

Способы повышения эффективности knock-in в геном плюрипотентных клеток человека при помощи системы CRISPR/Cas9

М.М. Гридина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (чИПСК) – мощный инструмент для биомедицинских исследований. Возможность создания пациент-специфичных плюрипотентных клеток и последующая их дифференцировка в любой тип соматических клеток делают чИПСК замечательным объектом для создания *in vitro* моделей заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и будущим источником клеточного материала для регенеративной медицины. Для того чтобы потенциал технологии чИПСК можно было реализовать в полном объеме, необходимы эффективные и точные методы редактирования генома этих клеток. В настоящее время система CRISPR/Cas9 – наиболее широко используемый подход для введения в ДНК сайт-специфичных двуцепочечных разрывов. С ее помощью с высокой эффективностью удается реализовать knock-out интересующих исследователя генов. Однако введение в целевое место генома заданной последовательности (knock-in) является существенно более сложной задачей. В зависимости от выбранного для проведения встройки локуса эффективность knock-in в геном чИПСК может составлять от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} , что на порядок ниже, чем показано для эмбриональных стволовых клеток мышей или перевивных линий клеток. В этом обзоре я делаю попытку объединить и структурировать всю известную информацию, касающуюся увеличения эффективности получения целевых встроек в геном чИПСК. В статье перечислены наиболее эффективные стратегии разработки донора для гомологичной рекомбинации, способы управления путями восстановления двуцепочечных разрывов, внесенных нуклеазой, в том числе за счет управления временем работы системы CRISPR/Cas9 в клетке. Низкая выживаемость чИПСК в результате проведения экспериментов по редактированию генома – еще одно затруднение на пути к успешному получению knock-in, для устранения которого предложено несколько высокоэффективных подходов. Наконец, я описываю, на мой взгляд, наиболее многообещающую стратегию получения линий чИПСК с целевой встройкой, которой является одновременное проведение редактирования и репрограммирования генома.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека; система CRISPR/Cas9; редактирование генома; эффективность knock-in.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гридина М.М. Способы повышения эффективности knock-in в геном плюрипотентных клеток человека при помощи системы CRISPR/Cas9. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1026-1032. DOI 10.18699/VJ18.446

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gridina M.M. Improvement of the knock-in efficiency in the genome of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR/Cas9 system. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8): 1026-1032. DOI 10.18699/VJ18.446 (in Russian)

Improvement of the knock-in efficiency in the genome of human induced pluripotent stem cells using the CRISPR/Cas9 system

M.M. Gridina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Human induced pluripotent stem (hiPS) cells are a powerful tool for biomedical research. The ability to create patient-specific pluripotent cells and their subsequent differentiation into any somatic cell type makes hiPS cells a valuable object for creating *in vitro* models of human diseases, screening drugs and a future source of cells for regenerative medicine. To realize entirely a potential of hiPS cells, effective and precise methods for their genome editing are needed. The CRISPR/Cas9 system is the most widely used method for introducing site-specific double-stranded breaks into DNA. It allows genes of interest to be knocked out with high efficiency. However, knock-in into the target site of the genome is a much more difficult task. Moreover, many researchers have noted a low efficiency of introducing target constructs into the hiPS cells' genome. In this review, I attempt to describe the currently known information regarding the matter of increasing efficiency of targeted insertions into hiPS cells' genome. Here I will describe the most effective strategies for designing the donor template for homology-directed repair, methods to manipulate the double-strand break repair pathways introduced by a nuclease, including control of CRISPR/Cas9 delivery time. A low survival rate of hiPS cells following genome editing experiments is another difficulty on the way towards successful knock-in, and here several highly effective approaches addressing it are proposed. Finally, I describe the most promising strategies, one-step reprogramming and genome editing, which allows gene-modified integration-free hiPS cells to be efficiently generated directly from somatic cells.

Key words: human induced pluripotent stem cells; CRISPR/Cas9 system; genome editing; knock-in efficiency.

Н ебывалый импульс к развитию биомедицинским исследованиям придало появление двух технологий, а именно: получение индуцированных плюрипотентных клеток человека (чИПСК) и направленное редактирование генома при помощи CRISPR/Cas9-системы. Получение и направленная дифференцировка пациент-специфичных ИПСК открывают широкие перспективы для создания *in vitro* моделей заболеваний, скрининга лекарственных препаратов и делают возможным получение материала для регенеративной медицины. Для того чтобы использовать потенциал чИПСК во всем объеме, необходимы точные и эффективные методы редактирования генома. CRISPR/Cas9-система способна направленно модифицировать геномы любых организмов, и в частности человека, что значительно расширяет экспериментальные возможности геномных исследований. Комбинируя эти две технологии, исследователи получают возможность, во-первых, корректировать вызывающие патологию мутации в пациент-специфичных плюрипотентных клетках, во-вторых, вносить в геном «нормальных» чИПСК мутации, связанные с развитием заболевания, т. е. получить таким образом готовую для исследования *in vitro* модель заболевания. В-третьих, можно более точно устанавливать значимость конкретных мутаций для развития фенотипа, создавая изогенные клоны клеток, что позволит избежать эффектов генетического фона, которые, как правило, сложно учитывать.

