

## **Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия**

УДК 573.6

### **Модификация системы, основанной на применении маркеров селекции и сортирования, для отбора стабильных трансфектантов**

© 2018 И.Г. ВОРОБЬЕВА<sup>1,\*</sup>, Р.Р. ШУКУРОВ<sup>2</sup>, Д.Г. КОЗЛОВ<sup>3</sup>, Т.Б. КОРЯГИНА<sup>1</sup>, Н.В. АНТИПОВА<sup>1</sup>, В.Н. СТЕПАНЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997

<sup>2</sup>ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Москва, 127006

<sup>3</sup>ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545

e-mail: iva1647@yandex.ru\*

Поступила 04.12.2017 г.

Принята в печать 01.03.2018 г.

Технология r-hook, основанная на экспрессии белковых доменов на поверхности клеток, модифицирована и использована для селекции и эффективного высокочувствительного сортирования стабильно трансфицированных CHO-S-клеток. Целевым продуцируемым белком и одновременно белком, маркирующим экспрессию, в работе служил модельный белок EYFP. Созданы химерные белки TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, которые обуславливают способность продуцирующих их клеток связываться с носителями – титаном и целлюлозной подложкой. В результате комбинированной селекции при помощи химерного белка CBD-PDGFR, экспонированного на клеточной мембране, была получена серия клональных линий с высоким и стабильным синтезом модельного белка. У трех клонов из отобранной серии уровень экспрессии гена модельного белка, детектируемый по флуоресценции, более чем в 30 раз превосходил среднее значение для исходного пула. Стабильность экспрессии EYFP-положительных клонов сохранялась на поздних (20-й и 35-й) пассажах культуры. Применение созданного химерного CBD-PDGFR-маркера селекции и сортирования приводит к быстрому отбору высокопродуктивных стабильных трансфектантов, что снижает затраты на получение коллекции продуктивных клеточных линий.

*Ключевые слова:* адгезия, клетки CHO, селекция, сортирование, титан-связывающий домен, целлюлозо-связывающий домен, экспрессия, экспонированные химерные белки.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-9-17

Для производства полноразмерных рекомбинантных белков применяют клеточные линии высших эукариот. К преимуществам продуцентов, полученных на их основе, обычно относят не только качество производимого белка (корректный фолдинг и гликозилирование), но также высокую продуктивность и более простой способ

очистки продукта благодаря его секреции в культуральную среду [1, 2]. В то же время, получение продуцентов на платформах высших эукариот связано с большими издержками, чем на базе бактерий и дрожжей, из-за дорогих расходных материалов и оборудования, а также более высоких временных затрат и трудоемкости процесса.

*Список сокращений:* MCC – маркеры селекции и сортирования; пн – пар нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; BSA – бычий сывороточный альбумин; CBD – целлюлозосвязывающий домен; CHO – клетки яичников китайского хомячка; DHFR – дигидрофолатредуктаза; EYFP – усиленный желтый флуоресцентный белок; FACS – сортировка клеток с активированной флуоресценцией; GS – глутаматсинтетаза; PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) – рецептор тромбоцитарного фактора роста; TiBP – металл(титан)-связывающий домен.

Для получения рекомбинантных белков с помощью линий клеток СНО (гСНО) используют векторные системы, способные осуществлять интеграцию интересующего гена в случайном месте генома, и маркеры селекции, такие как устойчивость к антибиотикам (генетицину, пурамицину). При этом высокопроизводительные трансфектанты отбирают путем иммунохимического скрининга, поскольку они не имеют фенотипических отличий или селективных преимуществ перед трансфицированными клетками с низкой экспрессией трансгена [3].

Для повышения эффективности отбора высокопродуктивных трансфектантов применяют маркеры селекции и сортировки (МСС), которые обеспечивают повышенную скорость роста искомым трансфектантов или экспрессию какого-то иного фенотипического признака, поддающегося дифференцированной оценке и отбору.

К полноценным МСС первого типа относятся гены *DHFR* или *GS*, уровень экспрессии которых влияет на выживание и скорость роста трансфектантов. К недостаткам использования этих генов следует отнести ограниченный круг доступных для манипуляций клеточных линий и снижение стабильности и производительности штамма в ряду поколений, пропорциональное раунду амплификации и концентрации селективного маркера [3, 4].

