

УДК 616-092.9: 577.29

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КАК ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИИ *in vivo*

© 2020 г. Ю. Ю. Силаева^{1,*}, В. А. Калмыков¹, Е. А. Варламова^{1,2}, Е. Н. Коршунов¹, Д. С. Коршунова¹, М. В. Кубекина¹, А. А. Штиль^{1,2}, И. Ронинсон^{1,3}, А. В. Дейкин^{1,4,**}

Представлено академиком РАН П. Г. Георгиевым 28.10.2019 г.

Поступило 10.12.2019 г.

После доработки 10.12.2019 г.

Принято к публикации 10.12.2019 г.

Опосредованное протеинкиназой CDK8 перепрограммирование транскрипции существенно для процессов, сопровождающихся интенсивной экспрессией генов. Конститутивный нокаут гена *cdk8* летален на стадии морулы. Для исследования роли CDK8 во взрослом организме в геноме мыши внесена мутация F97G в третий экзон гена *cdk8*. Согласно предварительным экспериментальным данным, эта мутация должна привести к уменьшению киназной активности CDK8. Для редактирования генома лабораторных мышей была использована технология CRISPR/Cas9, при которой внесение двуцепочечного разрыва происходило на расстоянии 128 пар нуклеотидов от планируемого сайта вносимой мутации. Для внесения мутации была использована матрица для гомологичной репарации в составе плазмидной ДНК, с гомологичными плечами 903 и 484 п.н. в 5'–3' область от точки двуцепочечного разрыва соответственно. В результате получены мыши с сайтспецифичными целевыми мутациями в третьем экзоне гена *cdk8*. Показана высокая эффективность внесения мутации на расстоянии в 128 пар нуклеотидов от места двуцепочечного разрыва. Впервые получены животные с мутацией F97G в каталитическом домене CDK8. Полученные мутантные по гену *cdk8* мыши будут в последующих исследованиях использованы для моделирования процессов, сопровождающихся перепрограммированием транскрипции.

Ключевые слова: редактирование генома млекопитающих, CRISPR/Cas9, генетически модифицированные животные, протеинкиназа CDK8

DOI: 10.31857/S2686738920010230

Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 позволяет создавать животных, несущих точечные мутации в геноме, которые в том числе могут приводить к аминокислотным заменам в активных центрах различных белков. Этот инструмент можно использовать для исследования функций отдельных доменов транскрипционных факторов.

Опосредованная CDK8 регуляция транскрипции существенна для процессов, сопровождаю-

щихся интенсивной экспрессией генов: в эмбриональном развитии, активации иммунокомпетентных клеток, гистогенезе [1–5]. В патологических ситуациях ингибирование CDK8 снижает пролиферативный эффект эстрогенов в клетках рака молочной железы и ограничивает рост метастатических очагов [6, 7]. CDK8 рассматривается как терапевтическая мишень; фармакологические ингибиторы перепрограммирования транскрипции проходят первоначальные испытания.

Исследования функций CDK8 ограничены трудностью моделирования *in vivo*: нокаут *cdk8* в эмбрионах мышей летален [8]. Поэтому требуется редактирование генома взрослых особей. Первоначальный подход к решению этого вопроса – внесение “слабых” мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую киназный домен гена *cdk8* мыши, и проверка выживаемости эмбрионов. В культуре клеток рака прямой кишки человека мутация в экзоне 3 гена *cdk8* (замена остатка фенилаланина в положении 97 на глицин; F97G) приводит к снижению фосфорилирования STAT1 под влиянием гамма-интерферона [9]. Мы

¹ Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

³ Университет штата Южная Каролина, Колумбия, США

⁴ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

*e-mail: silaeva@genebiology.ru

**e-mail: alexei@deikin.ru

Таблица 1. Получение мышей с мутацией F97G в экзоне 3 гена *cdk8*

Использовано реципиентов	Трансплантировано клеток	Количество родивших самок	Количество рожденных мышат	Из них с мутацией F97G
22	137	4	8	1

Таблица S1. Основные олигонуклеотидные последовательности, использованные в работе. Жирным шрифтом обозначены сайты узнавания рестриктазы XhoI и точки внесения мутаций

