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЭТС – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; HEK293 – линия клеток эмбриональной почки человека; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; FGF-2 – фактор роста фибробластов 2; EIF3I – эукариотический фактор инициации трансляции, субъединица I; SAM – синергичные медиаторы активации; гРНК – гидовая (направляющая) РНК.

## ВВЕДЕНИЕ

Важное место в фармакологии, биотехнологии и фундаментальных исследованиях занимают линии клеток млекопитающих, в том числе и человека. Иммуортализованные линии клеток культивируются *in vitro* наподобие микроорганизмов, но на молекулярном уровне они сохраняют практически все черты клеток организма, из которого были получены. Однако, в отличие от бактерий и дрожжей,

линии клеток млекопитающих гораздо более требовательны к условиям культивирования и составу питательных сред. В состав этих сред, помимо низкомолекулярных соединений, обязательно должны входить специальные сигнальные белки, обеспечивающие пролиферацию клеток. При рутинном культивировании эти компоненты поступают в среду вместе с эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (ЭТС), которая имеет непостоянный

состав и при этом дорого стоит. Более того, использование сыворотки недопустимо при производстве рекомбинантных белков для медицинских целей, учитывая низкую воспроизводимость получаемых результатов и запрет на использование компонентов животного происхождения [1, 2]. К тому же ЭТС негативно влияет на суспензионное культивирование, что требует внесения дополнительных компонентов или перехода к адгезивному культивированию и в разы повышает стоимость производства [3]. Белки, необходимые для нормального роста клеток, могут быть добавлены в питательную среду, а могут продуцироваться клетками. В связи с тем, что стоимость сред и ростовых факторов составляет основную часть затрат на культивирование эукариотических клеток, переход к культивированию в базовых средах может существенно удешевить производство рекомбинантных белков, пригодных для применения в биофармацевтических целях. Вторым важным моментом является короткое время полужизни факторов роста в среде, что приводит к еще большему повышению стоимости при продолжительном культивировании в биореакторах [4]. Поэтому актуальной представляется модификация клеточных линий, направленная на активацию экспрессии собственных генов ключевых ростовых факторов для поддержания нормальной пролиферации клеток, способных расти и продуцировать рекомбинантные белки в минимальных питательных средах.

Более 70% рекомбинантных белков, нарабатываемых в эукариотических системах экспрессии, получают при культивировании клеток яичника китайского хомячка (СНО) [5]. Несмотря на то, что эта линия клеток обладает хорошей пролиферативной активностью и позволяет получать рекомбинантные белки в больших количествах, существуют некоторые ограничения для ее использования. Некоторые посттрансляционные модификации белков в клетках СНО, например паттерн гликозилирования, не характерны для человеческих белков [6]. Это обстоятельство потенциально может сделать продукт, получаемый в клетках СНО, иммуногенным для человека [7]. Одной из альтернатив клеткам СНО является линия клеток НЕК293 человека. Эта линия лучше подходит для производства биофармацевтических препаратов, посттрансляционные модификации которых характерны для белков человека. Линия клеток НЕК293, несмотря на ее эпителиальное происхождение и адгезивную природу, в настоящее время адаптирована к суспензионному культивированию в бессывороточных или химически определенных средах и используется для получения рекомбинантных белков как в лабораторных условиях, так и в производственных масштабах [8].

Работы по оптимизации питательных сред привели к появлению нескольких коммерческих составов химически определенных сред, а также различных добавок в виде компонентов животного происхождения, позволяющих получать рекомбинантные белки в клетках линии НЕК293 в больших количествах [9]. Тем не менее эта клеточная линия продолжает отставать от линии СНО, которая занимает лидирующие позиции в производстве фармацевтических рекомбинантных белков. НЕК293 уступает в пролиферативной активности, времени культивирования и выходе продукта [10]. Активация экспрессии генов ключевых ростовых факторов в линии клеток НЕК293 потенциально может увеличить их пролиферативную активность и продуктивность. Продукция эндогенных ростовых факторов может помочь обойтись без использования культуральных сред, имеющих компоненты животного происхождения и значительно снизить стоимость производства по сравнению с применением коммерческих сред, содержащих очищенные ростовые факторы. Следует отметить, что использование рекомбинантных ростовых факторов в качестве добавки для имитации состава сыворотки крови делает культуральные среды весьма дорогими, в том числе из-за быстрой деградации факторов в культуральной среде [11].

Отталкиваясь от приведенных соображений, мы решили получить линии клеток НЕК293 с активированной экспрессией одного из трех генов собственных ростовых факторов – IGF-1, FGF-2, EGF3I. Описаны положительные эффекты повышенной продукции этих факторов роста на пролиферацию клеточной культуры или на наработку целевого рекомбинантного белка [12–15]. Для модификации была выбрана линия Expi293F – суспензионный вариант линии НЕК293, адаптированный к эффективной продукции рекомбинантных белков [16]. Экспрессию генов ростовых факторов активировали, используя технологию синергичных медиаторов активации (CRISPR/Cas9-SAM), которая является вариацией CRISPR/Cas9-системы геномного редактирования. Эта система позволяет увеличивать уровень экспрессии целевых генов [17]. Предлагаемый подход, с одной стороны, позволяет весьма эффективно достигать высоких уровней экспрессии целевых генов [18], с другой, подбирать несколько вариантов точной настройки экспрессии генов ростовых факторов. Кроме того, используя технологию CRISPR/Cas9-SAM, в дальнейшем можно быстро активировать экспрессию других ростовых факторов и анализировать их влияние на способность культуры расти в базовой бессывороточной питательной среде. Мы показали активацию экс-

прессии выбранных генов в полученных линиях клеток как на уровне мРНК, так и на уровне белков. Активация экспрессии генов ростовых факторов привела к увеличению пролиферации модифицированных клеточных линий. Полученные результаты подтверждают эффективность выбранного подхода к созданию новых линий клеток человека, используемых в биофармацевтике.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальные штаммы и клеточные линии

В генно-инженерных работах использовали штамм *E. coli* Top10 (Invitrogen, США), генотип *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ*.

В работе использовали клеточные линии Expi293F™ (Gibco, США) и Phoenix-AMPHO (ATCC CRL-3213).

### Культивирование клеточных линий

Клетки Expi293F для проведения манипуляций были переведены в условия адгезионного роста. Клетки культивировали в среде DMEM (HiMedia, Индия), дополненной 10% ЭТС (Gibco), 1.5 мкг/мл гентамицина (Gibco) при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ( Heraeus, Германия), относительной влажности ≥ 80% и 5% CO<sub>2</sub>.

### Конструирование плазмид для получения лентивирусных частиц

Для системы активации экспрессии CRISPR/Cas9-SAM требуются три лентивирусных вектора, которые получают с использованием трех плазмид: lenti\_sgRNA(MS2)\_puro (Addgene #73795), lenti\_MS2-P65-HSF1\_Hygro (Addgene #61426), lenti\_dCAS-VP64\_Blast (Addgene #61425) [17]. Две из этих плазмид используются в неизменном виде, а плазида lenti\_sgRNA(MS2)\_puro должна нести короткий участок ДНК, кодирующий протоспейсер геновой РНК (гРНК). Перед подбором протоспейсерных последовательностей участки ДНК, соответствующие 5'-прилежащим областям генов ростовых факторов, валидировали путем секвенирования. Последовательности протоспейсеров подбирали с использованием сервиса CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). К промоторной области каждого гена ростовых факторов (IGF-1, FGF-2, EIF3I) были подобраны по шесть протоспейсерных последовательностей. Вектор lenti\_sgRNA(MS2)\_puro для получения вектора, кодирующего химерную гРНК, обработали эндонуклеазой рестрикции BsmBI (Thermo Fisher Scientific, США),

после чего лигировали с олигонуклеотидным дуплексом, соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей (Приложение 1, Приложение 2). Продукты лигирования клонировали в штамм *E. coli* Top10 и отбирали колонии, несущие целевую конструкцию. В результате сконструировали 18 плазмидных векторов на основе lenti\_sgRNA(MS2)\_puro, кодирующих гРНК, нацеленные на промоторные области генов ростовых факторов.