Простейшим маркером сортировки является ген *GFP*, использование которого в сочетании с технологией FACS позволяет осуществлять отбор высокопродуктивных трансфектантов по интенсивности их флюоресценции [5, 6]. Несомненным достоинством технологии является возможность ее применения для любых клеточных линий, в том числе и неадаптированных к сортировке (в отличие от линий *gs<sup>-</sup>* или *dhfr<sup>-</sup>*). Однако ген *GFP* невозможно использовать в качестве полноценного МСС, обеспечивающего как селекцию, так и отбор продуцентов рекомбинантных белков: возникает необходимость применения дополнительного селективного маркера, обеспечивающего, например, устойчивость к антибиотику [7, 8].

К МСС второго типа следует отнести экспонируемые на поверхности клеток белковые домены, полученные с помощью технологии клеточного дисплея и наделяющие трансфицированные клетки способностью к адгезии на каком-либо носителе [9–15]. Не вмешиваясь в клеточный метаболизм, данная технология является потенциально пригодной для применения при отборе

линий различных клеток, в частности, имеющих самый высокий уровень экспрессии интересующих рекомбинантных генов [9, 10].

Одна из первых технологий применения МСС данного типа включала метод *p-hook* – технику селекции, основанную на усиленной адгезии, при которой экспонированные на мембране белки связываются с поверхностью сорбента [9]. Якорем для таких белков была часть рецептора PDGFR, а «молекулярным крючком» – часть антитела, которая была экспонирована на мембране и могла связываться с различными носителями. При этом экспрессию гена целевого белка контролировали по коэкспрессии гена бета-галактозидазы. Было зафиксировано обогащение транзитного пула клетками, экспрессирующими трансген. Однако, как показал опыт, основным недостатком данной технологии является низкий уровень дифференцированности высоко- и низкопродуктивных клонов. По сути, метод *p-hook* в том виде, как он реализован, представляет собой технику селекции, но не сортировки, обеспечивая лишь новый способ отбора случайных трансфектантов.

Другим недостатком технологии *p-hook* является ее относительно слабая защищенность от непродуктивной селекции линий, обладающих высоким фоновым уровнем адгезии к носителю. Для эффективного избавления от фона возникает необходимость многократного повторения раундов селекции, не связанных с сортировкой, по уровню экспрессии трансгена, что увеличивает время, но не качество селекции.

Целью настоящей работы были модификация метода *p-hook* и превращение его в полноценную технологию селекции и сортировки стабильно трансфицированных СНО-S клеток за счет коэкспрессии генов экспонированных на их поверхности целлюлозосвязывающего или титан-связывающего доменов. Также изучалась возможность подавлять с помощью данной технологии развитие клеточных линий, являющихся продуктами ложной фоновой селекции.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Конструирование гена *EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR*

Указанный ген конструировали в векторе pUC57 на основе вектора pCI-neo (Promega, США). На первом этапе была синтезирована («Синтол», Россия) конструкция *iggTiBP+mucPDGFR* во временном транспортном векторе pUC57. Векторы pUC57-*iggHA+mucPDGFR* (реципиент)

и pEYFP (Clontech, США) (донор) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bg/II/BsrGI* (использовали эндонуклеазы и ферменты нуклеинового обмена производства Fermentas (Литва)). После выделения продуктов рестрикции в 1%-ном агарозном геле (камера для горизонтального электрофореза SE-2, Helicon, Россия) участок размером 800 пн, содержащий ген *EYFP*, лигировали с соответствующими компонентами для получения конструкции pUC57-EYFP-iggHA+mucPDGFR. Из этой конструкции по сайтам для *Xba/Not* вырезали фрагмент EYFP-iggHATiBP-mucPDGFR и переносили его в вектор pCI-neo. ПЦР-продукт гена IRES (IRES FMDV из вектора pVITROneo (InvivoGen, США)) вырезали по сайтам *Nhe/EcoRV* и получали путем лигирования готовую конструкцию гена *EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR*.