P1	CAGTCCGTGTACTGCCAACCTGG
P2	CTCGAGTTGTCCCTTCTCCTACCAGCG
P3	CTCGAGAGCCTCATAGCAGAAACCGTC
P4	ACAGTTAGCTTCCACTGCACTAGGAGTCACTTACAGAGTAACAGTCCGTGTACTGCCAACCTAGTGGCTTTTGTCTTTGTCCA
P5	GACAAAGCAAAGCCTCTAGGTTGGCAGTACACGGACTGTTACTCTGTAAGGTGACTCCTAGTGCAGTGGAAAGCTAACTGTTT
P6	GACAAAGCAAAGCCTCTAGGTTGGCAGTACACGGACTGTTACTCTGTAAGGTGACTCCTAGTGCAGTGGAAAGCTAACTGTTT
P7	GACAAAGCAAAGCCTCTAGGTTGGCAGTACACGGACTGTTACTCTGTAAGGTGACTCCTAGTGCAGTGGAAAGCTAACTGTTT
P8	CTTAAGCACCCAAACGTCATCT
P9	TCTCAAGCCTGACTGAGAACAG
P10	5'-/ROX/TGCTGATCGGAAAGTATGGCTTCTCGGC/BHQ-2/-3'
P11	5'-TCTAGAGGACCTGAGTTTGATCAC-3'
P12	5'-ATGCTCACCCAGAAAGTACTAC-3'
P13	CTTAAGCACCCAAACGTCATCT

предположили, что внесение указанной мутации не окажется летальным для мыши, но снизит киназную активность CDK8.

Цель исследования – разработать методологию редактирования генома для получения жизнеспособных особей с мутацией гена *cdk8*.

Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 предусматривает различные формы доставки в клетки эндонуклеазы Cas9 (белок, РНК, ДНК) и матрицы для репарации (одно- или двухцепочечная ДНК, линейаризованная или плазмидная) в клетки. В каждом случае необходимо взвешивать все преимущества и недостатки различных комбинаций системы для достижения максимально эффективного результата. При этом в работах по получению генетически модифицированных животных эффективным считается эксперимент, приведший к получению жизнеспособного трансгена. Мы использовали вариант с двумя плазмидными векторами, внесением двухцепочечного разрыва в одной точке геномной ДНК и матрицей для репарации, содержащей короткие гомологичные плечи. В работе использованы мыши F1(CBAxС57BL/6) (питомник “Столбовая”). Технология получения генетически модифицированных животных и условия их содержания опубликованы нами ранее [10, 11].

Для внесения целевой мутации использовали систему CRISPR/Cas9; направляющие РНК подбирали с помощью Web-инструментов CHOP-CHOP [12]. Для идентификации потенциальных дополнительных сайтов узнавания “нежелательного” (off-target) редактирования использовали Web-инструмент E-CRISP-Evaluation [13]. Гены, кодирующие эндонуклеазу Cas9 и направляющие РНК, были встроены в вектор pX330 [14]. ДНК-матрица, используемая для гомологичной рекомбинации, клонирована в вектор pSK по сайтам рестрикции ApaI и XbaI.

Для внесения целевой мутации по результатам биоинформационного анализа выбрана направляющая РНК, комплементарная последовательности P1 (табл. 1, табл. S1 в дополнительных материалах) в интроне между экзонами 3 и 4. Точка целевой мутации отстоит от сайта внесения двухцепочечного разрыва в 5' область на 128 п.н. (рис. 1а).

Мутантная матрица для гомологичной репарации была амплифицирована с геномной ДНК мыши с помощью праймеров P(2, 3). Для клонирования в pSK вектор в нуклеотидную последовательность праймеров внесены сайты узнавания рестриктазой XhoI. Затем в клонированную матрицу для гомологичной репарации (с “плечами” –983 + 484 п.н. по отношению к точке разреза) с