### Продукция лентивирусов и трансдукция

Для сборки лентивирусов культуральную среду клеток Phoenix-AMPHO заменяли на DMEM с 25 мкМ хлорохиндифосфата (Sigma, США) и инкубировали в течение 5 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки Phoenix-AMPHO трансфицировали одновременно четырьмя плазмидами (lenti\_dCAS-VP64\_Blast/lenti\_MS2-P65-HSF1\_Hygro/lenti\_sgRNA(MS2)\_puro/LeGo\_G2 (Addgene# 25917) [19], pMD2.G (Addgene # 12259), pRSV-Rev, pMDL/pRRE [20]) с помощью полиэтиленimina: PEIMAX 40K (1 мг/мл, Polysciences, США) (соотношение ДНК : PEI = 1:3) согласно описанной ранее методике [21]. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь ДНК-PEI по каплям добавляли к клеткам и инкубировали в течение 6 ч. Затем среду меняли на Opti-MEM с 2 мМ бутиратом натрия (Sigma). Через 48 ч среду, содержащую лентивирусы, фильтровали через 0.22-мкм фильтр (TPP, Швейцария), добавляли 100 мкг/мл протамина сульфата («Эллара», Россия) и немедленно наносили на клетки Expi293F для заражения. После инкубации в течение 24 ч среду заменяли свежей полной средой DMEM. Клетки пассировали по меньшей мере 3 раза после лентивирусной трансдукции с соответствующим антибиотиком. В случае лентивирусов lenti\_dCAS-VP64-Blast использовали бластицидин в концентрации 7 мкг/мл, lenti\_MS2-P65-HSF1-Hygro гиромоцилин в концентрации 300 мкг/мл, lenti\_sgRNA(MS2)\_puro – пуromoцилин в концентрации 2 мкг/мл. Для определения эффективности трансдукции в клетках после трех пассажей анализировали экспрессию целевого гена.

### Количественная ПЦР

Трансдуцированные клетки снимали с использованием 0.05% раствора трипсина с EDTA (Gibco), центрифугировали в течение 5 мин при 500 g, отбирали надосадочную жидкость. Суммарную РНК выделяли из образцов, содержащих примерно 10<sup>6</sup> клеток, с использованием реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific). Суммарную РНК обрабатывали 2 ед. акт. ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific) в присутствии 20 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз

(Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили с помощью RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) с использованием гексамерных праймеров. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch (BioRad, США) с использованием готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Нормализацию данных проводили по уровню референсного гена *gaphd* (Приложение 1).

### Измерение пролиферативной активности

Для визуализации прироста модифицированных клеток по  $2 \times 10^4$  клеток высевали на лунку шестилуночного планшета, культивировали в среде DMEM с 10% ЭТС в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в углекислотном инкубаторе, затем переносили в систему многопараметрического анализа для визуализации живых клеток Celena X High Content Imaging System (Logos Biosystems, Республика Корея) и в течение 190 ч культивировали в изолированной камере при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. По мере испарения объем лунки восполняли питательной средой. Клетки в канале GFP (470/530 нм) снимали при 10-кратном увеличении каждые 8 ч, по 324 поля зрения на лунку, с лазерной автофокусировкой каждые 10 полей зрения. Обработку изображений выполняли с помощью программы Celena EXPLORER (Logos Biosystems).

Для сравнения роста модифицированных клеток в базовой среде без добавления ЭТС использовали метод измерения электрического сопротивления (импеданса) между электродами, расположенными на дне лунок планшета с помощью биосенсорного клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent, США). Изменение импеданса зависит от площади контакта клеток с электродом, на основании этого параметра автоматически вычисляется клеточный индекс, характеризующий состояние клеточной культуры в момент времени. Модифицированные клетки высевали по 10<sup>4</sup> клеток в лунку 16-луночного планшета E-plate (Agilent). Через 40 ч среду заменяли на свежую среду DMEM, содержащую 1.5 мкг/мл гентамицина, с 10% ЭТС или без сыворотки. Планшеты переносили в клеточный анализатор и в течение 120 ч культивировали клетки при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Измерение электрического сопротивления проводили каждые 30 мин.

Влияние кондиционированной среды на рост немодифицированных клеток сравнивали с помощью колориметрического теста с соединением тетразолия. Клетки Expi293F высевали по 10<sup>4</sup> в лунку 96-луночного планшета. Через 24 ч в каждую лунку добавляли по 100 мкл кондиционированной

среды от модифицированных клеток. Для получения кондиционированной среды монослой модифицированных клеток промывали PBS и инкубировали со средой Opti-MEM (Gibco) в течение 48 ч. В качестве контроля использовали кондиционированную среду от клеток Expi293F-dCas9-MS2. Среду отбирали, концентрировали в 10 раз с помощью центрифужного концентратора Microcon 3kDa (Millipore, США). Кондиционированную среду смешивали с базовой средой DMEM или Opti-MEM, содержащей 1.5 мкг/мл гентамицина, раствор аминокислот (Himedia), витаминный раствор для RPMI 1640 (Himedia), в отношении 1 : 10 и использовали в экспериментах. Через 96 ч клеткам добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 5 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 4 ч в термостате. Добавляли солюбилизирующий раствор и измеряли поглощение при 570/690 нм на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Fisher Scientific).

### Иммуноблот

Для проведения вестерн-блот-гибридизации разделенные белки в ходе электрофореза переносили на PVDF-мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (Amersham Biosciences, США). Перенос проводили в камере Hoefer TE77XP (США) при силе тока 0.8 мА/см<sup>2</sup> при ограничении напряжения 30 В в течение 1 ч. Для детекции IGF-1 использовали антитела PAA050Hu06 (CloudClone, США) в разведении 1 : 1000; для FGF-2 использовали антитела PAA551Hu01 (CloudClone) в разведении 1 : 400; для EIF3I использовали антитела DF12393 (Affinity Biosciences, Китай) в разведении 1 : 2000.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни с использованием языка программирования Python (версия 3.12) (Python Software Foundation, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Получение промежуточной линии клеток Expi293F, несущей общие компоненты системы CRISPR/Cas9-SAM

Для активации экспрессии гена с помощью системы CRISPR/Cas9-SAM необходимы три компонента. В связи с этим в культуре клеток Phoenix-AMPHO были получены лентивирусные частицы, несущие интеграционную кассету, кодирующую ген слитого белка dCas9-VP64, частицы, кодирующие химерный белок MS2-p65-HSF, частицы, кодирующие гРНК. Лентивирусными частицами трансдуцировали клет-

ки Expi293F. В результате трансдукции вектором MS2-P65-HSF1\_Hygro была получена линия-предшественник Expi-MS2, несущая конструкцию, кодирующую химерный белок MS2-p65-HSF. После селекции на среде, содержащей гиромидин, и клонирования, с помощью количественной ОТ-ПЦР была отобрана линия с высоким уровнем экспрессии рекомбинантного гена *MS2-P65-HSF1*. Далее линию Expi-MS2 трансдуцировали лентивирусными частицами dCas9-VP64 с целью получения линии-предшественника Expi-dCas9-MS2, кодирующей химерный белок MS2-p65-HSF и дефектную нуклеазу dCas9-VP64. После трансдукции клеток проводили селекцию на среде, содержащей гиромидин и бластицидин. Экспрессию рекомбинантных генов подтверждали количественной ОТ-ПЦР. Таким образом была получена линия-предшественник Expi293F, кодирующая два компонента системы CRISPR/Cas9-SAM, пригодная для трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими специфичную гРНК.