#### **Конструирование гена *EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR***

Ген *EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR* получали на основе ранее созданного вектора pCI-EYFP-IRES-iggHATiBP-mucPDGFR. ПЦР-продукт гена *CBD* (ген синтезирован в фирме «Синтол», Россия) в векторе pUC57 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SacII* и *XhoI*, разделяли продукты рестрикции в агарозном геле, вырезали участок размером 460 пн, содержащий ген *CBD* и лигировали его с целью получения готовой конструкции, гена *EYFP-IRES-iggHATiBP-CBD-mucPDGFR*. Правильность сборки экспрессионного вектора проверяли с помощью расширенного рестрикционного анализа. Нуклеотидные последовательности обоих генов и прилегающих к ним участков были подтверждены секвенированием (Evrogen, Россия).

#### **Культивирование клеточной линии CHO-S**

Клетки CHO-S (Invitrogen, США) выращивали в колбах Эрленмейера объемом 125 и 250 мл на качалке-СО<sub>2</sub>-инкубаторе Multitron Cell (Infors HT, Швейцария) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37 °С и влажности 95%. Использовали бессывороточную питательную среду Power CHO-2 CD (Lonza, Швейцария) с добавлением 4 мМ аланил-глутамин, 16 мкМ тимидина и 0,1 мМ гипоксантина (реагенты производства Invitrogen). Клетки пересеивали на свежую среду каждые 2–3 дня и растили до плотности 0,3·10<sup>6</sup> кл/мл. Подсчет числа клеток и анализ их жизнеспособности осуществляли после окраши-

вания трипановым синим (Panreac, Испания) в камере Горяева с помощью микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония).

#### **Трансфекция клеточной линии CHO-S**

Процедуру проводили, используя липофильный агент FreeStyle MAX (Invitrogen) согласно инструкции производителя. Культуру клеток CHO-S за сутки до трансфекции выращивали до плотности 0,5·10<sup>6</sup> кл/мл. В день трансфекции определяли оптическую плотность культуры и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли декантацией, клетки ресуспендировали в среде FreeStyle™ CHO Expression Medium (Invitrogen), содержащей 8 мМ аланил-глутамин (Invitrogen) до конечной плотности 1,0·10<sup>6</sup> кл/мл. Далее проводили трансфекцию в 6-луночных планшетах, согласно инструкции производителя (FreeStyle CHO-S Cells, Invitrogen, Cat. # R800-07).

#### **Манипуляции с трансфицированным пулом**

Два типа векторов, содержащих Ti-связывающий домен с CBD (CBD-EYFP+) и без него (TiBP-EYFP+), использовали для трансфекции клеток CHO-S в среде CD-CHO (Invitrogen). После этого клетки осаждали центрифугированием, удаляли использованную для трансфекции среду CD-CHO, ресуспендировали в свежей бессывороточной среде Power-CHO (Lonza) и оставляли еще на 4 ч. Адгезию трансфицированных клеток на носителях фиксировали через 12–16 ч после внесения модифицированной ДНК. Для сорбции клеток использовали целлюлозные волокна (стерилизованная фильтровальная бумага (Plf-roll, Россия) размером 4×8 мм) или кольца из титана диаметром 1 см; носитель помещали в лунку со свежей средой Power-CHO, в которую вносили и клетки трансфицированного пула. Так как целевым и одновременно маркерным экспрессируемым геном в работе был ген белка EYFP, после переноса на свежую среду, подсчитывали флуоресцирующие клетки в суспензии и на носителе (см. ниже), что служило показателем их сорбции.

#### **Проточная цитометрия**

Интенсивность флуоресценции оценивали на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (Германия). Параметры измерения были следующие: длина волны 488 нм, эмиссия 500 нм, количество событий 10 000. Результаты рассчитывали с помощью программы FlowJo 10.0.Br1. Автофлуоресценцию измеряли у исходной

нетрансфицированной культуры, находящейся на той же стадии роста. Полученные значения вычитали как фоновые из флуоресценции EYFP-положительных пулов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы экспонировать на поверхности клеточной мембраны участки белков, которые могут связываться с носителем – целлюлозой или металлом [16, 17] – были сконструированы химерные гены. Они состояли из последовательности, кодирующей целлюлозосвязывающий и/или металл-связывающий домен, слитый с последовательностью трансмембранного фрагмента белка PDGFR и тег-последовательностью *Мус*. Целевая структура гена EYFP была соединена через IRES-элемент с синтетическим геном и служила маркером коэкспрессии целевого и маркерного белка. В табл. 1 приведены данные о механизме адсорбции клеток на носителях с помощью указанных химерных белков.

Часть *Мус*-тега между трансмембранным доменом и участком связывания с носителем была добавлена в последовательность *CBD-PDGFR* векторной конструкции для повышения контрастности системы отбора и усиления различия между трансфектантами и нетрансформированными клетками. Связывающий домен находился на удаленном от мембраны расстоянии. Клетки с более активной экспрессией данной конструкции получали дополнительное преимущество при сорбции из-за того, что в этом случае с сорбентом взаимодействовал более длинный химерный белок, экспонированный на тех частях мембраны, кото-

рые не касаются непосредственно носителя. Исследовали адгезию на металлической поверхности пула клеток, экспрессирующих конструкцию (TiBP-EYFP+) – (металл-связывающая последовательность), описанную в литературе как *TiBP* [17], и использующих ее в качестве связывающего домена.

### Экспрессия EYFP в транзитивно трансфицированных клетках

Первоначально способность сорбции на носителе была исследована у клеток, содержащих генную конструкцию, в которой трансмембранный участок белка PDGFR был непосредственно слит с CBD. В этом эксперименте при эффективности трансфекции 10–45% визуально не наблюдали различия в экспрессии между экспериментальными конструкциями CBD-EYFP+ и контрольными EYFP+. Клетки, несущие CBD-содержащую конструкцию сорбировались на носителе лучше, чем клетки исходного штамма CHO-S: на целлюлозных волокнах наблюдали сорбцию трансфектантов, содержащих целевые конструкции CBD-EYFP+, но не контрольных EYFP+ (светящиеся клетки на фрагменте носителя отсутствовали) (рис. 1). Полученные данные предварительно указывали на возможность проводить селекцию при помощи маркера, содержащего CBD-домен.

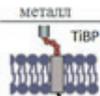
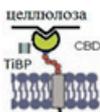
### Сорбция клеток на титановых кольцах

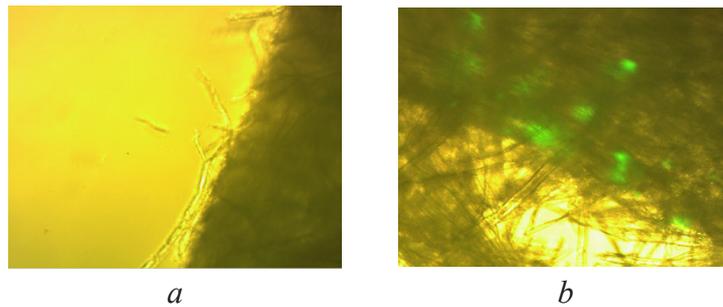
Из использованных в данной работе конструкций только одна металл-связывающая последовательность (TiBP-EYFP+) обуславливала адгезию клеток на металле. Как видно из рис. 2b, селективная сорбция клеток, содержащих данную

Таблица 1

#### Схема действия химерных белков, закрепленных на мембране при помощи PDGFR-домена и связывающихся с разными типами носителя

Scheme of activity of chimerical proteins anchored on membrane using PDGFR domain and binding to various carrier types

Обозначение конструкции	Последовательность элементов конструкции	Схема действия	Адгезия на носителе
TiBP-EYFP+	CMVpr_EYFP_IRES_iggTiBP_PDGFR_polyA		Металлы, TiO <sub>2</sub> , Si
CBD-EYFP+	CMVpr_EYFP_IRES_iggTiBP_CBD_PDGFR_polyA		Целлюлоза

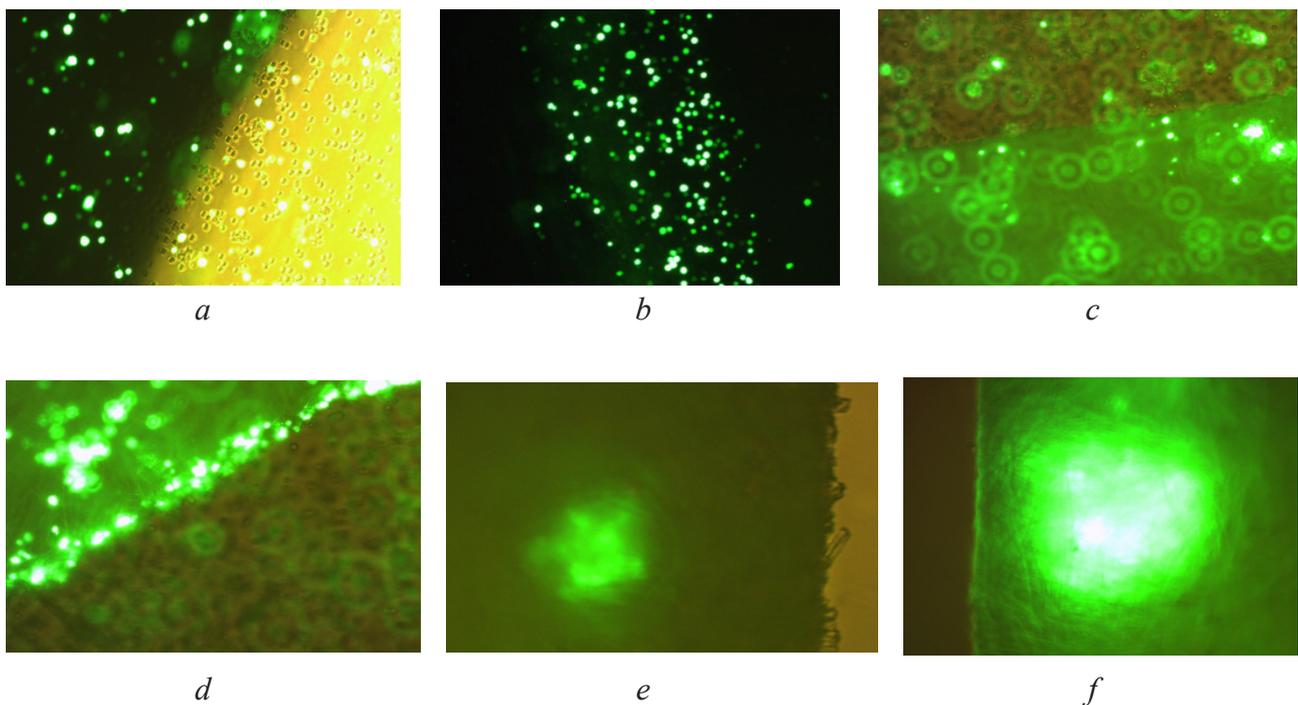


**Рис.1.** Сорбция клеток CHO-S, трансфицированных вектором EYFP+ (a) или CBD-EYFP+ (b), на целлюлозной подложке

**Fig. 1.** Adsorption of CHO-S cells transfected by EYFP+ (a) or CBD-EYFP+ (b) vector on cellulosic support

конструкцию, значительно отличалась от сорбции контрольных фоновых образцов (см. рис. 2a). Такое различие наблюдали при использовании только тех конструкций химерного белка, в которых металлсвязывающий элемент располагается в непосредственной близости к анкеру PDGFR, но не в случае, когда эти две кодирующие последовательности разделены CBD-доменом (см. табл.1).