Система CRISPR/Cas9 – наиболее широко используемый метод введения в ДНК сайт-специфичных двуцепочечных разрывов (DSB). Свою популярность он заслужил благодаря высокой специфичности и эффективности, сопряженным с простотой исполнения и надежностью (Hsu et al., 2014). Нуклеаза SpCas9 (далее Cas9), полученная из бактерий вида *Streptococcus pyogenes*, в настоящее время применяется в геномной инженерии чаще всего. Мне не хотелось бы углубляться в детали молекулярного механизма работы CRISPR/SpCas9 системы, которые можно найти, например, в работе А.В. Смирнова с коллегами (2016) и недавно вышедшей книге «Редактирование генов и геномов» (2018), однако дать общее представление необходимо. В системе CRISPR/SpCas9 химерная молекула sgRNA (single guide RNA) опознает любые интересующие исследователя 20 п. о. в геноме, с 3'-конца которых находится 5'-NGG-3' (Protospacer adjacent motif, PAM). Молекула SgRNA «путешествует» по геному в поисках гомологичной последовательности не одна, а в комплексе с SpCas9 нуклеазой, которая вносит DSB с тупыми концами на расстоянии трех нуклеотидов от PAM (рис. 1).

На этом работа CRISPR/Cas9-системы заканчивается, и на сцену выступает внутренняя машинерия клетки, которая стремится репарировать получившиеся DSB. Клетка добивается этого, используя механизмы негомологичного соединения концов (nonhomologous end joining, NHEJ) или репарации по типу гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR) (Heyer et al., 2010). NHEJ – это неспецифическая реакция лигирования, точность которой сильно зависит от структуры концов разрыва, а результатом могут быть различные inserции или делеции (инделлы) в целевой участок генома. При использовании именно NHEJ получают knock-out интересующих генов.

Для встраивания в геном нужной последовательности (получения knock-in) необходимо, чтобы в клетке работал HDR и была матрица с участками гомологии по обеим сторонам от DSB.

Введение генетической конструкции в заданное место в геноме чИПСК является важной, но на данный момент сложной и трудозатратной задачей, требующей скрининга большого числа клонов. В зависимости от выбранного для проведения встройки локуса эффективность knock-in в геном чИПСК может составлять от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} (Merkle et al., 2015), что на порядок ниже, чем показано для мышинных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или перевивных линий клеток (Mali et al., 2013). В обзоре я делаю попытку описать и структурировать доступные на настоящее время методы увеличения эффективности получения целевой встройки в геном чИПСК.

Лучше режем

Введение генетической конструкции в выбранный локус будет проходить с тем большей вероятностью, чем эффективнее происходит внесение DSB системой CRISPR/Cas9. Как упоминалось выше, составные части CRISPR/Cas9-системы – sgRNA и Cas9 нуклеаза. Эти компоненты могут быть доставлены в клетку в разном виде, а именно: как плазмидная ДНК, sgRNA и Cas9 mRNA или рибонуклеиновый комплекс (RNP комплекс), состоящий из sgRNA и белка Cas9. Для легко трансфецирующихся клеток, таких как НЕК293 или мышинные ЭСК, зависимость эффективности работы системы CRISPR/Cas9 от используемого вида ее составляющих минимальна. Для чИПСК же, наоборот, RNP комплекс в 4.3 и 2.7 раза позволяет увеличить эффективность внесения DSB по сравнению с использованием плазмид и sgRNA+Cas9 mRNA соответственно (Liang et al., 2015). Наблюдаемое для некоторых линий клеток повышение эффективности внесения knock-in при использовании RNP комплекса также может быть связано с тем, что он активен сразу же после попадания в клетку. Быстрый запуск работы нуклеазы особенно принципиален при использовании линейаризованных доноров для HDR (см. ниже). Их концентрация в клетке наивысшая непосредственно после трансфекции, и с течением времени они достаточно быстро деградируют (Kim et al., 2014). Дополнительным преимуществом использования RNP комплекса является, в первую очередь, снижение off-target эффектов за счет быстрой деградации Cas9 белка, которая происходит в течение 24 ч после трансфекции (Kim et al., 2014), во-вторых, снижение вероятности нецелевых встроек в геном, связанное с отсутствием ДНК вектора, несущего последовательности sgRNA и Cas9. Кроме того, трансфекция RNP комплекса менее токсична для плюрипотентных клеток человека, чем плазмидная (Kim et al., 2014).

Идеальный донор

Для получения целевой встройки в геном вместе с компонентами CRISPR/Cas9-системы в клетку вносят последовательность, которая будет служить донором для HDR. В этом качестве можно использовать плазмидную, соответственно двуцепочечную, ДНК (dsDNA) или синтетический одноцепочечный олигонуклеотид (ssODN,

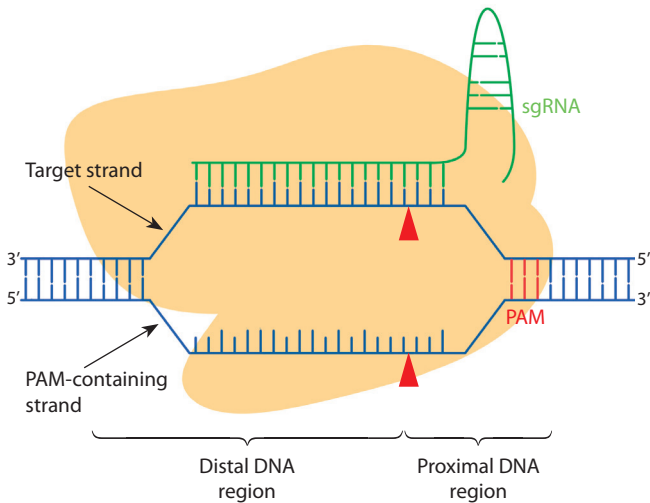


Fig. 1. DSB creation with the CRISPR/Cas9 system.