**Получение линий клеток с активированной экспрессией генов ростовых факторов**

Для целевой активации экспрессии одного из четырех выбранных генов клетки линии Expi-dCas9-MS2 трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими гРНК. Как описано выше, к каждому из выбранных ростовых факторов сконструировали по шесть векторов и получили лентивирусные частицы. Векторам были присвоены названия, соответствующие первой букве названия гена и порядковому номеру протоспейсерной последовательности (Приложение 2). Далее было необходимо выбрать наиболее перспективные гРНК, которые обеспечивают повышение уровня экспрессии генов ростовых факторов IGF-1, FGF-2 и EIF3I. После трансдукции клетки культивировали в течение 72 ч. Транскрипционную активацию генов ростовых факторов определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР (рис. 1).

Показано наличие экспрессии гена *IGF-1* при использовании четырех гРНК из шести. Поскольку в клетках эмбриональной почки человека *IGF-1* не экспрессируется, оценить изменение уровня экспрессии невозможно. В дальнейшей работе исследовали линии, полученные с использованием гРНК i2 и i5, при анализе которых с помощью ПЦР-РВ наблюдалось наименьшее значение порогового цикла (табл. 1). Определение уровня экспрессии гена *FGF-2* показало, что экспрессия всех гРНК приводит к увеличению экспрессии *FGF-2* – в 2–5 раз. Для дальнейшей работы были выбраны гРНК f5 и f6 (табл. 1). Показано также, что экспрессия всех шести гРНК приводит к увеличению уровня экс-

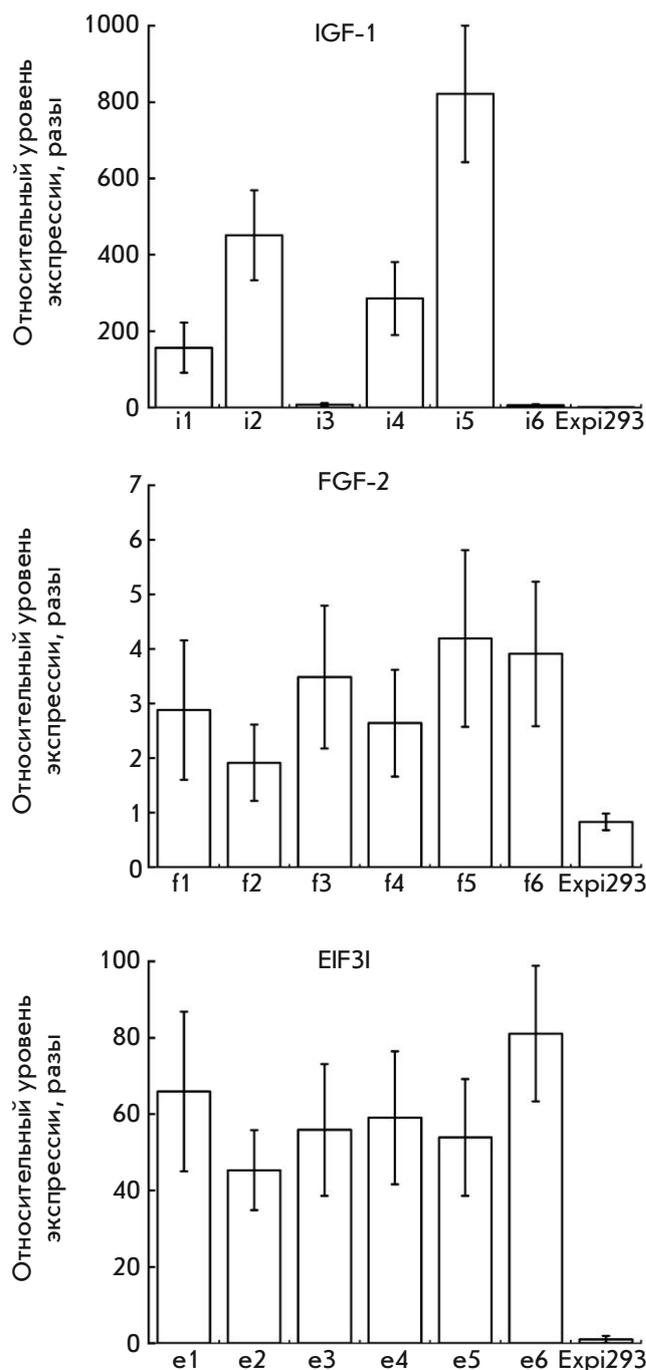
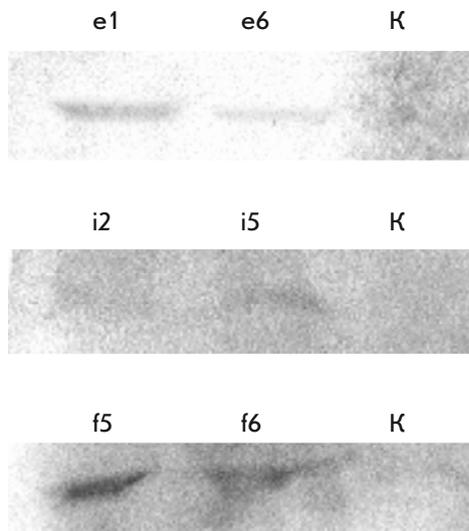


Рис. 1. Анализ уровня экспрессии генов ростовых факторов IGF-1, FGF-2, EIF3I в клеточных линиях Expi-dCas9-MS2, трансдуцированных лентивирусными векторами, кодирующими гидовые РНК, нацеленные на промоторные регионы соответствующих генов. Экспрессию генов *IGF-1*, *FGF-2*, *EIF3I* активировали с использованием лентивирусных векторов, кодирующих гРНК i1–i6, f1–f6, e1–e6 (ось абсцисс) (Приложение 2). Представлены средние значения относительно уровня экспрессии со стандартными отклонениями

**Таблица 1.** Протоспейсерные последовательности гидовых РНК, обеспечивающих наибольший уровень экспрессии целевых генов

Ген	Протоспейсер	Конструкция
<i>IGF-1</i>	AGGCATACAATGGAAATAGG	i2
<i>IGF-1</i>	GTGTTTTGTAGATAAATGTG	i5
<i>FGF-2</i>	GGCCGAACCGCCGAACCTCAG	f5
<i>FGF-2</i>	CGCGCGACATCAGTCCGGCG	f6
<i>EIF3I</i>	AGGATCCTTCCAGGGCAAAG	e1
<i>EIF3I</i>	GAATGTCTTTTCTTGGAGGG	e6



