
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 612.112.94+616-097.1]:575.11]:602.6

НОКАУТ ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И HLA КЛАССА I В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Е. В. КУШНЕРОВА¹⁾, А. А. МИГАС¹⁾, А. В. КЛЫЧ¹⁾, Е. А. ЛАСЮКОВ¹⁾, А. Н. МЕЛЕШКО¹⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9, как инструмент для нокаута генов, нашла широкое применение в клеточной биологии для получения клеток определенного фенотипа. В частности, она используется для создания универсальных донорских CAR-T-лимфоцитов путем нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* Т-клеточного

Образец цитирования:

Кушнерова ЕВ, Мигас АА, Клыч АВ, Ласюков ЕА, Мелешко АН. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;2:19–26.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-19-26>

For citation:

Kushniarova LV, Migas AA, Klych HV, Lasiukov YA, Meleshko AN. Knockout of the T-cell receptor and HLA class I genes in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;2:19–26. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2022-2-19-26>

Авторы:

Елизавета Викторовна Кушнерова – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Александр Александрович Мигас – старший научный сотрудник лаборатории иммунологии.
Анна Васильевна Клыч – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий.
Евгений Анатольевич Ласюков – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии.
Александр Николаевич Мелешко – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией генетических биотехнологий.

Authors:

Lizaveta V. Kushniarova, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
elizaveta.kushnerova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2092-1590>
Alexandr A. Migas, senior researcher at the laboratory of immunology.
alexandr.migas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7013-9847>
Hanna V. Klych, junior researcher at the laboratory of genetic biotechnologies.
hannaklych@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2898-2419>
Yauheni A. Lasiukov, junior researcher at the laboratory of immunology.
zhenya_lasyukov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4183-0134>
Alexander N. Meleshko, PhD (biology); head of the laboratory of genetic biotechnologies.
meleshko@tut.by
<https://orcid.org/0000-0001-6964-3635>

рецептора и гена *B2M*, входящего в состав HLA класса I. Для получения большого количества клеток нужного фенотипа необходимо оптимизировать систему геномного редактирования, эффективность которой определяется используемой sgRNA. В настоящей работе экспериментально определены последовательности, позволяющие получить до 60,3 % клеток, негативных по экспрессии белка B2M, и до 71,8 % клеток, негативных по экспрессии T-клеточного рецептора. Также показано, что одновременное использование двух sgRNA для нокаута гена демонстрирует более низкую эффективность по сравнению с использованием данных sgRNA по отдельности.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; sgRNA; T-клеточный рецептор; B2M; нокаут гена.

KNOCKOUT OF THE T-CELL RECEPTOR AND HLA CLASS I GENES IN HUMAN CELLS USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM

L. V. KUSHNIAROVA^a, A. A. MIGAS^a, H. V. KLYCH^a, Y. A. LASIUKOV^a, A. N. MELESHKO^a

^aBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk District, Belarus

Corresponding author: L. V. Kushniarova (elizaveta.kushnerova@gmail.com)

The CRISPR/Cas9 system has found a wide application in cell biology as a tool for gene knockout. In particular, the CRISPR/Cas9 system is used to create allogeneic CAR-T lymphocytes by knocking out the genes *TRAC*, *TRBC1*, *TRBC2* and *B2M*. To obtain a large number of cells of the desired phenotype, it is necessary to optimise the process of genomic editing, the effectiveness of which is determined by the sgRNA used. In this work, we experimentally determined the most effective sequences that allow to obtain up to 60.3 % of cells negative for the expression of the B2M protein and up to 71.8 % of cells negative for the expression of the T-cell receptor. It has also been shown that the simultaneous use of two sgRNAs for gene knockout demonstrates a lower efficiency compared to using these sgRNAs separately.

Keywords: CRISPR/Cas9; sgRNA; T-cell receptor; B2M; gene knockout.