SpCas9 (yellow) combined with sgRNA (green) binds DNA (blue). The sgRNA sequence is complementary to the target DNA strand.

single-stranded oligonucleotide). Плазмидная ДНК позволяет встраивать в геном достаточно крупные фрагменты – до 7.4 т. п. о. (Wang et al., 2015). В случае необходимости встройки короткой последовательности, к примеру LoxP сайтов, оправдано использование ssODN. Он позволяет с более высокой эффективностью, по сравнению с использованием dsDNA, вводить последовательности размером до 100 нуклеотидов (Orlando et al., 2010; Chen et al., 2011; Liang et al., 2017). Это особо привлекательно в свете возможности проведения корректировки точковых мутаций, являющихся причиной заболеваний человека (Niu et al., 2016; Turan et al., 2016).

Исходя из знаний о динамике работы CRISPR/Cas9-системы, С.Д. Richardson с коллегами (2016) предложили необычную стратегию для выбора донора для HDR. Две цепи ДНК можно обозначить как целевую, которую узнает sgRNA, и PAM-содержащую, соответственно, комплементарную целевой (см. рис. 1). После того как sgRNA в составе комплекса с Cas9 опознала целевой участок, нуклеаза вносит DSB и образуются четыре конца ДНК. Процесс диссоциации белка Cas9 от двуцепочечной ДНК занимает около 6 ч. В течение этого времени Cas9 прочно связан с тремя концами, образованными в результате внесения DSB. Четвертый же, являющийся 3'-концом PAM содержащей цепи ДНК, освобождается быстрее и, соответственно, раньше становится доступным для формирования комплементарных связей с ДНК донора. Если использовать донор, комплементарный PAM содержащей цепи, это в 2.6 раза увеличивает эффективность HDR, по сравнению с использованием ssODN, комплементарного целевой цепи ДНК (Richardson et al., 2016). Эффективность гомологичной рекомбинации можно еще увеличить, если варьировать длину плеч гомологии. Типичным дизайном ssODN являются симметричные плечи гомологии, соответствующие последовательностям по обе стороны от внесенного разрыва. Однако использование асимметричного ssODN, у которого 36 нуклеотидов комплементар-

ны дистальному концу разрыва PAM-содержащей цепи и 91 нуклеотид – проксимальному концу, позволяет еще больше увеличить эффективность HDR. Данные об эффективности применения этой стратегии для внесения knock-in в ЧИПСК несколько противоречивы. С одной стороны, она была успешно применена в работе (Liang et al., 2017), где с ее помощью удалось увеличить эффективность HDR в 2.5 раза. С другой стороны, в работе (Yumlu et al., 2017) наоборот показано, что использование «стандартного» симметричного ssODN позволяет получать желаемые инсерции с максимальной эффективностью в ЧИПСК. Авторы предполагают, что такое противоречие может происходить из-за специфики используемых линий клеток и/или особенностей локуса, подвергаемого модификациям, – его локализации внутри хроматина и собственно последовательности нуклеотидов.

В отличие от ssODN, двуцепочечный плазмидный донор позволяет встраивать более крупные фрагменты ДНК. Линеаризация донора – типичный способ увеличения эффективности его интеграции в геном. Более того, на эффективность HDR можно влиять, используя разные способы линеаризации плазмиды. Так же, как в случае с ssODN, наиболее эффективна для гомологичной рекомбинации асимметричная конструкция, у которой более короткое плечо с дистальной стороны от PAM (см. рис. 1). Таким способом удалось повысить эффективность knock-in в ЧИПСК в 4.2 раза (He et al., 2016).

Еще один вариант линеаризации донора – двойное разрезание плазмиды, содержащей донорную последовательность. Подход заключается в следующем: с внешней стороны плеч гомологии вводят два сайта узнавания для той же sgRNA, которая будет направлять Cas9 к целевому сайту в геноме. После сборки sgRNA/Cas9 комплексов они «скринируют» как геномную, так и плазмидную ДНК в поисках сайтов узнавания для sgRNA и, находя, условно одновременно вносят DSB в геном и линеаризуют донор. Таким образом, происходит синхронизация потребности в матрице для гомологичной рекомбинации и ее доступности. При использовании описанной стратегии J.P. Zhang с коллегами (2017) удалось увеличить эффективность HDR в некоторых локусах ЧИПСК в 7.6 раза, а дополнительная синхронизация клеточного цикла (более подробно см. ниже) привела к увеличению эффективности встройки еще в 1.5–2 раза. Важным преимуществом использования донора с двумя сайтами разрезания для sgRNA является возможность ограничиться короткими плечами гомологии (всего 600 п. о.) без потери эффективности knock-in (Zhang et al., 2017). Однако линеаризация донора увеличивает, в том числе, и неспецифическую его интеграцию в геном. Одна из модификаций стратегии применения донора с двумя сайтами разрезания для sgRNA – использование мутантных форм белка Cas9, которые делают ники вместо DSB. В этом случае ники вносят как в целевое место в геноме, так и в молекулу донора по обеим сторонам от плеч гомологии. В результате существенно снижается вероятность нецелевой встройки, и этот подход также позволяет практически полностью избавиться от нежелательных инделов. Кроме того, DSB в плюрипотентных клетках человека могут запускать апоптоз (Liu et al., 2013, 2014), чего не происходит при использовании вносящих