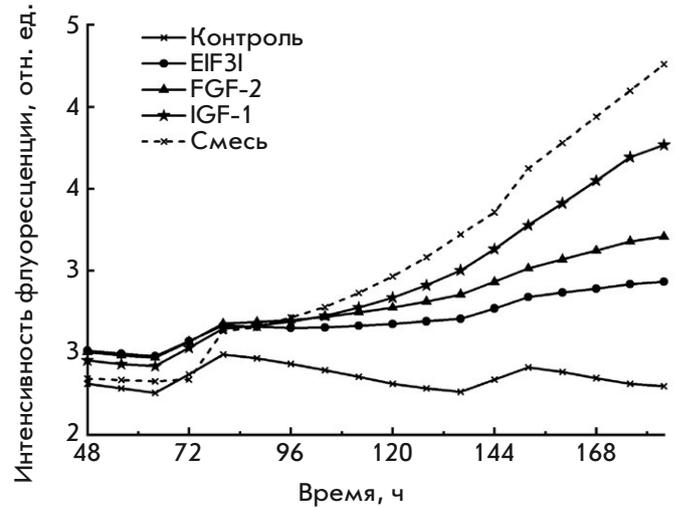
**Рис. 2.** Иммуноблот образцов культуральной жидкости клеток Expi293F с активированной экспрессией генов ростовых факторов. Образцы e1, e6 – клетки с активированной экспрессией гена *EIF3I*; f5, f6 – клетки с активированной экспрессией гена *FGF-2*; i2, i5 – клетки с активированной экспрессией гена *IGF-1*. К – клетки Expi293F

прессии гена фактора *EIF3I* в 44–81 раз. Далее исследовали линии, полученные с использованием гРНК e1 и e6 (табл. 1).

**Обнаружение индуцированного накопления ростовых факторов с помощью иммуноблотинга**

Продукты экспрессии активированных генов выявляли методом вестерн-блот-гибридизации с применением антител, специфичных к исследуемым факторам роста. В случае секретируемых факторов роста (*IGF-1*, *FGF-2*) анализировали культуральную среду, для обнаружения внутриклеточного фактора роста (*EIF3I*) анализировали клеточные лизаты (рис. 2).

В ходе анализа факторы *EIF3I*, *IGF-1*, *FGF-2* обнаружены в среде культивирования клеток, транс-

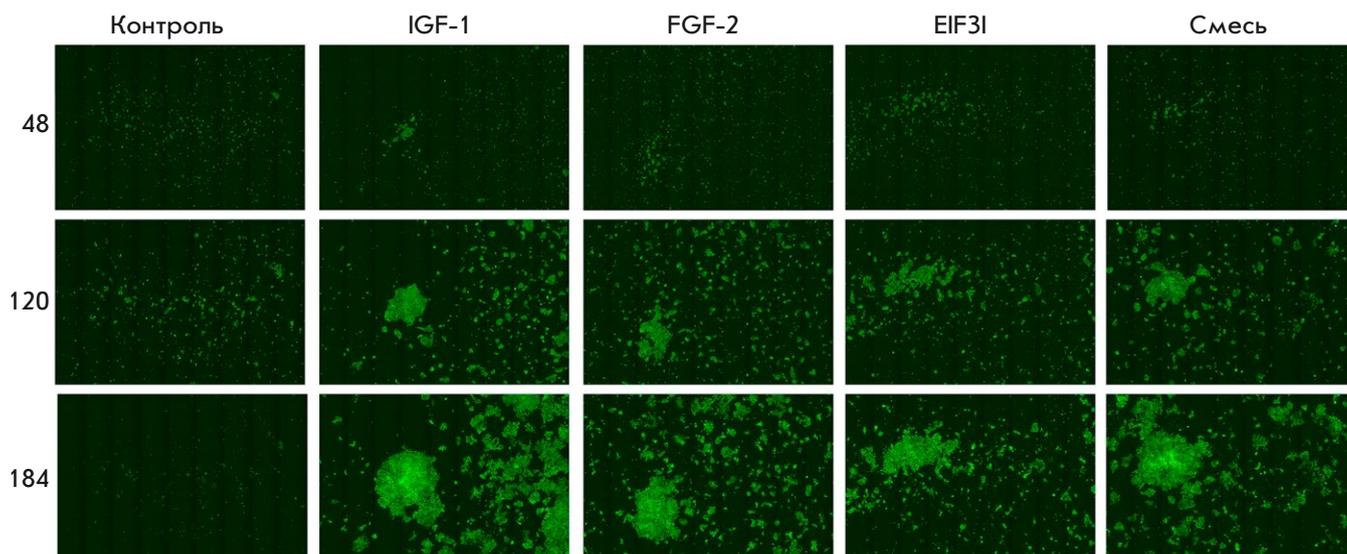


**Рис. 3.** Анализ пролиферативной активности модифицированных клеточных линий. Клетки Expi293F-dCas9-MS2 (GFP), культивируемые в среде DMEM с 10% ЭТС, были трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими гРНК, для активации экспрессии генов ростовых факторов. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью системы визуализации Celena X. Суммарное значение флуоресценции в полях зрения получали с помощью программного обеспечения Fiji [22]. Контроль – клетки Expi293F-dCas9-MS2 (GFP), *EIF3I*, *FGF-2*, *IGF-1* – клетки с повышенной экспрессией генов соответствующих ростовых факторов, полученные в ходе трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими гРНК e6, f6 и i2 соответственно, смесь – совместное культивирование клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I

дуцированных лентивирусными векторами, кодирующими гРНК e1, e6, i2, i5, f5, f6 (табл. 1).

**Пролиферация модифицированных клеточных линий**

Пролиферативную активность клеточных линий изучали с использованием системы многопараметрического анализа Celena X High Content Imaging System. С целью облегчения визуализации и последующей обработки данных клетки Expi293F-dCas9-MS2 трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим зеленый флуоресцентный белок, а затем лентивирусными векторами e1, e6, i2, i5, f5, f6, чтобы активировать экспрессию генов ростовых факторов. Пролиферацию оценивали путем анализа изменения уровня интенсивности флуоресценции клеток за счет накопления в них белка eGFP. Помимо клеточных линий, экспрессирующих лишь один из исследуемых факторов (*IGF-1*, *EIF3I* и *FGF-2*), исследовали и смешанную культуру всех трех линий для оценки возможного синергичного эффекта (рис. 3).



**Рис. 4.** Сравнение прироста модифицированных клеток, экспрессирующих гены ростовых факторов IGF-1, FGF-2 и EIF3I. Контроль – клетки Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированные лентивирусным вектором LeGo-G2. IGF-1, FGF-2 и EIF3I – клетки Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированные лентивирусным вектором LeGo-G2 и векторами i2, f6 и e6 соответственно. Смесь – совместное культивирование клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I. Изображения получены с помощью системы Celena X High Content Imaging System. Каждое изображение содержит 72 поля зрения

В результате показано увеличение пролиферативной активности как клеток с повышенным уровнем экспрессии факторов IGF-1, EIF3I и FGF-2 по отдельности (*рис. 4*), так и при их совместном культивировании. При этом пролиферативная активность была выше при совместном культивировании.

Пролиферацию клеток в базовой бессывороточной среде изучали с использованием клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP, позволяющего оценивать жизнеспособность клеточных культур в режиме реального времени без дополнительных маркеров и меток. Показано, что пролиферативная активность совместно культивируемых клеток, экспрессирующих IGF-1, EIF3I и FGF-2, в среде DMEM без добавления ЭТС была выше, чем у немодифицированных клеток (*рис. 5А*), но ниже, чем у немодифицированных клеток, культивируемых в среде, содержащей 10% ЭТС. При культивировании клеток, продуцирующих один из исследуемых факторов, повышения пролиферативной активности не наблюдали (*рис. 5Б–Г*).