Введение

Система геномного редактирования CRISPR/Cas9 (от англ. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – сгруппированные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками), открытая в контексте изучения приобретенного иммунитета бактерий, вскоре была успешно адаптирована в качестве практического инструмента, позволяющего вносить мутации в произвольные участки ДНК. Используемая в генной инженерии система CRISPR/Cas9 состоит из ДНК-эндонуклеазы Cas9 и sgRNA (от англ. *single guide RNA* – одиночная гидовая РНК), искусственной молекулы, представляющей собой гибрид двух РНК-компонентов. Первый компонент – это 20-нуклеотидная последовательность, комплементарная редактируемому участку генома, второй компонент – это scRNA (от англ. *scaffold RNA* – каркасная РНК), которая за счет своей вторичной структуры связывается с белком Cas9, что приводит к формированию активного эндонуклеазного комплекса. Система CRISPR/Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в определенный участок ДНК, который должен быть комплементарен sgRNA и иметь на 3'-конце специфический нуклеотидный сигнал PAM (от англ. *protospacer adjacent motive* – смежный мотив протоспейсера). Необходимость соблюдения данных условий обеспечивает высокую точность геномного редактирования [1].

Система CRISPR/Cas9 широко применяется для нокаута генов, так как образованные в результате действия эндонуклеазы свободные концы ДНК соединяются друг с другом за счет внутриклеточного репарационного комплекса NHEJ (от англ. *non-homologous end joining* – негомологичное восстановление концов), который вносит по месту разрыва короткие инсерции и делеции, приводящие к сдвигу рамки считывания.

В частности, данный метод нокаута генов применяется для создания *off the shelf* аллогенных CAR-T-клеток для терапии онкологических заболеваний. Такие CAR-T-клетки, получаемые на материале Т-лимфоцитов здоровых доноров, позволяют решить основные проблемы, связанные с аутологичной CAR-T-терапией (малое количество Т-клеток, недостаточное для производства нескольких доз, дисфункциональное состояние Т-лимфоцитов, длительное время получения CAR-T-продукта и его высокая стоимость).

В данном случае система CRISPR/Cas9 используется для нокаута генов, обеспечивающих экспрессию на поверхности Т-лимфоцитов Т-клеточного рецептора и комплексов HLA класса I. Это позволяет получать донорские CAR-T-клетки, способные длительное время персистировать в организме реципиента без развития реакции «трансплантат против хозяина» [2].

Ключевое требование для производства *off the shelf* алогенных CAR-T-клеток – это высокий выход Т-лимфоцитов с ожидаемым фенотипом, который, в свою очередь, зависит от эффективности геномного редактирования, а последняя определяется методом доставки элементов системы CRISPR/Cas9 в клетки и особенностями используемой sgRNA. Эффективность sgRNA может быть предсказана с помощью биоинформатических алгоритмов, однако они не учитывают влияние факторов внутриклеточной среды, таких как, например, функциональное состояние хроматина в редактируемом участке, поэтому реальная эффективность sgRNA часто не соответствует теоретической [3].

Таким образом, выбор sgRNA для нокаута генов в целях получения клеток определенного фенотипа требует предварительной экспериментальной проверки ее эффективности.

Цель данной работы – оценить на модельных клеточных линиях эффективность различных вариантов sgRNA, а также их сочетаний и выявить те из них, которые позволяют добиться наибольшего выхода клеток, негативных по экспрессии Т-клеточного рецептора и HLA класса I.

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В работе использовались клеточные линии HEK293T и Jurkat. Клетки линии HEK293T культивировались в полной среде DMEM (10 % FBS), клетки линии Jurkat – в полной среде RPMI 1640 (10 % FBS).

sgRNA. Подбор потенциальных sgRNA проводился с помощью веб-инструмента *CRISPOR* (версия генома hg19, эндонуклеаза SpCas9) [4]. При выборе sgRNA учитывалось количество *off-target*-мишеней, у которых 12-нуклеотидная последовательность, примыкающая к PAM, полностью комплементарна целевой мишени. Для редактирования гена *B2M* были подобраны sgRNA, комплементарные участкам экзона 1 и интрона 1–2, для редактирования гена *TRAC* – sgRNA, комплементарные участкам экзона 1, для редактирования генов *TRBC1* и *TRBC2* – sgRNA, комплементарные гомологичным участкам экзона 1 (см. таблицу).