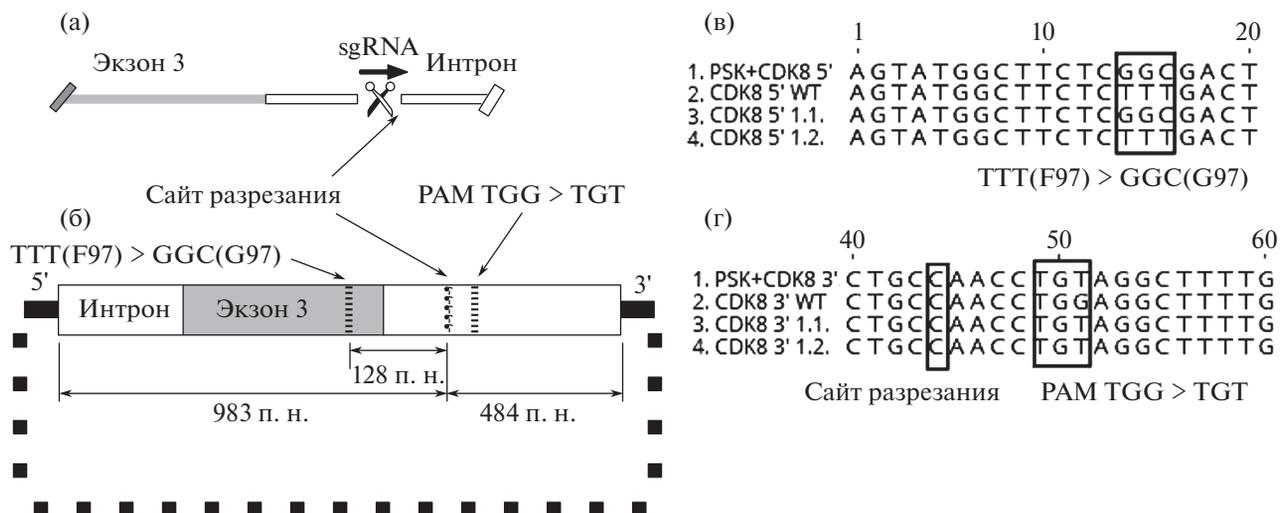


Рис. 1. Генетическая конструкция для внесения мутации F97G в экзоне 3 гена *cdk8* и результаты секвенирования животных F0. а – положение направляющей РНК в экзоне 3 и сайт разрезания; б – схема матрицы для гомологичной рекомбинации в составе вектора рСК. Указаны клонированная область генома, экзона 3, точки внесения мутаций в ген и в PAM сайт, а также место внесения разреза; в, г – анализ секвенирования по Сэнгеру 3'- и 5'-области экзона 3 гена *cdk8* первичных генетически модифицированных животных. Приведены данные для ДНК дикого типа (CDK8wt), матрицы для репарации (рСК + CDK8) и мышей, в геноме которых выявлены мутации (CDK8 1.1, CDK8 1.2).

помощью праймеров P(4, 5) внесены мутации в область PAM сайта TGG>TGT (для предотвращения повторного узнавания отредактированной области белком Cas9) и в область целевой мутации TTT(F97)>GGC(G97): P(6,7) (рис. 16). Для микроинъекций смешивали плазмидные векторы с Cas9-sgRNA (px330) и матрицей для гомологичной репарации в составе вектора рСК в равных соотношениях (1 нг/мкл).

Генотип мышат через 10 дней после рождения анализировали с помощью ПЦР с праймерами (P8, 9) и зондом (P10), специфичным к мутантному аллелю. Для секвенирования по Сэнгеру областей генома, содержащих целевую мутацию и PAM сайт, с геномной ДНК с помощью праймеров (P11, 12) получен ампликон размером 1784 п.н. Важно отметить, что сайты отжига праймеров находятся за пределами “плечей” рекомбинационной матрицы. Секвенирование по Сэнгеру области генома, содержащей целевую мутацию, проводили с праймером (P13). Для секвенирования области генома, содержащей PAM сайт, использовали праймер (P14).

Продукт ПЦР с целевой мутацией был идентифицирован в геноме только одной мыши - *cdk8* 1.1 (рис 1в). Результаты секвенирования оценивали с помощью пакета алгоритмов SAM [15]; измененная матрица ДНК составила 20–25% от анализируемой. Таким образом, редактирование области гена *cdk8* позволило получить “мозаичную” трансгенную мышь (*cdk8* 1.1).

От мышей, в которых были найдены изменения в геноме, было получено потомство. В ре-

зультате был получен один гетерозиготный самец, который содержит мутацию F97G в гене *cdk8*. Таким образом, показана высокая эффективность внесения мутации на расстоянии 128 п.н. от места двуцепочечного разрыва с использованием плазмидной матрицы для гомологичной репарации. Мыши с мутацией F97G в белке CDK8 введены в гетерозиготную линию.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (Соглашение 14.W03.31.0020 с Институтом биологии гена РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fant C., Taatjes D.* Regulatory Functions of the Mediator Kinases CDK8 and CDK19 // *Transcription*. 2019. V. 10. P. 76–90.
2. *Chen M., Liang J., Ji H., et al.* CDK8/19 Mediator Kinases Potentiate Induction of Transcription by NFκB // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 10208–10213.
3. *Steinparzer I., Sedlyarov V., Rubin J.D., et al.* Transcriptional Responses to IFN-γ Require Mediator Kinase-Dependent Pause Release and Mechanistically Distinct CDK8 and CDK19 Functions // *Mol. Cell*. 2019. pii: S1097-2765(19)30589-1.