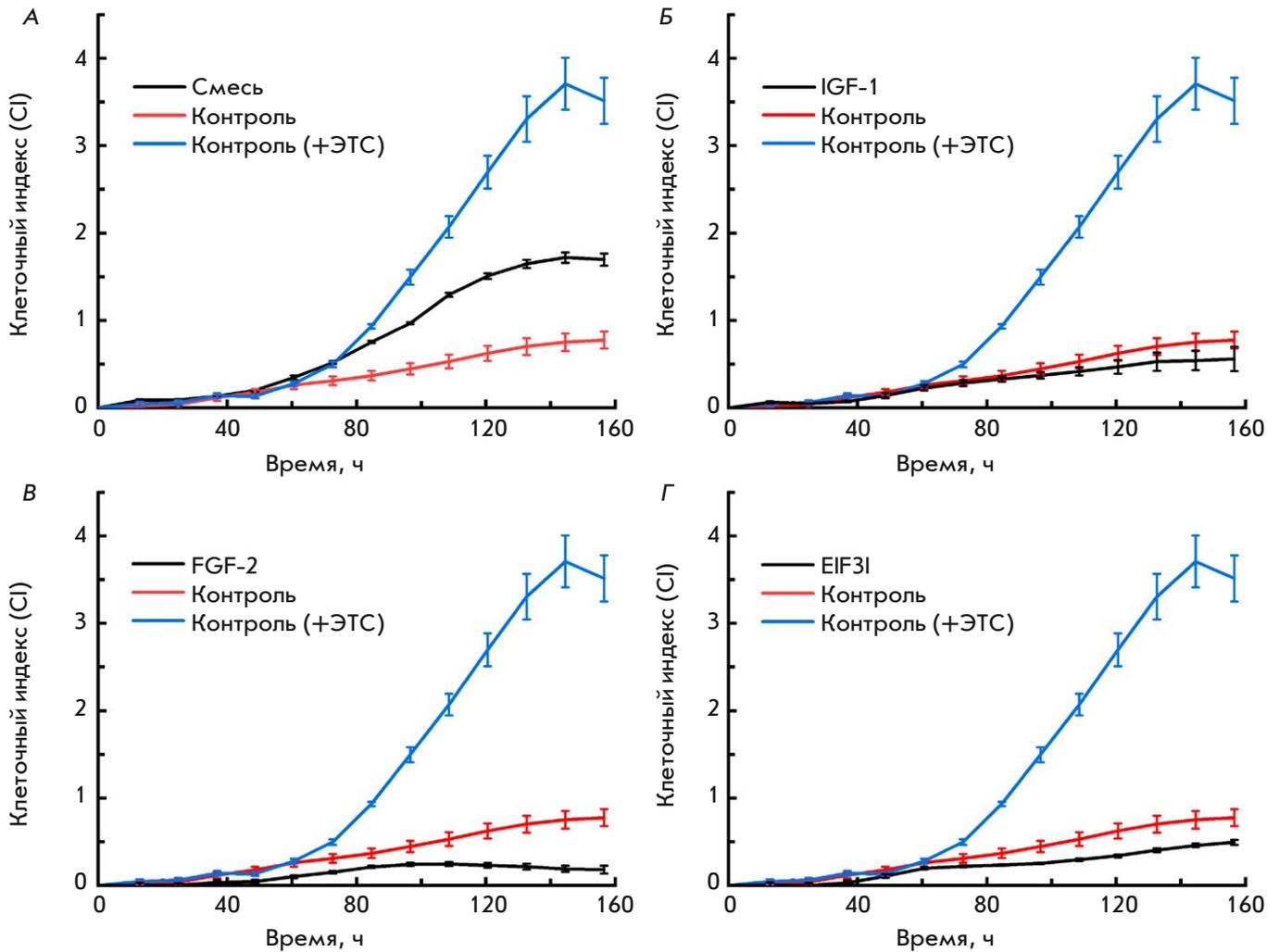
Таким образом, совместное культивирование модифицированных клеток, экспрессирующих IGF-1, EIF3I и FGF-2, в среде без ЭТС повышает их пролиферативную активность по сравнению с контрольными клетками.

#### **Влияние секретируемых ростовых факторов на жизнеспособность интактных клеток**

Для оценки влияния секретируемых ростовых факторов на жизнеспособность интактных клеток собирали кондиционированную среду, фильтровали и добавляли к клеткам Expi293F. Через 96 ч измеряли жизнеспособность клеток с помощью колориметрического теста (*рис. 6*). Показано, что метаболическая активность клеток, в отличие от контрольных образцов, повышается при добавлении кондиционированной среды от клеток, экспрессирующих отдельные факторы (IGF-1, EIF3I и FGF-2). Смесь кондиционированных сред также положительно влияет на жизнеспособность интактных клеток. Разница в жизнеспособности клеток при использовании среды Opti-MEM (*рис. 6А*) или DMEM (*рис. 6Б*) была несущественной.

#### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Для эффективного производства рекомбинантных белков в медицинских целях желательно иметь культуры клеток человека, способные к суспензионному культивированию и способные расти в жидких средах как можно более простого состава, не содержащих, в идеале, компонентов животного происхождения. Культура клеток человека способна генерировать белки, процессинг которых

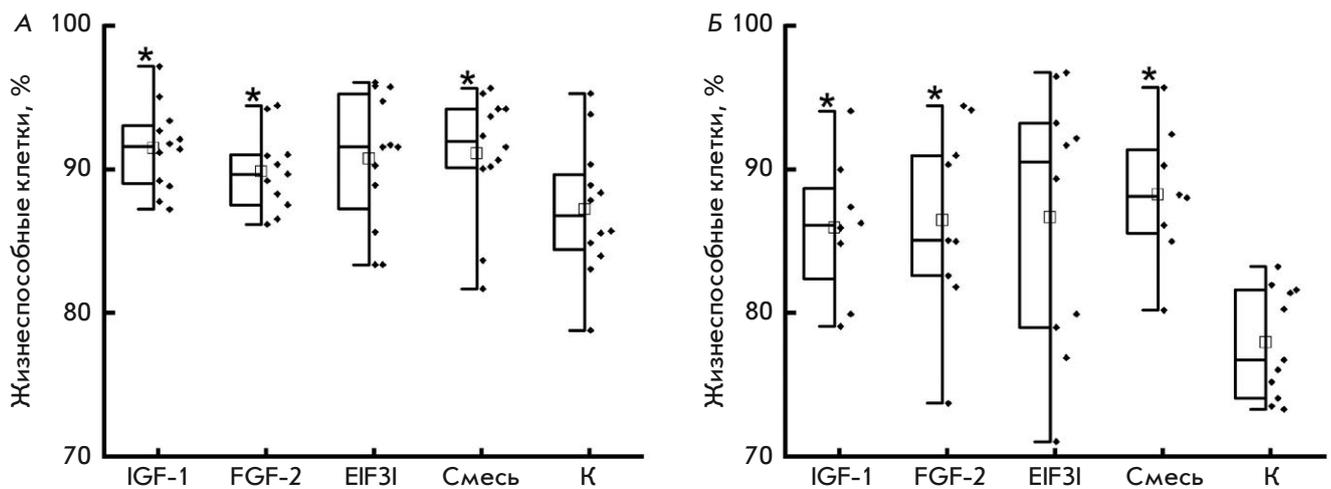


**Рис. 5.** Анализ пролиферации модифицированных клеток в базовой бессывороточной среде DMEM в режиме реального времени. Клеточный индекс — это вычисляемый параметр, который определяется электрическим сопротивлением между электродами и зависит от площади контакта клеток с электродом, расположенным на дне лунки планшета. Этот параметр характеризует состояние клеточной культуры в определенный момент времени. Контроль – клетки Expi293F-dCas9-MS2, культивируемые в среде DMEM; контроль (+ЭТС) – клетки Expi293F-dCas9-MS2, культивируемые в среде DMEM с 10% ЭТС; А – анализ пролиферативной активности клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I при совместном культивировании; Б – анализ пролиферативной активности клеток Expi-IGF1; В – анализ пролиферативной активности клеток Expi-FGF2; Г – анализ пролиферативной активности клеток Expi-EIF3I. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение для  $n = 4$