Варианты sgRNA
sgRNA variants

Код	Последовательность (5' – 3')*	PAM	Цепь	Количество <i>off-target</i> -мишеней
B2M1	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	CGG	–	5
B2M2	CTCGCGCTACTCTCTTTTC	TGG	+	8
B2M3	GGCCACGGAGCGAGACATCT	CGG	–	2
B2M4	GCTACTCTCTTTCTGGCC	TGG	+	13
B2M5	CTACTAGCCCCATCAAGAGG	TGG	–	20
B2M6	ACTCACGCTGGATAGCCTCC	AGG	–	1
B2M7	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	TGG	+	0
B2M8	AGGGTAGGAGAGACTCACGC	TGG	–	0
TRAC1	TGTGCTAGACATGAGGTCTA	TGG	+	6
TRAC2	AGAGTCTCTCAGCTGGTACA	CGG	–	7
TRAC3	TAGGCAGACAGACTTGTCAC	TGG	–	7
TRAC4	AACAAATGTGTCACAAAGTA	AGG	+	4
TRBC1	GCAGTATCTGGAGTCATTGA	GGG	–	18
TRBC2	GGAGAATGACGAGTGGACCC	AGG	+	2

*Указаны 20-нуклеотидные последовательности sgRNA, комплементарные участку гена-мишени, последовательности scRNA опущены, так как они одинаковы для всех вариантов.

Сборка векторных конструкций. Для доставки элементов системы CRISPR/Cas9 в клетки использовалась плаزمид рХ333 (№ 64073 в каталоге *Addgene*), содержащая две экспрессионные кассеты с человеческим вариантом промотора U6 и последовательностью scRNA для экспрессии sgRNA в эукариотических клетках, а также ген *SpCas9* под промотором CBh. Клонирование sgRNA в плазмиду рХ333 проводилось по протоколу *Zhang Lab* [5]. Для каждой sgRNA были синтезированы два олигонуклеотида:

- 5'-CACCGN₍₂₀₎-3', где N₍₂₀₎ – 20-нуклеотидный участок sgRNA, комплементарный гену-мишени;
- 3'-CN₍₂₀₎CAAA-5', где N₍₂₀₎ – последовательность, комплементарная первому олигонуклеотиду.

Оба полученных олигонуклеотида отжигали и фосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, после чего лигировали в плазмиду рХ333 по сайтам рестрикции BbsI или BsaI. Правильность вставки определяли секвенированием по Сенгеру.

Трансфекция. Трансфекцию клеток линии НЕК293Т проводили в 6-луночной планшете при концентрации клеток $3 \cdot 10^5$ на лунку. Трансфецирующая смесь содержала 3,3 мкг плазмиды и 5,0 мкг линейного полиэтиленimina с молекулярной массой 8 кДа.

Трансфекцию клеток линии Jurkat осуществляли методом электропорации на приборе Neon (*Invitrogen*, США) в 96-луночной планшете при концентрации клеток $5 \cdot 10^4$ на лунку. Количество плазмиды составляло 1 мкг. Параметры электропорации – 1325 В, 10 мс, 3 импульса. Результаты трансфекции регистрировались на 4-е сутки. Эффективность нокаута (в процентах) определялась по изменению поверхностной экспрессии Т-клеточного рецептора и белка В2М и рассчитывалась по следующей формуле:

$$E = 100 - \left(\frac{x}{y} \cdot 100 \right),$$

где x – доля позитивных клеток после трансфекции, %; y – доля позитивных клеток до трансфекции, %.

Проточная цитометрия. Поверхностная экспрессия белка В2М и $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора определялась на приборе DxFLEX (*Beckman Coulter*, США) с использованием антител anti-B2M-PE/Cy5.5 (*Abcam*, Великобритания), anti- $\alpha\beta$ TCR-FITC (*BD Biosciences*, США).

Статистика. Построение графиков и статистический анализ результатов осуществлялись с помощью программного обеспечения *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, США). Сравнение двух независимых групп данных проводилось методом Манна – Уитни, корреляционный анализ выполнялся по методу Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Маркером эффективности нокаута гена *B2M* являлось изменение экспрессии соответствующего белка на поверхности клеток линии НЕК293Т. В случае нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* эффективность нокаута измерялась по изменению уровня экспрессии $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора на поверхности клеток линии Jurkat.

Авторы предположили, что одновременное использование двух sgRNA для редактирования одного гена-мишени позволит увеличить вероятность нокаута за счет внесения протяженных делеций. Для нокаута гена *B2M* анализировались сочетания B2M1 + B2M6, B2M2 + B2M3, B2M4 + B2M5, B2M7 + B2M8, а для нокаута генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2* – сочетания TRAC1 + TRAC2, TRAC3 + TRAC4, TRBC1 + TRBC2 (рис. 1).

