

УДК 577.29

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ РНК-ГИДЫ, ДЛЯ CAS9-ОПОСРЕДОВАННОЙ АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕГРИНА ALPHA V BETA 3 В КЛЕТКАХ

Е.В.Сухина

Научный руководитель: к.б.н., А.Г. Першина

Сибирский государственный медицинский университет, Центр биологических исследований и биоинженерии,
Россия, г. Томск, Московский тракт, 2 ст18, 634050

E-mail: suhininaev@mail.ru

DESIGN OF A RECOMBINANT PLASMIDS ENCODING SINGLE GUIDE RNA FOR CAS9-MEDIATED GENE ACTIVATION OF INTEGRIN ALPHA V BETA 3 IN CELLS

E.V. Sukhinina

Scientific Supervisor: Candidate of Sciences in Biology, A.G.Pershina

Siberian State Medical University, Centre of biological research and bioengineering, Russia, Tomsk,
Moskovskiy tr., 2 b18, 634050

E-mail: suhininaev@mail.ru

Abstract. *Alpha v beta 3 integrin is a promising target for anticancer therapy. In the present study, we constructed recombinant plasmids aimed at enhancing the expression of integrin alpha 5 beta 3 via a CRISPR/Cas9-mediated gene activation system. These plasmids are designed to creation of a cell line with integrin overexpression for testing new drugs.*

Введение. Интегрины – рецепторы клеточной адгезии, которые осуществляют связь клетки с внеклеточным матриксом. $\alpha_v\beta_3$ интегрин известен как вовлеченный в процессы ангиогенеза и метастазирования и широко представлен на эндотелии опухолевых сосудов и на мембране многих типов опухолевых клеток. [1, 2] Этот рецептор может быть использован в качестве мишени для противоопухолевой терапии. Одним из подходов является модификация RGD-пептидами лекарственных препаратов и диагностических агентов для их адресного накопления в опухолях. [3] Разработка и испытание таких препаратов требует наличия модельных клеточных линий с повышенной экспрессией $\alpha_v\beta_3$. Для создания данных линий можно применить систему направленной активации транскрипции эндогенных генов на основе комплекса *CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM)*. [4] SAM-система состоит из трех компонентов: dCas (белка Cas9 без эндонуклеазной активности), направляющей РНК (sgRNA) и активационных доменов. SgRNA необходима, чтобы направить белковый комплекс к генам *itgav* и *itgb3*, она содержит варибельный участок узнавания целевой последовательности (длиной 20 п.н.), который формирует гетеродуплекс с ДНК, и константный участок, обеспечивающий взаимодействие с компонентами активационного комплекса Cas9-SAM. Информацию о константной последовательности sgRNA несет плаزمид *lenti sgRNA (MS2) (AddGene)*. Чтобы добавить в эту плазмиду последовательность варибельного участка, необходимо провести дизайн олигонуклеотидов и выполнить

клонирование. Тогда полученная плазида будет кодировать *sgRNA*, направляющую комплекс активации транскрипции к промоторам тех генов, которые мы хотим активировать.

Цель. Получить рекомбинантные плазмиды для *SAM*-опосредованного увеличения экспрессии α , и β_3 субъединиц интегрин, кодируемых генами *itgav* и *itgb3*.

Экспериментальная часть. Дизайн праймеров для клонирования участка последовательности *sgRNA* выполняли с использованием программы *Cas9 Activator Tool (ZhangLab)* (табл. 1). Клонирование последовательности *sgRNA* в плазмиду *lenti sgRNA (MS2) (AddGene)* проводили согласно протоколу, предложенному Zhang и соавторами. [5] При этом применяли реакцию GoldenGate, которая основана на использовании рестриктазы класса IIS – *BsmBI (Fermentas)*. [6] После получения рекомбинантной плазмиды проводили трансформацию компетентных бактерий штамма *Escherichia coli Stb13*. *Stb13* культивировали на LB-агаре с добавлением ампициллина. По несколько колоний с каждой чашки отбирали для выращивания в LB-среде с ампициллином. Выделение плазмидной ДНК выполняли при помощи набора *Plasmid Miniprep (Evrogen)*. Для скрининга рекомбинантных плазмид их обрабатывали рестриктазой *BsuI (Сибэнзим)* – при успешном клонировании один из сайтов узнавания рестриктазы удаляется из последовательности плазмидной ДНК. Размер рестрикционных фрагментов определяли методом электрофореза в агарозном геле (рисунок 1). Секвенирование для подтверждения правильности клонированной последовательности выполнено сотрудниками НИИ Медицинской Генетики на секвенаторе *ABI 3130XL (Applied Biosystems)*.

Результаты. Выполнен дизайн праймеров для клонирования, специфичных для активации каждого из целевых генов *itgav* и *itgb3* человека и мыши, и проведено их клонирование в плазмиду *lenti sgRNA (MS2)*. После трансформации клеток *E.coli Stb13* наблюдали рост колоний на селективной среде. Для дальнейшего скринингового анализа было отобрано по 3 случайных колонии с каждой культуральной чашки. На основании данных рестрикционного анализа было отобрано 15 плазмид, не расщепленных эндонуклеазой *BsuI*. Соответствие клонированных последовательностей ожидаемым было подтверждено данными секвенирования отобранных плазмид.

Заключение. В результате проведенных исследований были сконструированы рекомбинантные плазмиды с вставкой 20 п.н., кодирующих участок *sgRNA*, который отвечает за направление комплекса *CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM)* к промоторным областям генов – *itgav* и *itgb3* мыши и *ITGAV* и *ITGB3* человека. Полученные плазмиды могут быть использованы для *SAM*-опосредованной активации экспрессии с целью получения клеточных линий человека и животных с повышенной экспрессией интегрин α , β_3 .

Таблица 1

Последовательности участков sgRNA, направляющих SAMк соответствующим генам

Организм	Ген	ID транскрипта	Расстояние до сайта начала транскрипции	Варибельная последовательность sgRNA
<i>Homo sapiens</i>	ITGAV	NM_001145000	98	GGAGCTGGAGGAGGAAGTGG
			164	ACAGGCGGCGACTGCACTCA
	ITGB3	NM_000212	46	GCAGCGGGAGGGGAGGGGAG
			25	GGAAAAGCGGCCGCGGGCGG
<i>Mus musculus</i>	itgav	NM_008402	116	GCGCGCTGCCACTGCCCCCC
			67	CCGGTCTCCGAGGCTGTCC
	itgb3	NM_016780	2	ACGGGGTGGGTGGGACACAG
			57	GGCAGGGTCCAGGCGTGAGC

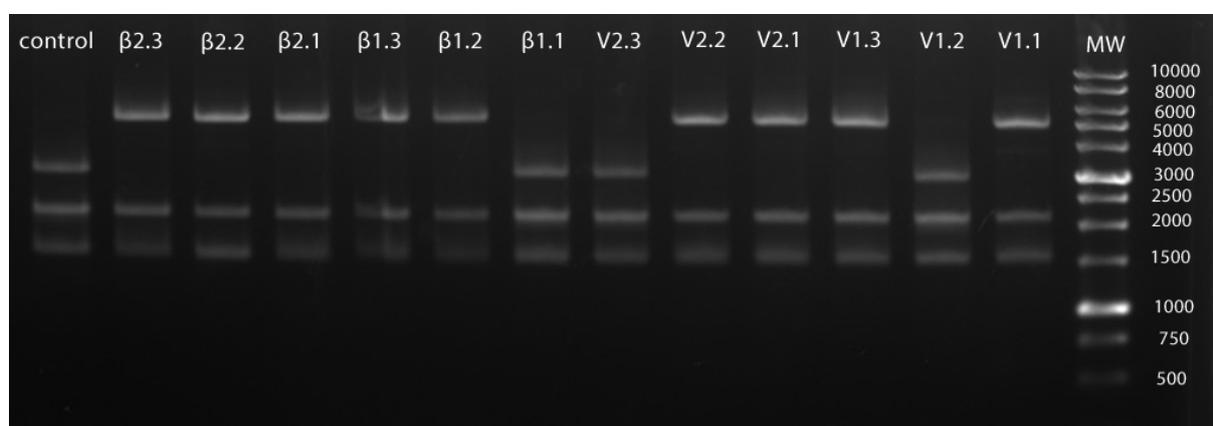


Рис. 1. Репрезентативное изображение результатов электрофореза в агарозном геле рекомбинатных плазмид после обработки рестриктазой *BsuI* (Сибэнзим) в течение 1 ч при 37 °С. MW – маркер молекулярного веса 500-10000 кДа (СибЭнзим). Control – плаزمида *lenti sgRNA* (MS2) после обработки рестриктазой *BsuI* (Сибэнзим) в течение 1 ч при 37 °С

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance // Trends Cell Biol. – 2015. – no. 25. – pp. 234-40.
2. Hamidi, H., Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis // Nat Rev Cancer. – 2018– no. 18. – pp. 533–548.
3. Danhier F, Le Breton A, Préat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis // Mol Pharm. – 2012. – no. 9(11) – pp. 2961-73.
4. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex // Nature. – 2015.– no. 517. – pp. 583-588.
5. Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T. et al. CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs // SciRep. – 2015. – no. 5. – pp. 16277
6. Engler C, Marillonnet S. Golden Gate cloning // Methods Mol Biol. – 2014. – no. 1116. – pp. 119-31.