максимально близок к процессингу в организме человека. Суспензионное культивирование позволяет использовать для роста культуры биореакторы и относительно легко масштабировать производство. Простой состав сред обеспечивает экономическую эффективность, а минимизация использования добавок животного происхождения позволяет избежать загрязнения конечного продукта нежелательными примесями. В этой работе мы опробовали принципиальный подход, который возможно позволит получить подобные клеточные культуры

для биотехнологических целей. Наш подход заключается в избирательной активации экспрессии эндогенных генов, кодирующих белковые факторы, повышающие пролиферацию клеток.

Наиболее часто используемая в биотехнологии линия клеток человека – клетки эмбриональной почки человека HEK293. Мы использовали клеточную линию Expi293F – суспензионный вариант клеточной линии HEK293, оптимизированный для высокоэффективной продукции рекомбинантных белков, а также для культивирования при повышен-



**Рис. 6.** Оценка жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии кондиционированной среды от модифицированных клеток. IGF-1, FGF-2, EIF3I, смесь, К – кондиционированная среда от соответствующих клеточных линий Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированных лентивирусными векторами i2, f6 и e6 соответственно. В качестве контроля использовали культуральную среду от немодифицированных клеток Expi293F-dCas9-MS2. Данные представлены в виде диаграммы диапазонов, где ящик – 25–75% интервал, усы – интерквартильный размах, черта – медиана, квадрат – среднее значение, статистически значимые отличия от контрольной группы при  $p < 0.05$  выделены (\*). Точками отмечены значения жизнеспособности в каждом повторе. А – кондиционированная среда, смешанная со средой Opti-MEM, Б – кондиционированная среда, смешанная во средой DMEM, без добавления ЭТС

ной плотности (культура остается жизнеспособной при плотности  $5 \times 10^6$  клеток/мл) и времени удвоения около 24 ч [16]. Для пролиферации Expi293F требуется ряд ростовых факторов [23]. Наш подход заключается в том, чтобы не добавлять ростовые факторы в питательную среду, а активировать экспрессию соответствующих генов в самих клетках. В настоящее время имеется мощный инструмент избирательной активации генов – технология синергичных медиаторов активации (CRISPR/Cas9-SAM), которая является вариацией CRISPR/Cas9-системы геномного редактирования. В ней используется гРНК, которая комплементарно связывается с выбранным участком промотора активируемого гена. Как и при геномном редактировании, с гРНК связывается белок Cas9. Мы использовали мутантный вариант этого белка, лишенный нуклеазной активности и слитый с тетрамером VP64, что позволяет привлечь транскрипционные факторы и активировать синтез мРНК [24].

В качестве первой цели мы выбрали гены трех факторов – IGF-1, FGF-2, EIF3I. Известно, что инсулин необходим для пролиферации клеток в бессывороточной среде [25] и используется в некоторых модифицированных базовых средах. Наряду с инсулином существует множество инсулиноподобных факторов роста (IGF), которые также стимулируют пролиферацию клеток. IGF-1 и инсулин принадлежат к одному и тому же семейству и имеют

сходные третичные структуры. Кроме того, активация экспрессии гена *IGF-1* путем геномного редактирования оказывает положительный эффект на пролиферацию клеток [26]. Факторы роста фибробластов (FGF-1 и FGF-2) являются важным компонентом среды культивирования клеток, особенно для поддержания их способности к пролиферации [12]. Эти белки получали в клетках *Escherichia coli* и в клетках эукариот. При этом показано, что FGF-1 и FGF-2 склонны к протеолитической деградации и денатурации в клеточной среде, что приводит к относительно короткому периоду полужизни этих факторов, а рекомендуемые концентрации (10–100 нг/мл) затрудняют их использование в качестве добавок к среде [27, 28]. Пролиферацию клеточной культуры регулируют путем замедления или ускорения переходов между различными фазами клеточного цикла. Повышение скорости роста за счет сверхэкспрессии генов, которые способствуют G1/S-переходу, таких, как эукариотический фактор инициации 3 (EIF3), усиливает продукцию рекомбинантного белка. EIF3 является крупным мультидоменным белком, отдельные субъединицы которого также обладают функциональной активностью [13]. EIF3I, как показано ранее, участвует в увеличении пролиферативной активности клеток при повышении уровня экспрессии гена этого фактора, а также в ее снижении при нокауте [29]. Кроме того, описано повышение скорости роста культуры при сверх-

экспрессии таких генов, как *eIF3I*, способствующих G1/S-переходу [30].

На первом этапе мы секвенировали промоторные области выбранных генов. Далее требовалось получить модифицированную линию клеток Expi293F, экспрессирующую белки dCAS-VP64 и MS2-P65-HSF1, необходимые для работы системы CRISPR/Cas9-SAM [17]. Экспрессия введенных генов на уровне РНК подтверждена с помощью количественной ОТ-ПЦР. Затем нужно было модифицировать полученную линию Expi-dCas9-MS2, вводя в ее геном один из рекомбинантных генов, кодирующих гРНК. Однако гРНК, специфичные к разным областям промотора, могут обладать разной эффективностью. Поэтому мы подобрали по шесть последовательностей протоспейсерных участков гРНК к каждой мишени, чтобы сравнить их влияние на активацию экспрессии. Сравнение проводили методом количественной ОТ-ПЦР. Скорее всего, каждый из ростовых факторов имеет свой оптимальный уровень экспрессии, однако определение этого уровня представляет отдельное большое исследование, поэтому для начала мы выбрали по одному варианту гРНК для каждого гена, которые обеспечивали наибольшую активацию транскрипции.

Активация транскрипции по целому ряду причин не всегда ведет к накоплению соответствующего белка. Присутствие в каждой из трех отобранных модифицированных линиях клеток одного из трех белков мы подтверждали методом иммуноблоттинга. Показано наличие целевых белков – факторов EIF3, IGF-1, FGF-2. На данном этапе работы присутствие факторов роста оценивали только качественно.