ники форм Cas9. К сожалению, при этом эффективность knock-in в геном плюрипотентных клеток человека увеличивается не так эффективно, как показано в работе (Zhang et al., 2017), а только в 1.5–2 раза, в зависимости от линии клеток (Chen et al., 2017).

Управление путями восстановления DSB

Восстановление DSB, образовавшихся в результате работы Cas9 нуклеазы, может идти двумя основными путями: NHEJ и HDR (рис. 2). Для увеличения эффективности knock-in можно либо вывести из строя ключевых участников процесса NHEJ, либо активировать HDR.

Массовый скрининг органических соединений и оценку их влияния на эффективность HDR провели С. Yu с коллегами (2015). Из 4000 тестируемых органических соединений им удалось выявить два (L755507 и Brefeldin A), достоверно увеличивающих получение встройки целевых фрагментов в геном при помощи CRISPR/Cas9-системы. Для L755507 было показано увеличение knock-in в ЧИПСК в три раза при использовании плазмидной ДНК в качестве донора для HDR, и в девять раз – при использовании ssODN (Yu et al., 2015).

Выбор пути репарации зависит от типа внесенного нуклеазой разреза, т.е. 5'-липкие концы с большей вероятностью будут восстановлены по HDR пути, чем тупые концы (Bothmer et al., 2017). Мутантная форма белка Cas9 – SpCas9n – делает направленные одностебельные надрезы. Использование Cas9n с двумя sgRNA, опознающими близко расположенные последовательности на разных цепях ДНК, одновременно приводит к образованию DSB с перекрывающимися 5'-липкими концами (Shen et al., 2014). Еще одна нуклеаза, делающая разрывы с липкими концами, – Cpf1 (Zetsche et al., 2015). Сочетание использования SpCas9n или AsCpf1 с обработкой клеток несколькими органическими соединениями позволяет увеличить эффективность внесения целевой модификации в геном ЧИПСК в 3–7.2 раза, в зависимости от редактируемого локуса и используемого сочетания (Ma et al., 2018; Riesenberg, Maricic, 2018).

Один из ключевых участников процесса гомологичной рекомбинации – белок RAD51 (см. рис. 2). Он связывает одноцепочечную ДНК в месте разрыва и катализирует поиск и узнавание гомологичной последовательности ДНК. Найдя последнюю, он физически соединяет ее с местом разрыва и приводит к формированию D-петли, внутри которой ДНК полимеразы садится на 3'-конец оборванной нити, и в результате происходит репарация DSB (Haber, 2018). Сверхэкспрессия RAD51 в ЭСК и ИПСК человека как сама по себе, так и совместно с обработкой клеток вальпроевой кислотой способна существенно увеличивать эффективность HDR и приводит к эффективному получению гомозиготных по встройке клонов клеток (Такауама et al., 2017). Таким образом, становится возможным сделать knock-in даже в транскрипционно не активные локусы, что является крайне сложной задачей, когда речь заходит о плюрипотентных клетках человека.

Как и RAD51, CtIP – участник ранних этапов процесса гомологичной рекомбинации (см. рис. 2), кофактор для MRE11 эндонуклеазы. Они совместно приводят к образованию свободного одноцепочечного 3'-конца,

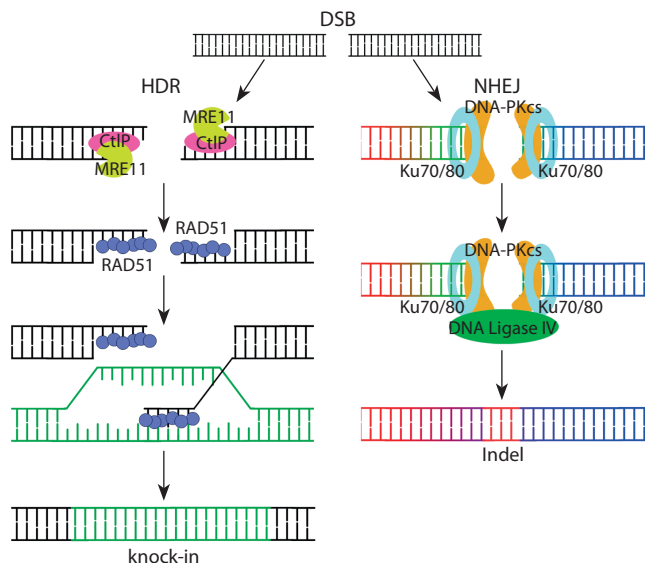


Fig. 2. Key molecules involved in the NHEJ or HDR pathways of DSB repair.