4. *McDermott M., Chumanevich A., Lim C., et al.* Inhibition of CDK8 Mediator Kinase Suppresses Estrogen Dependent Transcription and the Growth of Estrogen Receptor Positive Breast Cancer // *Oncotarget*. 2017. № 8. P. 12 558–12 575.
5. *Liang J., Chen M., Hughes D., et al.* CDK8 Selectively Promotes the Growth of Colon Cancer Metastases in the Liver by Regulating Gene Expression of TIMP3 and Matrix Metalloproteinases // *Cancer Res*. 2018. V. 78. P. 6594–6606.
6. *Guo Z., Wang G., Lv Y., et al.* Inhibition of CDK8/CDK19 Activity Promotes Treg Cell Differentiation and Suppresses Autoimmune Diseases // *Front. Immunol*. 2019. № 10.1988.
7. *Amirhosseini M., Bernhardsson M., Lång P., et al.* Cyclin-Dependent Kinase 8/19 Inhibition Suppresses Osteoclastogenesis by Downregulating RANK and Promotes Osteoblast Mineralization and Cancellous Bone Healing // *J. Cell Physiol*. 2019. P. 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.28321> [Epub ahead of print].
8. *Westerling T., Kuuluvainen E., Makela T.* Cdk8 is Essential for Preimplantation Mouse Development // *Mol. Cell Biol*. 2007. V. 27. P. 6177–6182.
9. *Galbraith M., Andrysik Z., Pandey A., et al.* CDK8 Kinase Activity Promotes Glycolysis // *Cell Rep*. 2017. V. 21. P. 1495–1506.
10. *Silaeva Yu., Kirikovich Yu., Skuratovskaya L., et al.* Optimal Number of Embryos for Transplantation in Obtaining Genetic-Modified Mice and Goats // *Russ. J. Dev. Biol*. 2018. № 49. P. 356–361.
11. *Silaeva Y., Kalinina A., Vagida M., et al.* Decrease in Pool of T Lymphocytes with Surface Phenotypes of Effector and Central Memory Cells under Influence of TCR Transgenic β -Chain Expression // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. V. 78. № 5. P. 549–559.
12. *Labun K., Montague T.G., Krause M., et al.* CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR Web Toolbox beyond Genome Editing // *Nucleic Acids Res*. 2019. V. 47. № 1. P.171–174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
13. *Heigwer F., Kerr G., Boutros M.* E-CRISP: Fast CRISPR Target Site Identification // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. P. 122–123.
14. *Cong L., Ran F., Cox D., et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. // *Science*. 2013. V. 21, № 2. P. 265.
15. *Tang M., Cheng L., Jia R., et al.* Identification of Transcription Factors and Single Nucleotide Polymorphisms of Lrh1 and Its Homologous Genes in Lrh1-Knockout Pancreas of Mice // *BMC Med. Genet*. 2014. V. 15. P. 43.

GENOME EDITING AS AN APPROACH TO THE STUDY OF *in vivo* TRANSCRIPTION REPROGRAMMING

Y. Y. Silaeva^{a, #}, V. A. Kalmykov^a, E. A. Varlamova^{a, b}, E. N. Korshunov^a, D. S. Korshunova^a, M. V. Kubekina^a, A. A. Shtil^{a, b}, I. B. Roninson^{a, c}, and A. V. Deykin^{a, d, ##}

^a *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^c *University of South Carolina, Columbia, USA*

^d *The Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: silaeva@genebiology.ru*

^{##}*e-mail: alexei@deikin.ru*

Presented by Academician of the RAS P.G. Georgiev October 28, 2019

CDK8-mediated transcriptional reprogramming is essential for an extensive gene expression. Constitutive knockouts of the *cdk8* gene are lethal at the morula stage. For modeling of transcriptional reprogramming in an adult organism we investigated a possibility to attenuate the *cdk8* kinase activity with a F97G mutation in the exon 3. According to preliminary experimental data, this mutation should lead to a decrease in CDK8 kinase activity. To edit the genome of laboratory mice, CRISPR/Cas9 technology was used, in which the introduction of a double-stranded gap occurred at a distance of 128 nucleotide pairs from the planned site of the introduced mutation. To introduce the mutation, a matrix for homologous repair was used as part of plasmid DNA, with homologous arms 903 and 484 bp in the 5'–3' region from the point of double-stranded rupture, respectively. As a result, mice with site-specific target mutations in exon 3 of the *cdk8* gene were obtained. We for the first time demonstrated a high efficacy of the mutation 128 bp apart from the site of double strand break. Viable animals with the F97G mutation in the catalytic domain of CDK8 kinase were obtained for the first time. The resulting CDK8 mutant mice will be used in subsequent studies to simulate processes involving transcription reprogramming.

Keywords: mammalian genome editing, CRISPR, Cas9, genetically modified animals, CDK8 protein kinase