На первом этапе изучения пролиферации модифицированных клеток мы использовали базовую питательную среду DMEM с добавлением 10% ЭТС, а также систему визуализации Celena X High Content Imaging System. Эта система способна делать микроснимки поверхности культуральных планшетов в реальном времени. В этом исследовании клеточные линии Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I заражали лентивирусными частицами, кодирующими зеленый флуоресцентный белок. Несмотря на то, что система Celena X позволяет анализировать клетки в проходящем свете, использование флуоресцентных белков облегчает визуализацию исследуемых клеток, а величину суммарной флуоресценции можно использовать как количественный показатель. Лентивирусный вектор был выбран потому, что рекомбинантный ген зеленого флуоресцентного белка в его составе интегрируется в геномную ДНК клетки и передается в ходе деления клеток без потерь, которые возникают при транзientной трансфекции плазмидных

ДНК. В результате оказалось, что все три модифицированные линии клеток растут быстрее, чем контрольная линия (рис. 3, 4). Самое большое влияние на пролиферацию оказывает повышение экспрессии гена фактора IGF-1. В то же время при совместном культивировании всех трех модифицированных линий пролиферативный эффект был больше, чем каждой линии в отдельности. Увеличение пролиферативной активности клеток, культивируемых в базовой бессывороточной среде, наблюдалось только при совместном культивировании клеток, продуцирующих все три фактора роста, однако пролиферация этих клеток была ниже, чем при культивировании в среде, содержащей ЭТС (рис. 5). Усиление роста клеток при совместном культивировании вполне ожидаемо, так как для пролиферации клеток в культуре требуется вся совокупность ростовых факторов. Несмотря на это, трех факторов недостаточно, чтобы полностью перейти на использование базовых сред без добавления ЭТС. Кроме того, в отсутствие ЭТС не наблюдается повышения пролиферации при культивировании клеток, продуцирующих один из факторов (рис. 5Б–Г). Однако вклад одиночных факторов заметен в присутствии ЭТС (рис. 3, 4). Стимуляция пролиферации линий клеток, экспрессирующих фактор EIF3I, с помощью ЭТС описана ранее [30].

Нами также проанализировано влияние кондиционированной среды от модифицированных линий, которые инкубировали в течение 48 ч в среде Opti-MEM, на жизнеспособность клеток Expi293F. Данная среда была выбрана для начального культивирования, поскольку она обеспечивает хороший рост культуры и не содержит ЭТС, которая может нивелировать действие исследуемых факторов. Кондиционированная среда от модифицированных клеточных линий повышает метаболическую активность интактных клеток по сравнению с контролем. Наблюдаемый эффект касался как сред от клеточных линий, экспрессирующих один из факторов, так и смеси кондиционированных сред.

Полученные результаты позволяют нам предположить, что путем тщательного подбора активируемых генов и контроля уровня их активации можно создать линию клеток человека, которая будет либо не столь зависима от экзогенных сигнальных белков, либо даже полностью не будет зависеть от них. Получение такой линии позволит существенно удешевить и упростить производство рекомбинантных белков для использования в медицинских целях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологии синергичных медиаторов активации CRISPR/Cas9-SAM нами получе-

на линия клеток человека Expi293F с повышенным уровнем экспрессии генов, кодирующих факторы IGF-1, FGF-2, EIF3I. В результате показана активация экспрессии целевых генов как на уровне мРНК, так и на уровне белков. Модифицированные клеточные линии обладают повышенной пролиферативной активностью в стандартных условиях культивирования, а также при совместном культивировании трех линий-продуцентов в базовой среде DMEM без добавления ЭТС. На наш взгляд, полу-

ченные результаты говорят о возможности использования выбранного нами подхода в биотехнологии. Мы считаем, что активация различных эндогенных генов ростовых факторов позволит получить линии клеток с повышенной продуктивностью, растущие на простых и дешевых питательных средах. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда № 23-24-00012,  
<https://rscf.ru/project/23-24-00012/>.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minonzio G., Linetsky E. // CellR4. 2014. V. 2. № 6. P. 1–10.
2. Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., et al. // Altern. Lab. Anim. 2005. V. 33. № 3. P. 261–287.
3. Stout A.J., Mirliani A.B., Rittenberg M.L., Shub M., White E.C., Yuen J.S.K., Kaplan D.L. // Comm. Biol. 2022. V. 5. № 1. P. 1–13.
4. Ahmed S., Chauhan V.M., Ghaemmaghami A.M., Aylott J.W. // Biotechnol. Lett. 2018. V. 41. № 1. P. 1–25.
5. Li W., Fan Z., Lin Y., Wang T.Y. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 1–11.
6. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., et al. // J. Biotechnol. 2012. V. 161. № 3. P. 336–348.
7. Jefferis R. // J. Immunol. Res. 2016. V. 2016. P. 1–15.
8. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 1–9.
9. Sun H., Wang S., Lu M., Tinberg C.E., Alba B.M. // PLoS One. 2023. V. 18. № 6. P. 1–25.
10. Kumar N., Gammell P., Clynes M. // Cytotechnology. 2007. V. 53. № 1–3. P. 33.
11. Guan N., Liu Z., Zhao Y., Li Q., Wang Y. // Drug Deliv. 2020. V. 27. № 1. P. 1438.
12. Mossahebi-Mohammadi M., Quan M., Zhang J.S., Li X. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 1–10.
13. Roobol A., Roobol J., Smith M.E., Carden M.J., Hershey J.W.B., Willis A.E., Smales C.M. // Metab. Eng. 2020. V. 59. P. 98.
14. Voorhamme D., Yandell C.A. // Mol. Biotechnol. 2006. V. 34. № 2. P. 201–204.
15. Mendes J.M.F., Valverde L. de F., Vidal M.T.A., Paredes B.D., Coelho P., Allahdadi K.J., Coletta R. Della, Souza B.S. de F., Rocha C.A.G. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 18. P. 1–20.
16. Fang X.T., Sehlin D., Lannfelt L., Syvänen S., Hultqvist G. // Biol. Proced. Online. 2017. V. 19. № 1. P. 1–9.
17. Joung J., Konermann S., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Platt R.J., Bringham M.D., Sanjana N.E., Zhang F. // Nat. Protocols 2017. V. 12. № 4. P. 828–863.
18. Bobrovsky P.A., Moroz V.D., Lavrenova V.N., Manuvera V.A., Lazarev V.N. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 11. P. 1310–1318.
19. Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. // Mol. Ther. 2008. V. 16. № 4. P. 698–706.
20. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. // J. Virol. 1998. V. 72. № 11. P. 8463–8471.
21. Tiscornia G., Singer O., Verma I.M. // Nat. Protocols. 2006. V. 1. № 1. P. 241–245.
22. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al. // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
23. Abaandou L., Quan D., Shiloach J. // Cells. 2021. V. 10. № 7. P. 1–21.
24. Omachi K., Miner J.H. // PLoS One. 2022. V. 17. № 6. P. 1–13.
25. Soos M.A., Field C.E., Siddle K. // Biochem J. 1993. V. 290. № 2. P. 419–426.
26. Roberston M.J., Raghunathan S., Potaman V.N., Zhang F., Stewart M.D., McConnell B.K., Schwartz R.J. // FASEB J. 2020. V. 34. № 1. P. 555.
27. Yang Z., Xiong H.-R. // Biomedical Tissue Culture. 2012. <https://www.intechopen.com/chapters/40247>
28. Sedlář A., Trávníčková M., Matějka R., Pražák Š., Mészáros Z., Bojarová P., Bačáková L., Křen V., Slámová K. // Internat. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 1843.
29. Yuan Y., Zhang Y., Yao S., Shi H., Huang X., Li Y., Wei Y., Lin S. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 41. P. 28310–28323.
30. Ahlemann M., Zeidler R., Lang S., Mack B., Münz M., Gires O. // Mol. Carcinog. 2006. V. 45. № 12. P. 957–967.