At one of the initial steps of NHEJ, the Ku70/Ku80 heterodimer finds, recognizes, and binds DSB blunt ends. Then DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) approaches the break. Ends of the break are brought together so that they can be ligated (Dexheimer, 2013). The NHEJ pathway can be disabled by inhibitors of DNA-PKcs (NU7441) and DNA ligase IV (SCR7) (Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015; Riesenberg, Maricic, 2018).

During homology-directed repair, MRE11 within the MRN-CtIP complex is recruited to the DSB site. Its exonuclease activity produces single-stranded DNA (ssDNA). Single-stranded ends of the break cannot be repaired by NHEJ. ssDNA is covered by RPA, which is then replaced by Rad51. The latter triggers the search for homologous sequence and invasion of the DNA strand. Finally, the DNA break is repaired.

расщепляя 5'-цепь ДНК (Anand et al., 2016). Использование рекомбинантной молекулы белка Cas9, «слитого» с N-концевым доменом CtIP, вызывает более активное накопление эндогенного белка CtIP в месте внесения разрыва и увеличивает эффективность интеграции трансгена по механизму HDR. Применение этой стратегии на ЧИПСК показало увеличение эффективности knock-in в 1.5 раза (Charpentier et al., 2018).

Управление временем работы CRISPR/Cas9 в клетке

В клетке, находящейся в G1-фазе клеточного цикла, репарация происходит в основном по механизму NHEJ. После репликации ДНК в клетке совершается накопление белков, участвующих в процессе гомологичной рекомбинации (Heuer et al., 2010). Для эффективного knock-in необходимо, чтобы все компоненты CRISPR/Cas9-системы и матрица для HDR оказались в клетке никак не ранее S-фазы. Этого можно добиться двумя способами. Во-первых, синхронизацией культуры клеток. Два органических соединения, АВТ-751 и Nocodazole, ингибируют полимеризацию микротрубочек и обратно останавливают клеточный цикл в G2/M-фазе. Эффективность knock-in в геном плюрипотентных клеток человека, синхронизированных обработкой этими двумя веществами, увеличивалась в три-пять раз по сравнению с не-

синхронизированными (Lin et al., 2014; Yang et al., 2016). Более того, отбор при помощи FACS клеток, находящихся в G2/M-фазе, увеличивал эффективность knock-in в четыре раза по сравнению со смешанной популяцией клеток, и в 11 раз по сравнению с G1 фракцией (Yang et al., 2016).

Второй способ – запретить Cas9 находиться в клетках в течение G1-фазы. Белок Geminin полностью исчезает из клеток во время поздней M- и G1-фаз (Nishitani et al., 2004). Химерный белок, полученный слиянием Cas9 и Geminin, с одной стороны, сохраняет нуклеазную активность, а с другой стороны, присутствует в клетке только в течение S/G2-фазы клеточного цикла. При использовании таким образом модифицированного Cas9 на ЧИПСК удалось добиться двукратного увеличения введения knock-in, и при этом существенно снизилось число инделов (Howden et al., 2016).

Нетривиальный подход для увеличения эффективности knock-in в ЧИПСК предложили Q. Guo с коллегами (2018). По их данным, если клетки в течение суток после трансфекции культивировать при 32 °С и следующие 24 ч – при 37 °С, то HDR повышается примерно в два раза. Непонятно, за счет чего происходит такое увеличение эффективности работы CRISPR-системы при холодовом шоке. Для цинковопальцевых нуклеаз показано, что культивирование клеток при пониженной температуре приводит к увеличению числа разрывов в клетках за счет накопления в них нуклеазы (Doyon et al., 2010). Однако это не объясняет, почему холодовой шок ЧИПСК увеличивает именно HDR и не вызывает похожих эффектов в HEK293. Наиболее очевидное предположение – низкая температура может влиять на клеточный цикл ЧИПСК с увеличением числа клеток в G2/M-фазах (Rieder, Cole, 2002). Кроме того, понижение температуры может иметь термодинамический эффект, стабилизируя промежуточные продукты рекомбинации.

Увеличение выживаемости ЧИПСК

Дополнительные трудности, с которыми сталкиваются исследователи, начиная эксперименты по редактированию генома ЧИПСК, проистекают из того, что клетки этого типа плохо переносят манипуляции с ними. Во-первых, в отличие от мышиных плюрипотентных клеток, диссоциация ЧИПСК до одноклеточного состояния приводит к массовой гибели клеток. Применение ROCK ингибитора увеличивает эффективность их клонирования (Watanabe et al., 2007), что существенно упрощает работу с ними. Однако это решило только первую проблему. Во-вторых, компоненты CRISPR-системы и матрица для гомологичной рекомбинации должны быть доставлены в клетку. Одним из наиболее эффективных способов является электропорация, которая сама по себе провоцирует гибель клеток, а добавление в систему плазмидной ДНК ее только увеличивает. Компоненты системы CRISPR/Cas9 могут быть использованы в менее токсичном варианте – RNP комплексе (о чем было сказано выше). Тем не менее полностью отказаться от использования плазмидных векторов невозможно, так как это наиболее удобная, а порой и единственно возможная форма внесения матрицы для гомологичной рекомбинации. В-третьих, многие исследователи отмечают массовую гибель ЧИПСК после

проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9, вне зависимости было ли это введение генетического материала или же получение knock-out.