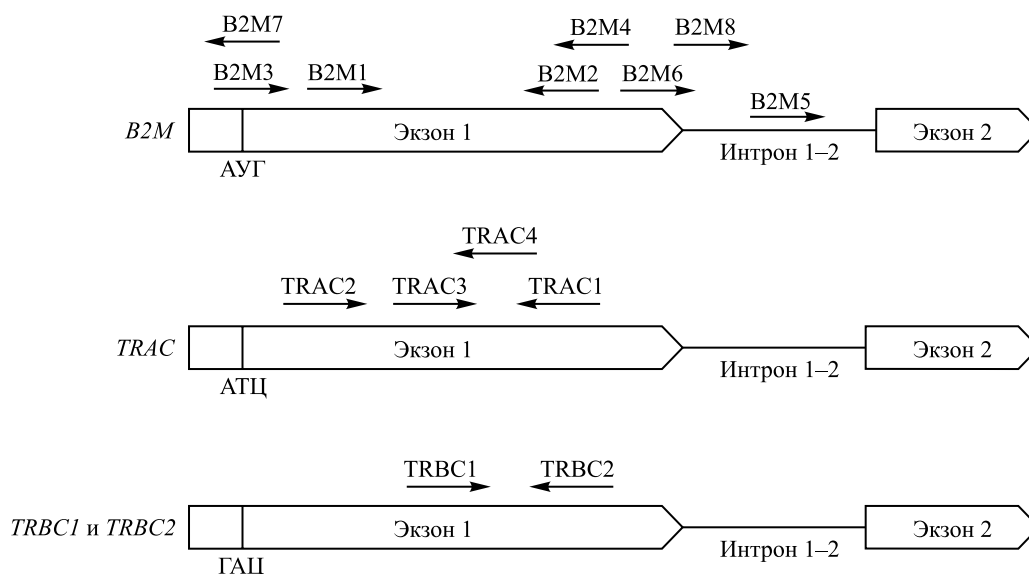


Рис. 1. Расположение участков-мишеней sgRNA в геномной ДНК (в экзоне 1 отмечен первый транслируемый кодон)

Fig. 1. Location of sgRNA target regions in genomic DNA (the first translated codon is marked on exon 1)

Наибольшую эффективность геномного редактирования в случае нокаута гена *B2M* продемонстрировали сочетания B2M2 + B2M3 (32,8 и 22,4 % соответственно) (рис. 2, а), наименьшую – сочетание B2M4 + B2M5 (10,1 %). Мишень sgRNA B2M5 расположена в интроне 1–2 и затрагивает сайт связывания транскрипционного репрессора CTCF, одной из функций которого является регуляция альтернативного сплайсинга мРНК [6]. Мишень sgRNA B2M4 располагается на конце экзона 1 и согласно работе [7] позволяет получить около 48 % B2M-негативных клеток линии HEK293T. Одно из возможных объяснений низкого выхода нокаутированных клеток в рассматриваемом случае состоит в следующем: внесение мутаций в регуляторную последовательность внутри интрона при использовании sgRNA B2M5 не приводит к значительным нарушениям сплайсинга, тем не менее данная sgRNA конкурирует с sgRNA B2M4 за связывание с эндонуклеазой Cas9, в результате чего концентрация комплексов B2M4 – Cas9 и, соответственно, вероятность внесения двухцепочечного разрыва в экзон 1 гена *B2M* снижаются.

В случае нокаута генов, кодирующих константные регионы цепей Т-клеточного рецептора, все сочетания sgRNA продемонстрировали одинаково высокую эффективность (около 40 % негативных клеток) (рис. 2, б).

Далее все sgRNA для генов *TRAC*, *TRBC1* и *TRBC2*, а также sgRNA B2M2, B2M3, B2M7 и B2M8 были клонированы по отдельности в вектор pX333 по сайту BbsI для определения их индивидуальной эффективности (рис. 3).