# Приложение 1

Таблица 1. Список олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность 5'→3'	Применение
igf1_F	TGGGTTTTACAGCTCGGCAT	Секвенирование
igf1_R	GGAACAGCTGGGGGAACAT	Секвенирование
fgf2_F	AAGCCTGCTCTGACACAGAC	Секвенирование
fgf2_R	GTTACGATGGGTGTCTCC	Секвенирование
eif3i_F	GGGATCCACACTGGTTGAGG	Секвенирование
eif3i_R	TCACTCGTCTGCATTCAGGG	Секвенирование
i1_F	CACCGTGTAGACAGGAAACAGCTGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i1
i1_R	AAACCCAGCTGTTTCCTGTCTACAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i1
i2_F	CACCGAGCATACAATGGAATAGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i2
i2_R	AAACCTATTTCCATTGTATGCCTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i2
i3_F	CACCGTATTTCCAAGTGAGTGAGT	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i3
i3_R	AAACACTCACTCACTTGGAAATACC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i3
i4_F	CACCGCACTAACACACATTCTTTTA	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i4
i4_R	AAACTAAAAGAATGTGTGTAGTGC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i4
i5_F	CACCGTGTTTTGTAGATAAATGTG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i5
i5_R	AAACCACATTTATCTACAAAACACC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i5
i6_F	CACCGCTAGTTTTTAAAATGCAA	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i6
i6_R	AAACTGCAATTTTAAAACATAGAGCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i6
f1_F	CACCGATAAGGGCGGTGGAGCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f1
f1_R	AAACGGGCTCCACCGCCCCTTATCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f1
f2_F	CACCGGCAGGGCTTTGGCATTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f2
f2_R	AAACGGGAATGCCAAAGCCCTGCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f2
f3_F	CACCGGGCCGGCCTCTGAGTTCGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f3
f3_R	AAACCCGAACCTCAGAGCCGGCCCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f3
f4_F	CACCGGAATGCCAAAGCCCTGCCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f4
f4_R	AAACCGGCAGGGCTTTGGCATTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f4
f5_F	CACCGCCGAACCGCCGAATCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f5
f5_R	AAACCTGAGTTCGCGCGTTCGGCCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f5
f6_F	CACCGCGCGACATCAGTCCGGCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f6
f6_R	AAACCGCCGACTGATGTCGCGCGC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f6
e1_F	CACCGAGGATCCTTCCAGGGCAAAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e1
e1_R	AAACCTTTGCCCTGGAAGGATCCTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e1
e2_F	CACCGACATTTGTGAGCCTTTCCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e2
e2_R	AAACCTGGAAAGGCTCACAAATGTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e2
e3_F	CACCGTGCAGGATGGGAACTAGCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e3
e3_R	AAACCTGCTAGTTCCTATCCTGCAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e3
e4_F	CACCGATGAATTCGAGGCGAGGGTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e4
e4_R	AAACGACCTCGCCTCGAATTCATC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e4
e5_F	CACCGTGGGTTGTAGCAGGGGTCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e5
e5_R	AAACCGACCCCTGCTACAACCCAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e5
e6_F	CACCGAATGTCTTTTCCTTGGAGGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e6
e6_R	AAACCCCTCCAAGGAAAGACATTCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e6
q_igf1_F	CTCTCAGTTCGTGTGTGGAGAC	ПЦР-PB
q_igf1_R	CAGCCTCCTTAGATCACAGCTC	ПЦР-PB
q_fgf2_F	AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG	ПЦР-PB
q_fgf2_R	CCTTTGATAGACACAATCCTCTC	ПЦР-PB
q_eif3i_F	CAGAACGTCCTGTCAACTCAGC	ПЦР-PB
q_eif3i_R	CTTGCCAATCCTGGTGGAGGTT	ПЦР-PB
q_cas_F	AACCTATGCCACCTGTTCG	ПЦР-PB
q_cas_R	AGGATTGTCTTGCCGGACTG	ПЦР-PB
q_ms2_F	CTGGGAGAGGGCTCCTACTT	ПЦР-PB
q_ms2_R	TCATGGTTGGGCCAGGATTC	ПЦР-PB
gapdhF	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ПЦР-PB
gapdhR	ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA	ПЦР-PB

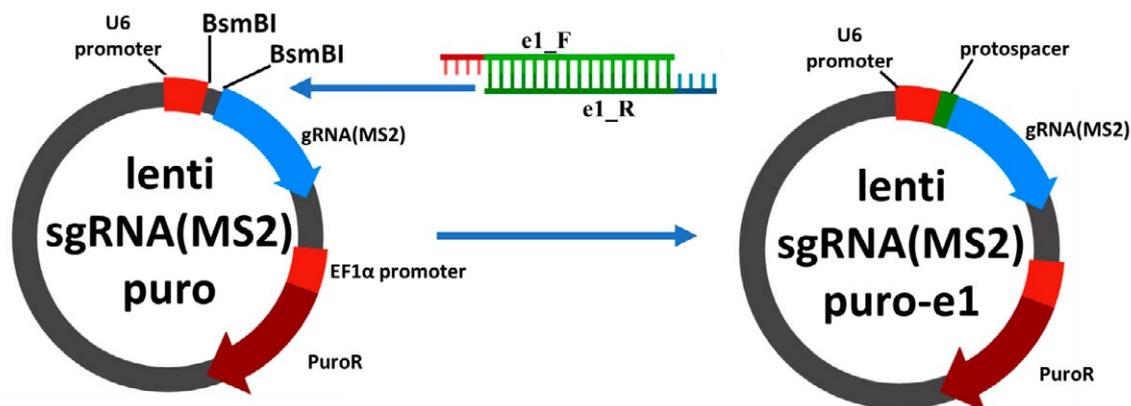


Рис. 1. Схема сборки плазмид серии lenti sgRNA(MS2)\_puro. Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti\_sgRNA(MS2)\_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI, после чего вектор был лигирован с олигонуклеотидным дуплексом, соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей (табл. 1). Продукты лигирования клонировали с использованием штамма *E. coli* Top10. Структуру вставки подтверждали секвенированием

## Приложение 2

Таблица 1. Список плазмид с полными и рабочими названиями для специфической активации экспрессии генов ростовых факторов

Полное название плазмиды	Дуплекс	Сокращенное название	Ген
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e1	e1_F/e1_R	e1	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e2	e2_F/e2_R	e2	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e3	e3_F/e3_R	e3	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e4	e4_F/e4_R	e4	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e5	e5_F/e5_R	e5	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e6	e6_F/e6_R	e6	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f1	f1_F/f1_R	f1	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f2	f2_F/f2_R	f2	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f3	f3_F/f3_R	f3	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f4	f4_F/f4_R	f4	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f5	f5_F/f5_R	f5	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f6	f6_F/f6_R	f6	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i1	i1_F/i1_R	i1	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i2	i2_F/i2_R	i2	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i3	i3_F/i3_R	i3	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i4	i4_F/i4_R	i4	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i5	i5_F/i5_R	i5	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i6	i6_F/i6_R	i6	IGF-1

Плазмиды для специфической активации экспрессии генов ростовых факторов сконструированы на основе вектора lenti\_sgRNA(MS2)\_puro (Addgene # 73795). Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti\_sgRNA(MS2)\_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI, после чего вектор был лигирован с олигонуклеотидным дуплексом (последовательность праймеров указана в Приложении 1), соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей.