

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-285

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ПРИ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНТЕГРАЦИИ РЕПОРТЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ В ГЕНОМ КЛЕТОК ЯИЧНИКА КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА (CHO)**COMPARATIVE ANALYSIS OF PROMOTER ACTIVITY IN SITE-SPECIFICALLY INTEGRATED REPORTER CONSTRUCTS IN THE GENOME OF CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) CELLS**

А. Д. Шевченко, Е. Н. Андреева

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

A. D. Shevchenko, E. N. Andreyeva

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ a.shevchenko1@g.nsu.ru

Аннотация

При сайт-специфической интеграции целевой конструкции в геном необходимо подбирать промотор для достижения оптимального уровня экспрессии трансгена. Для локуса *LEKR1* в геноме клеток CHO-S проведено сравнение активности 7 промоторов методом проточной цитометрии. Промотор цитомегаловируса человека *CMV* оказался наиболее активным, а промоторы человека (*EF1a*) и китайского хомячка (*HSP90*, *CHEF1a*) — самыми стабильными при долговременном культивировании.

Abstract

A promoter selection is important for optimal level of transgene expression in site-specifically integrated reporter constructs in the genome. Using flow cytometry, we compared activity of 7 promoters in the *LEKR1* locus of the CHO-S cell genome. The human cytomegalovirus promoter *CMV* was found to be the most active, while the human (*EF1a*) and chinese hamster (*HSP90*, *CHEF1a*) promoters were the most stable during long-term cultivation.

Интеграция трансгена в геном клетки хозяина обеспечивает более стабильные и воспроизводимые титры рекомбинантных белков по сравнению с временной трансфекцией. При случайной интеграции трансгена в геном у эукариот наблюдается «эффект положения», при котором в зависимости от локального хроматинового окружения один и тот же трансген имеет разный уровень экспрессии репортерного гена. В последнее время получили развитие подходы, основанные на направленной интеграции трансгена в геном. Одной из стратегий для быстрого получения клеточных линий-продуцентов на основе клеток CHO является предварительный отбор стартовой клеточной линии с высокой и стабильной экспрессией трансгена, в которой может производиться сайт-специфическая замена кассеты с репортерным трансгеном на другие кассеты, кодирующие целевые рекомбинантные белки. При последующей сайт-специфической интеграции репортерных конструкций в такой сайт ожидается, что эффект положения не будет оказывать влияния на активность используемого промотора. Однако было показано, что и в предварительно охарактеризованных сайтах генома ряд популярных в биотехнологии промоторов может иметь низкий уровень активности [1]. В связи с этим необходим подбор оптимального промотора для каждого локуса.

Ранее участок генома в локусе *LEKR1* клеток CHO-S методом TRIP (*thousands of reporters integrated in parallel*) был идентифицирован как потенциально перспективный для интеграции трансгенов [2]. В настоящей работе при помощи CRISPR/Cas9 была получена стартовая клеточная линия, несущая 1 копию трансгена на клетку для последующей сайт-специфической интеграции в локус *LEKR1*. Целью работы является сравнение активности промоторов вирусов (*SV40E* и *CMV*), человека (*EF1a*) и китайского хомячка (*CHEF1a*, *PGK1*, *HSPA5* и *HSP90*) в локусе *LEKR1* генома клеток CHO-S. Нужно отметить, что промоторы *EF1a*, *CHEF1a*, *CMV*, *SV40E* широко используются в биотехнологии и обеспечивают высокие титры продукта, в то время как промоторы *HSPA5*, *HSP90* были недавно идентифицированы как способные поддерживать стабильные и высокие уровни экспрессии целевых конструкций [3, 4].

Первым этапом работы было сравнение активности выбранных промоторов вне геномного контекста при эписомальной экспрессии. Для этого клетки CHO-S были трансфицированы бивекторными плазмидными конструкциями, содержащими референсный репортер *CMV-mCherry* и целевой репортер *eGFP* под контролем тестируемых промоторов. Методом проточной цитометрии мы показали, что промоторы генов *HSPA5* и *HSP90*

имеют сходный уровень активности с такими сильными промоторами, как *EF1a* или *CHEF1a*, и в 3–4 раза превышают активность слабых промоторов *PGK1* и *SV40E* при эписомальной экспрессии.

Далее активность выбранных промоторов была нами оценена в геномном контексте, а именно при сайт-специфической интеграции конструкций с репортером *mCherry* при помощи сериновой рекомбиназы *Bxb1* (*Recombinase Mediated Cassette Exchange* (RMCE)) в геном клеток CHO-S. Уровни экспрессии репортерных конструкций оценивали при помощи проточной цитометрии. Было обнаружено, что в локусе *LEKR1* активность промотора *CMV* оказалась в 6–7 раз выше, чем у всех остальных протестированных нами промоторов. Промоторы *EF1a*, *CHEF1a*, *PGK1*, *HSPA5* и *HSP90* демонстрировали в геномном контексте сниженную активность по сравнению с эписомальной экспрессией относительно слабого промотора *PGK1*, что говорит о супрессирующем влиянии локального хроматина на экспрессию репортера *mCherry* под контролем этих промоторов в локусе *LEKR1*. Кроме того, оказалось, что при долговременном культивировании промоторы *HSP90*, *EF1a*, *CHEF1a* сохраняют не менее 90 % активности и являются наиболее стабильными в локусе *LEKR1*, в то время как промотор *CMV* снижал уровень активности до 60 % от исходной.

Литература

1. Pristovsek N. et al. Systematic evaluation of site-specific recombinant gene expression for programmable mammalian cell engineering // *ACS Synthetic Biol.* 2019. Vol. 8, No. 4. P. 758–774.
2. Яринич Л. А. и др. Анализ транскрипционной активности модельных piggyBac-трансгенов, стабильно интегрированных в разные локусы генома культивируемых клеток CHO при отсутствии селекционного давления // *Вавилов. журн. генетики и селекции.* 2023. Т. 27, № 7. С. 906–915.
3. Tanemura H. et al. Development of a stable antibody production system utilizing an Hspa5 promoter in CHO cells // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12, No. 1. P. 7239.
4. Nguyen L. N. et al. Novel promoters derived from Chinese hamster ovary cells via in silico and in vitro analysis // *Biotechnol. J.* 2019. Vol. 14, No. 11. P. 1900125.