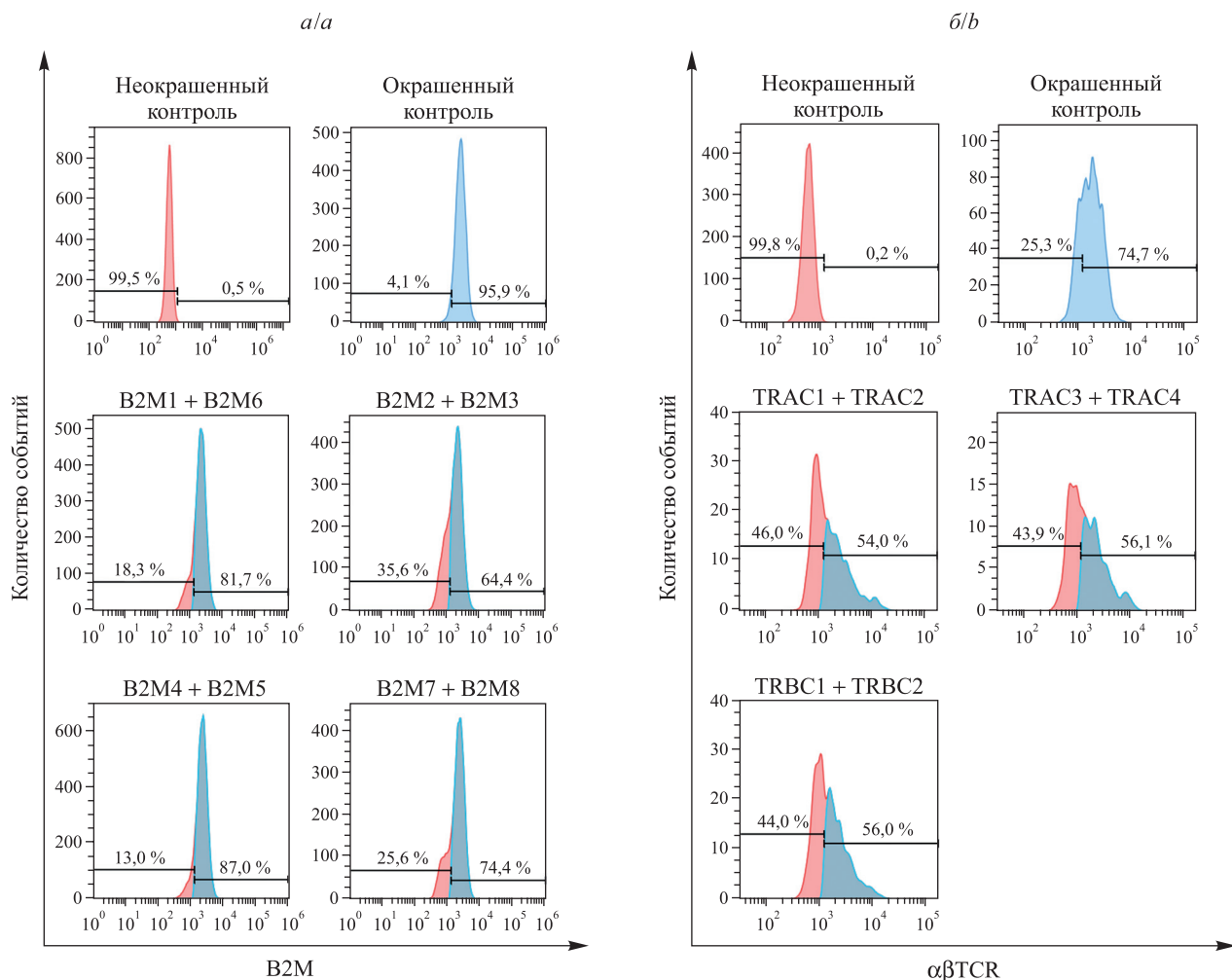


Рис. 2. Изменение поверхностной экспрессии белка B2M в клетках линии HEK293T (а) и Т-клеточного рецептора в клетках линии Jurkat (б) после геномного редактирования с использованием двух sgRNA

Fig. 2. Changes in the surface expression of the B2M protein in HEK293T cells (а) and the T-cell receptor in Jurkat cells (б) after genomic editing using two sgRNAs

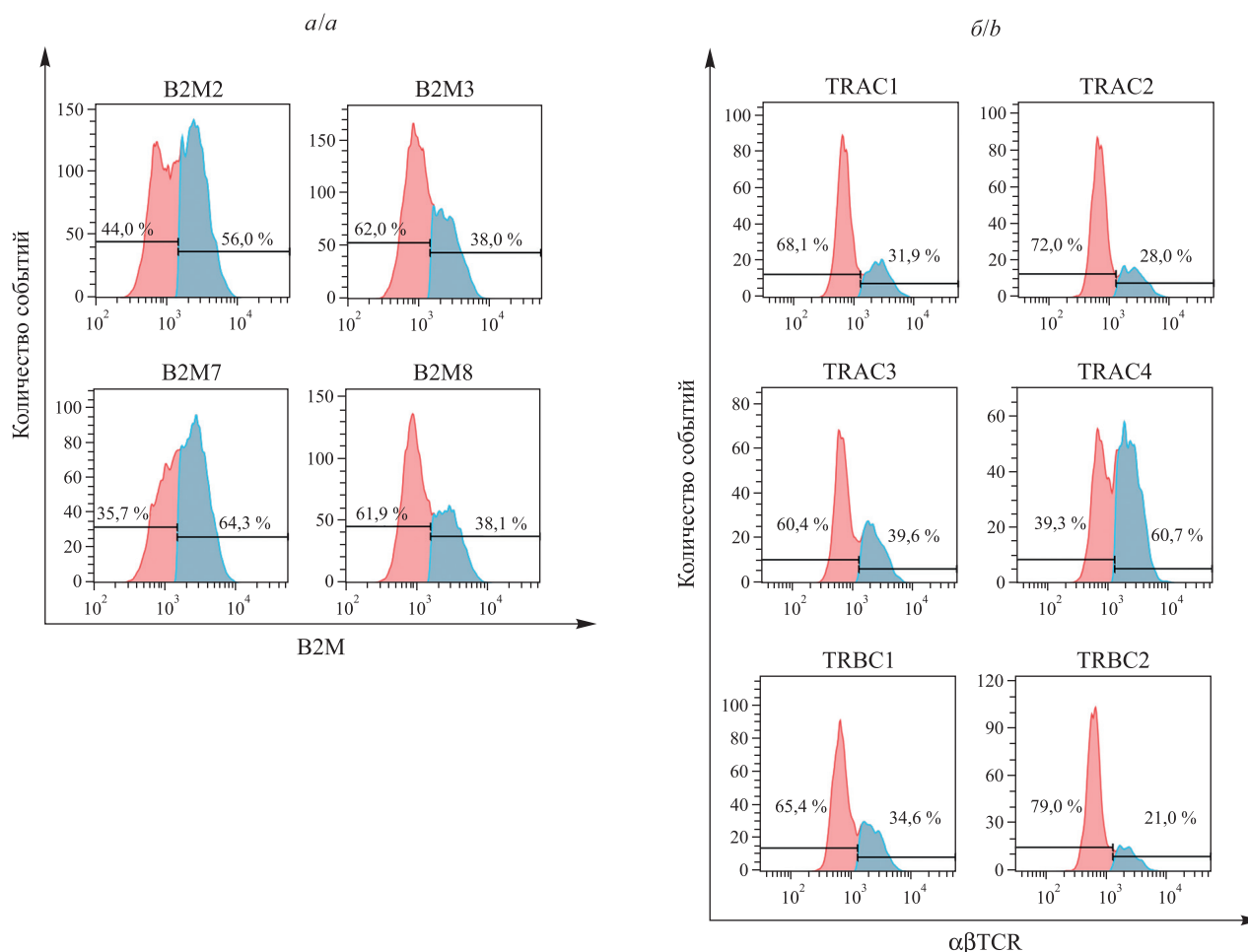


Рис. 3. Изменение поверхностной экспрессии белка B2M в клетках линии HEK293T (а) и Т-клеточного рецептора в клетках линии Jurkat (б) после геномного редактирования с использованием одной sgRNA

Fig. 3. Changes in the surface expression of the B2M protein in HEK293T cells (a) and the T-cell receptor in Jurkat cells (b) after genomic editing using a single sgRNA

Наибольший выход B2M-нокаутированных клеток (около 60,3 %) наблюдался при использовании sgRNA B2M3 и B2M8. Высокая эффективность обоих вариантов может быть объяснена тем, что области внесения двухцепочечных разрывов данных sgRNA (пять нуклеотидов выше РАМ-сайта) захватывают ключевые функциональные участки гена (старт-кодон в случае B2M3 и донорный сайт сплайсинга в случае B2M8).