В связи с вышесказанным существует несколько работ, посвященных увеличению выживаемости ЧИПСК в ходе экспериментов по редактированию генома.

Белок BCL-XL поддерживает целостность внешней мембраны митохондрий и тем самым предотвращает высвобождение в цитоплазму клетки их содержимого, например цитохрома C, являющегося активатором апоптоза (Vander Heiden et al., 1997). Совместная электропорация гена *BCL-XL* с компонентами CRISPR/Cas9-системы и матрицей для гомологичной рекомбинации приводит к 10-кратному увеличению выживаемости ЧИПСК. Более того, эффективность HDR увеличивается в 20–100 раз, в зависимости от редактируемого локуса. Такой эффект был показан с использованием различных доноров для пяти локусов и на шести различных линиях ЧИПСК (Li et al., 2018).

Внесение множественных DSB в геном первичных клеток может приводить к их гибели, а для запуска гибели как ЧИПСК, так и чЭСК достаточно разрыва в единственном целевом локусе (Liu et al., 2014). Это может быть связано с тем, что плюрипотентные клетки близки клеткам раннего эмбриона, в которых должна работать жесткая селекция, направленная на поддержание целостности кариотипа (Dumitru et al., 2012; Liu et al., 2013). В запуске гибели ЧИПСК в ответ на внесение DSB участвует P53, а его knock-out приводит к существенному увеличению жизнеспособности ЧИПСК после применения к ним CRISPR/Cas9 технологии и к увеличению эффективности HDR в 19 раз для ЧИПСК и в 17 раз для чЭСК (Ihry et al., 2018).

Объединение редактирования и репрограммирования генома

Безусловно, с момента появления методы получения ЧИПСК так же, как методы редактирования генома, были существенно модифицированы и стали намного проще для исполнения. Тем не менее и получение пациент-специфичных ЧИПСК, и редактирование их генома крайне трудозатратны и требуют много времени, так как это должны быть два последовательных процесса. Идея сделать их параллельными впервые успешно была реализована S.E. Howden с коллегами (2016). Авторы одновременно электропорировали во взрослые фибробласты человека плазмиды, необходимые для репрограммирования, компоненты системы CRISPR/Cas9 и матрицу для гомологичной рекомбинации. Всего был получен 31 клон ЧИПСК, среди которых были клетки с целевой встройкой, дополнительными инделами и без генетических модификаций. Применение Cas9, «слитого» с фрагментом белка Geminin (см. выше), увеличивало выход ЧИПСК с knock-in в четыре раза. В дальнейшем эффективность такой стратегии была успешно подтверждена работами (Tidball et al., 2017; Wen et al., 2018), в том числе для получения ЧИПСК из мононуклеарных клеток периферической крови. Использование моноцитов, с медийской точки зрения, более выгодно, так как процедура получения фибробластов кожи более инвазивная, требует времени на получение первичной культуры, кроме того, в клетках кожи больше вероятность

накопления мутаций, вызванных действием окружающей среды, например ультрафиолетовым излучением (Zhang, 2013). При получении ЧИПСК с помощью эписомальных векторов 7–10 % клонов содержали целевую вставку, в зависимости от выбранного для проведения встройки локуса. Использование вектора, одновременно экспрессирующего *KLF4* и *Cas9*, увеличило эффективность целевой встройки в три раза, но вместе с тем несколько снижало эффективность репрограммирования. Попытки решить возникшую проблему не увенчались успехом, но было обнаружено, что большой Т-антиген вируса SV40 еще улучшал систему внесения knock-in. В результате удалось добиться 30–40 % выхода колоний ЧИПСК с правильной целевой встройкой (Wen et al., 2018). Таким образом, предложенная стратегия предлагает практически в два раза более быстрый, высокоточный и эффективный способ получения knock-in в ЧИПСК с одновременным получением изогенных контрольных линий.

Заключение

CRISPR/Cas9-система – недавно появившийся, но получивший поистине «народное» признание удобный и мощный инструмент для проведения сайт-специфичного редактирования генома. В комбинации с технологией получения ЧИПСК он предоставляет уникальные возможности для исследования функциональной значимости генов, механизмов развития заболеваний и генной коррекции. Как и всякая недавно появившаяся технология, редактирование генома при помощи CRISPR/Cas9-системы сталкивается со множеством требующих преодоления трудностей. Одной из них, безусловно, является крайне низкая эффективность работы этой системы в ЧИПСК. Большое количество всевозможных модификаций этого метода делает для исследователя непростым выбор наиболее подходящего способа для получения knock-in. В этом обзоре я сделала попытку свести воедино и структурировать наиболее важные, на мой взгляд, подходы, позволяющие повышать эффективность внесения целевых конструкций в геном ЧИПСК.

Acknowledgements

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016 “Cellular and molecular mechanisms controlling adaptive and pathological processes in humans and animals”.

Conflict of interest

The author declare no conflict of interest.

Список литературы / References

Редактирование генов и геномов. Отв. ред. С.М. Закиан, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, Е.А. Покушалов, В.В. Власов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018.
[Zakian S.M., Medvedev S.P., Dementieva E.V., Pokushalov E.A., Vlasov V.V. (Eds.) *Editing of Genes and Genomes*. Novosibirsk: SB RAS Publ., 2018. (in Russian)]
Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016; 20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175.
[Smirnov A.V., Yunusova A.M., Lukyanchikova V.A., Battulin N.R. CRISPR/Cas9, a universal tool for genomic engineering.

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):493-510. DOI 10.18699/VJ16.175. (in Russian)]
Anand R., Ranjha L., Cannavo E., Cejka P. Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. *Mol. Cell*. 2016;64:940-950.
Bothmer A., Phadke T., Barrera L.A., Margulies C.M., Lee C.S., Buquicchio F., Moss S., Abdulkherim H.S., Selleck W., Jayaram H., Myer V.E., Cotta-Ramusino C. Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nat. Commun.* 2017;8:13905. DOI 10.1038/ncomms13905.
Charpentier M., Khedher A.H.Y., Menoret S., Brion A., Lamribet K., Dardillac E., Boix C., Perrouault L., Tesson L., Geny S., De Cian A., Itier J.M., Anegon I., Lopez B., Giovannangeli C., Concordet J.P. CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1133. DOI 10.1038/s41467-018-03475-7.
Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T.N., Frodin M., Davis G.D. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat. Methods*. 2011;8(9):753-755. DOI 10.1038/nmeth.1653.
Chen X., Janssen J.M., Liu J., Maggio I., 't Jong A.E.J., Mikkers H.M.M., Gonçalves M.A.F.V. In trans paired nicking triggers seamless genome editing without double-stranded DNA cutting. *Nat. Commun.* 2017;8(1):657. DOI 10.1038/s41467-017-00687-1.
Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):543-548. DOI 10.1038/nbt.3198.
Dexheimer T. DNA repair pathways and mechanisms. Eds. L. Mathews, S. Cabarcas, E. Hurt. *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. Dordrecht: Springer, 2013;19-32.
Doyon Y., Choi V.M., Xia D.F., Vo T.D., Gregory P.D., Holmes M.C. Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption. *Nat. Meth.* 2010;7:459-460. DOI 10.1038/nmeth.1456.
Dumitru R., Gama V., Fagan B.M., Bower J.J., Swahari V., Pevny L.H., Deshmukh M. Human embryonic stem cells have constitutively active Bax at the Golgi and are primed to undergo rapid apoptosis. *Mol. Cell*. 2012;46(5):573-583. DOI 10.1016/j.molcel.2012.04.002.
Guo Q., Mintier G., Ma-Edmonds M., Storton D., Wang X., Xiao X., Kienzle B., Zhao D., Feder J.N. ‘Cold shock’ increases the frequency of homology directed repair gene editing in induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 2018;8(1):2080. DOI 10.1038/s41598-018-20358-5.
Haber J.E. DNA repair: the search for homology. *Bioessays*. 2018; 40(5):e1700229. DOI 10.1002/bies.201700229.
Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2010;44:113-139.
Howden S.E., McColl B., Glaser A., Vadolas J., Petrou S., Little M.H., Elefanti A.G., Stanley E.G. A Cas9 variant for efficient generation of indel-free Knockin or gene-corrected human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016;7(3):508-517. DOI 10.1016/j.stemcr.2016.07.001.
Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157:1262-1278. DOI 10.1016/j.cell.2014.05.010.
Ihry R.J., Worringer K.A., Salick M.R., Frias E., Ho D., Theriault K., Kommineni S., Chen J., Sondey M., Ye C., Randhawa R., Kulkarni T., Yang Z., McAllister G., Russ C., Reece-Hoyes J., Forrester W., Hoffman G.R., Dolmetsch R., Kaykas A. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* 2018; 24(7):939-946. DOI 10.1038/s41591-018-0050-6.
Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*. 2014;24:1012-1019. DOI 10.1101/gr.171322.113.
Li X.L., Li G.H., Fu J., Fu Y.W., Zhang L., Chen W., Arakaki C., Zhang J.P., Wen W., Zhao M., Chen W.V., Botimer G.D., Baylink D.,