Наиболее высокий выход клеток, негативных по экспрессии Т-клеточного рецептора (71,8 %), был получен при использовании sgRNA TRBC2. Что интересно, sgRNA TRBC2 и TRBC1, мишенью которых являются гомологичные участки экзона 1 генов *TRBC1* и *TRBC2*, продемонстрировали высокую эффективность редактирования, несмотря на то что их целевые последовательности присутствуют в геноме в четырех копиях. Данное наблюдение согласуется с результатами работы [8], в которой было показано, что эффективность редактирования не зависит от количества копий мишени в геноме.

Авторы не обнаружили статистически значимых различий в эффективности редактирования в зависимости от локализации участка-мишени в ДНК (начало, середина или конец экзона 1, плюс-цепь или минус-цепь ДНК), а также корреляционной зависимости между выходом нокаутированных клеток и количеством потенциальных *off-target*-мишеней, которые теоретически могут конкурировать с целевыми мишенями за связывание комплексов sgRNA – Cas9. Таким образом, эффективность нокаута, вероятно, в большей степени определяется не локализацией участка-мишени, а внутренними характеристиками sgRNA, исследование которых выходит за рамки данной работы.

Что интересно, эффективность нокаута при использовании одной sgRNA оказалась выше, чем при одновременном использовании двух sgRNA (рис. 4).

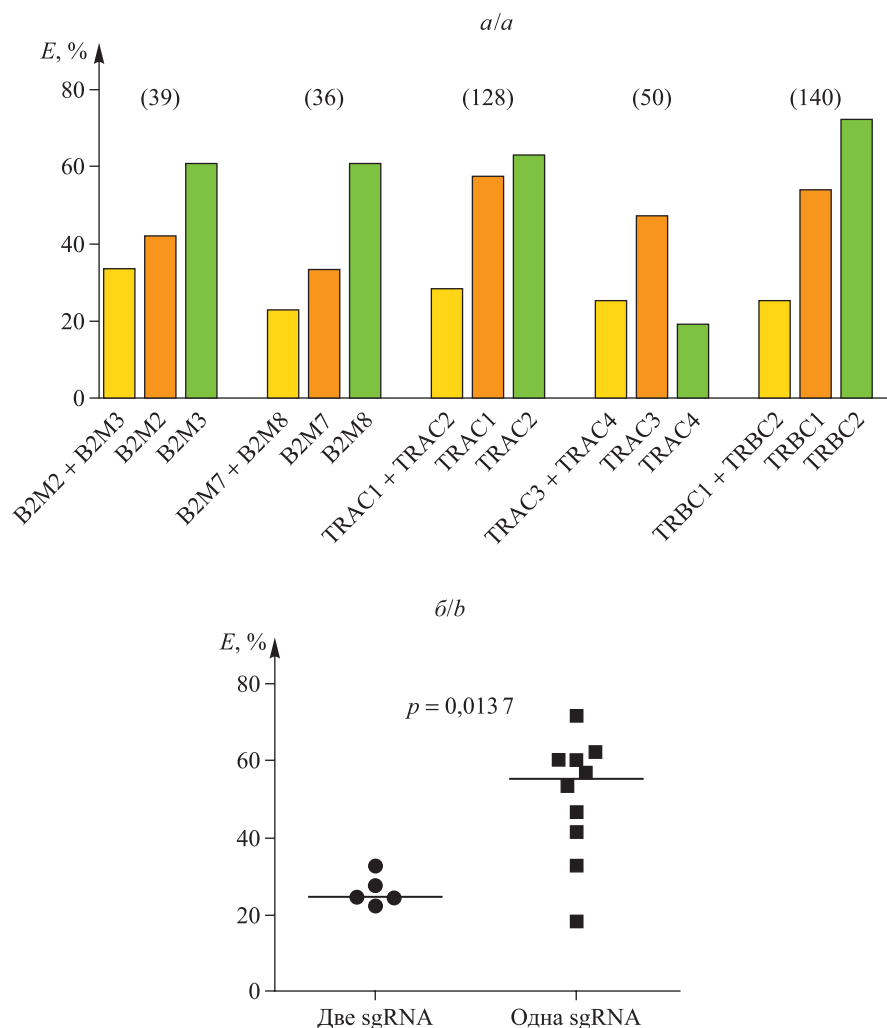


Рис. 4. Сравнение эффективности генного нокаута с использованием одной и двух sgRNA (на верхнем графике в скобках указано расстояние между двумя сайтами разрезания Cas9)
Fig. 4. Comparison of gene knockout efficiency using one and two sgRNAs (on the upper graph, the distance in base pairs between the two Cas9 cutting sites is shown in parentheses)

В работе [9] было показано, что в случае tandemного расположения двух экспрессионных кассет с промотором hU6 эффективность нокаута снижается в связи со снижением уровня экспрессии обеих sgRNA. Так как при использовании разных промоторов (hU6 и mU6) уровень экспрессии обеих sgRNA и доля нокаутированных клеток были выше, авторы объяснили данное наблюдение конкуренцией между двумя одинаковыми близко расположенными промоторами.

Однако в рассматриваемом случае уровень экспрессии sgRNA не объясняет наблюдаемых различий, так как проверка отдельных вариантов и их сочетаний проводилась с использованием одного и того же вектора, содержащего две tandemные экспрессионные кассеты с промотором hU6.

В работе [10] показано, что при двойном нокауте sgRNA демонстрируют синергетический эффект, если сайты Cas9 располагаются на расстоянии 40–300 пар нуклеотидов (п. н.) друг от друга. Также было отмечено, что синергетический эффект отсутствует, если расстояние между сайтами Cas9 двух sgRNA составляет менее 35 п. н., при этом эффективность редактирования может быть ниже эффективности редактирования при использовании данных sgRNA по отдельности [10].

В рассматриваемом случае расстояние между сайтами внесения двухцепочечных разрывов при использовании двух sgRNA варьировалось от 36 до 140 п. н. (см. рис. 4), однако авторы не обнаружили зависимости между данным параметром и количественным выходом нокаутированных клеток. Наблюдаемый эффект может быть объяснен стерической конкуренцией двух комплексов CRISPR/Cas9 в случае малого расстояния между сайтами, а также конкуренцией между более эффективной и менее эффективной sgRNA за связывание молекулы белка Cas9.

Заключение

Наибольший выход клеток, негативных по экспрессии белка B2M и T-клеточного рецептора, был получен при использовании одиночных sgRNA B2M3 и B2M8 и sgRNA TRBC2 соответственно.

Эффективность геномного редактирования при использовании одиночных sgRNA выше, чем при одновременном использовании двух sgRNA, участки-мишени которых располагаются в геноме на малом расстоянии друг от друга.

Библиографические ссылки / References

1. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*. 2016;283(7):1218–1231. DOI: 10.1111/febs.13586.
2. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. «Off-the-shelf» allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020;19(3):185–199. DOI: 10.1038/s41573-019-0051-2.
3. Daer RM, Cutts JP, Brafman DA, Haynes KA. The impact of chromatin dynamics on Cas9-mediated genome editing in human cells. *ACS Synthetic Biology*. 2017;6(3):428–438. DOI: 10.1021/acssynbio.5b00299.
4. Concordet J-P, Hacussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(W1):W242–W245. DOI: 10.1093/nar/gky354.
5. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
6. Alharbi AB, Schmitz U, Bailey CG, Rasko JEJ. CTCF as a regulator of alternative splicing: new tricks for an old player. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(14):7825–7838. DOI: 10.1093/nar/gkab520.
7. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014;15(5):643–652. DOI: 10.1016/j.stem.2014.10.004.
8. Yuen G, Khan FJ, Gao S, Stommel JM, Batchelor E, Wu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(20):12039–12053. DOI: 10.1093/nar/gkx843.
9. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017;8(10):17002–17011. DOI: 10.18632/oncotarget.15218.
10. Joberty G, Fälth-Savitski M, Paulmann M, Bösch M, Doce C, Cheng AT, et al. A tandem guide RNA-based strategy for efficient CRISPR gene editing of cell populations with low heterogeneity of edited alleles. *CRISPR Journal*. 2020;3(2):123–134. DOI: 10.1089/crispr.2019.0064.

Получена 15.04.2022 / исправлена 25.05.2022 / принята 27.05.2022.
Received 15.04.2022 / revised 25.05.2022 / accepted 27.05.2022.