- Aranda L., Choi H., Bechar R., Talbot P., Sun C.K., Cheng T., Zhang X.B. Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression. *Nucleic Acids Res.* 2018. DOI 10.1093/nar/gky804.
- Liang X., Potter J., Kumar S., Ravinder N., Chesnut J.D. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *J. Biotechnol.* 2017;241:136-146. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.11.011.
- Liang X., Potter J., Kumar S., Zou Y., Quintanilla R., Sridharan M., Carte J., Chen W., Roark N., Ranganathan S., Ravinder N., Chesnut J.D. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* 2015;208:44-53. DOI 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.
- Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife.* 2014;3:e04766. DOI 10.7554/eLife.04766.
- Liu J.C., Guan X., Ryan J.A., Rivera A.G., Mock C., Agrawal V., Leitai A., Lerou P.H., Lahav G. High mitochondrial priming sensitizes hESCs to DNA-damage-induced apoptosis. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4):483-491. DOI 10.1016/j.stem.2013.07.018.
- Liu J.C., Lerou P.H., Lahav G. Stem cells: balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends Cell. Biol.* 2014;24:268-274. DOI 10.1016/j.tcb.2014.03.002.
- Ma X., Chen X., Jin Y., Ge W., Wang W., Kong L., Ji J., Guo X., Huang J., Feng X.H., Fu J., Zhu S. Small molecules promote CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1303. DOI 10.1038/s41467-018-03760-5.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* 2015;33(5):538-542. DOI 10.1038/nbt.3190.
- Merkle F.T., Neuhauser W.M., Santos D., Valen E., Gagnon J.A., Maas K., Sandoe J., Schier A.F., Eggan K. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. *Cell Rep.* 2015;11:875-883. DOI 10.1016/j.celrep.2015.04.007.
- Nishitani H., Lygerou Z., Nishimoto T. Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. *J. Biol. Chem.* 2004;279(29):30807-30816. DOI 10.1074/jbc.M312644200.
- Niu X., He W., Song B., Ou Z., Fan D., Chen Y., Fan Y., Sun X. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in β -thalassemia-induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 2016;291(32):16576-16585. DOI 10.1074/jbc.M116.719237.
- Orlando S.J., Santiago Y., DeKaveler R.C., Freyvert Y., Boydston E.A., Moehle E.A., Choi V.M., Gopalan S.M., Lou J.F., Li J., Miller J.C., Holmes M.C., Gregory P.D., Urnov F.D., Cost G.J. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(15):e152. DOI 10.1093/nar/gkq512.
- Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(3):339-344. DOI 10.1038/nbt.3481.
- Rieder C.L., Cole R.W. Cold-shock and the Mammalian cell cycle. *Cell Cycle.* 2002;1(3):169-175.
- Riesenberg S., Maricic T. Targeting repair pathways with small molecules increases precise genome editing in pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2164. DOI 10.1038/s41467-018-04609-7.
- Shen B., Zhang W., Zhang J., Zhou J., Wang J., Chen L., Wang L., Hodgkins A., Iyer V., Huang X., Skarnes W.C. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods.* 2014;11(4):399-402. DOI 10.1038/nmeth.2857.
- Takayama K., Igai K., Hagihara Y., Hashimoto R., Hanawa M., Sakuma T., Tachibana M., Sakurai F., Yamamoto T., Mizuguchi H. Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(9):5198-5207. DOI 10.1093/nar/gkx130.
- Tidball A.M., Dang L.T., Glenn T.W., Kilbane E.G., Klarr D.J., Margolis J.L., Uhler M.D., Parent J.M. Rapid generation of human genetic loss-of-function iPSC lines by simultaneous reprogramming and gene editing. *Stem Cell Reports.* 2017;9(3):725-731. DOI 10.1016/j.stemcr.2017.07.003.
- Turan S., Farruggio A.P., Srifa W., Day J.W., Calos M.P. Precise correction of disease mutations in induced pluripotent stem cells derived from patients with limb girdle muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 2016;24(4):685-696. DOI 10.1038/mt.2016.40.
- Vander Heiden M.G., Chandel N.S., Williamson E.K., Schumacker P.T., Thompson C.B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell.* 1997;91(5):627-637.
- Wang B., Li K., Wang A., Reiser M., Saunders T., Lockey R.F., Wang J.W. Highly efficient CRISPR/HDR-mediated knock-in for mouse embryonic stem cells and zygotes. *Biotechniques.* 2015;59(4):201-202, 204, 206-208. DOI 10.2144/000114339.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J.B., Nishikawa S., Nishikawa S., Muguruma K., Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(6):681-686. DOI 10.1038/nbt1310.
- Wen W., Cheng X., Fu Y., Meng F., Zhang J.P., Zhang L., Li X.L., Yang Z., Xu J., Zhang F., Botimer G.D., Yuan W., Sun C., Cheng T., Zhang X.B. High-level precise knockin of iPSCs by simultaneous reprogramming and genome editing of human peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Reports.* 2018;10(6):1821-1834. DOI 10.1016/j.stemcr.2018.04.013.
- Yang D., Scavuzzo M.A., Chmielowiec J., Sharp R., Bajic A., Borowiak M. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci. Rep.* 2016;6:21264. DOI 10.1038/srep21264.
- Yu C., Liu Y., Ma T., Liu K., Xu S., Zhang Y., Liu H., La Russa M., Xie M., Ding S., Qi L.S. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2015;16(2):142-147. DOI 10.1016/j.stem.2015.01.003.
- Yumlu S., Stumm J., Bashir S., Dreyer A.K., Lisowski P., Danner E., Kühn R. Gene editing and clonal isolation of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9. *Methods.* 2017;121-122:29-44. DOI 10.1016/j.ymeth.2017.05.009.
- Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759-771. DOI 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- Zhang J.P., Li X.L., Li G.H., Chen W., Arakaki C., Botimer G.D., Baylink D., Zhang L., Wen W., Fu Y.W., Xu J., Chun N., Yuan W., Cheng T., Zhang X.B. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biol.* 2017;18(1):35. DOI 10.1186/s13059-017-1164-8.
- Zhang X.B. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2013;11(5):264-274. DOI 10.1016/j.gpb.2013.09.001. Epub 2013 Sep. 21.

ORCID ID

M.M. Gridina orcid.org/0000-0002-7972-5949