Ни перенос титановых колец с сорбированными клетками в свежую среду, ни декантирование несвязанной клеточной суспензии не позволили обогатить пул трансфектантами; заметных и воспроизводимых изменений количества трансфицированных вектором TiBP-EYFP+ клеток с высокой по сравнению с исходным пулом экспрессией не наблюдали и при нескольких последующих



**Рис. 2.** Сорбция трансфицированных CHO-S клеток на металле и целлюлозной подложке: a – часть титанового кольца (более темное окрашивание), помещенного в суспензию клеток, трансфицированных p-EYFP; b – часть титанового кольца, помещенного в пул TiBP-EYFP+ клеток; c – клетки, трансфицированные вектором EYFP и край целлюлозной подложки (более светлое окрашивание); d – край целлюлозной подложки, помещенной в пул CBD-EYFP+ клеток; e и f – колонии выросшие на целлюлозной подложке в пуле CBD-EYFP+ клеток в присутствии генетицина (600 мкг/мл)

**Fig. 2.** Adsorption of CHO-S transfected cells on metal and cellulosic support: (a), part of titanium ring (darker color) plunged in suspension of p-EYFP-transfected cells; (b), part of titanium ring plunged in suspension of TiBP-EYFP-transfected cells; (c), cells transfected by EYFP vector and edge of cellulosic support (lighter color); (d), edge of cellulosic support plunged in CBD-EYFP+ pool; (e) and (f), colonies grown on cellulosic support in CBD-EYFP+ pool in the presence of geneticin (600 µg/mL)

повторах процедуры декантации несвязанной клеточной суспензии. На 2-е сутки инкубации разница в связывании клеток с высокой экспрессией трансгена и нетрансфицированных клеток уже визуально не регистрировалась. Это могло быть результатом активной экспрессии кадгеринов при высоком клеточном титре на бессывороточной среде [18], а следовательно, усиления фоновой неспецифической сорбции. Адгезию могли также нивелировать глобулярные белки, высвобождаемые пулом в среду [16].

### Сорбция клеток на целлюлозной подложке

Сильное устойчивое связывание трансфицированных клеток с волокнами целлюлозы обнаруживалось в случае, если трансфицирующая конструкция содержала CBD (рис. 2*c* и 2*d*). После переноса носителя с адсорбированными клетками в свежую среду большая часть связанных клеток, или 15–30% от общего количества клеток, использованных для трансфекции, оставалась на носителе. Этот показатель был сравним с показателем эффективности трансфекции, который составлял обычно 10–40%. Разница в количестве трансфицированных клеток между исходным пулом и пулом клеток, связанных с подложкой, сохранялась даже после того, как трансфицированные клетки элиминировали трансгенный вектор и переставали продуцировать флуоресцентный белок, что также можно было наблюдать при микроскопировании (данные не приведены).

Сложность в изучении селекции с использованием волокон целлюлозы обнаруживалась при переносе носителя с клетками на свежую среду, поскольку на носителе осаждались не только клетки EYFP+, но также и некоторая часть нетрансформированных клеток, обладавших, по-видимому, повышенной способностью к адгезии (табл. 2). Пул клеток, адсорбированных на носителе, при

культивировании в течение двух недель обогащался стабильными трансфектантами, однако соотношение клеток дикого типа и модифицированных было ниже, чем в исходном транзитном пуле.

Специфичность отбора удалось кардинально улучшить в результате увеличения концентрации генетина в среде до 600 мкг/мл и за счет более жесткого 3-кратного промывания носителя перед переносом на свежую ростовую среду один раз в 2–3 дня (см. рис. 2*e* и 2*f*).

Было проведено шесть серий трансфекций, в результате которых получено не менее  $500 \cdot 10^3$  трансфицированных клеток в 2 мл клеточной суспензии с одной целлюлозной подложкой как сорбентом. В каждом случае на целлюлозной подложке отбиралось от одной до пяти светящихся колоний (см. рис. 2*e* и 2*f*), которые были использованы для дальнейшего изучения.

Как уже говорилось, колонии, отобранные на носителе в присутствии повышенного содержания генетина, продолжали расти и демонстрировали стабильную высокую экспрессию белка EYFP. Дальнейшие эксперименты показали, что при переносе в среду, не содержащую антибиотик, клетки этих колоний сохраняли способность к росту в суспензии. Полученные линии не демонстрировали предпочтительного роста по внутренней поверхности флакона или агрегации, а плотность клеток в суспензии при культивировании оставалась на уровне исходного штамма CHO-S. В то же время, анализ флуоресценции отобранных культур показал, что это стабильные трансфектанты, т.е. клоны, не расщепляющиеся по косвенному для адгезии признаку – экспрессии белка EYFP.

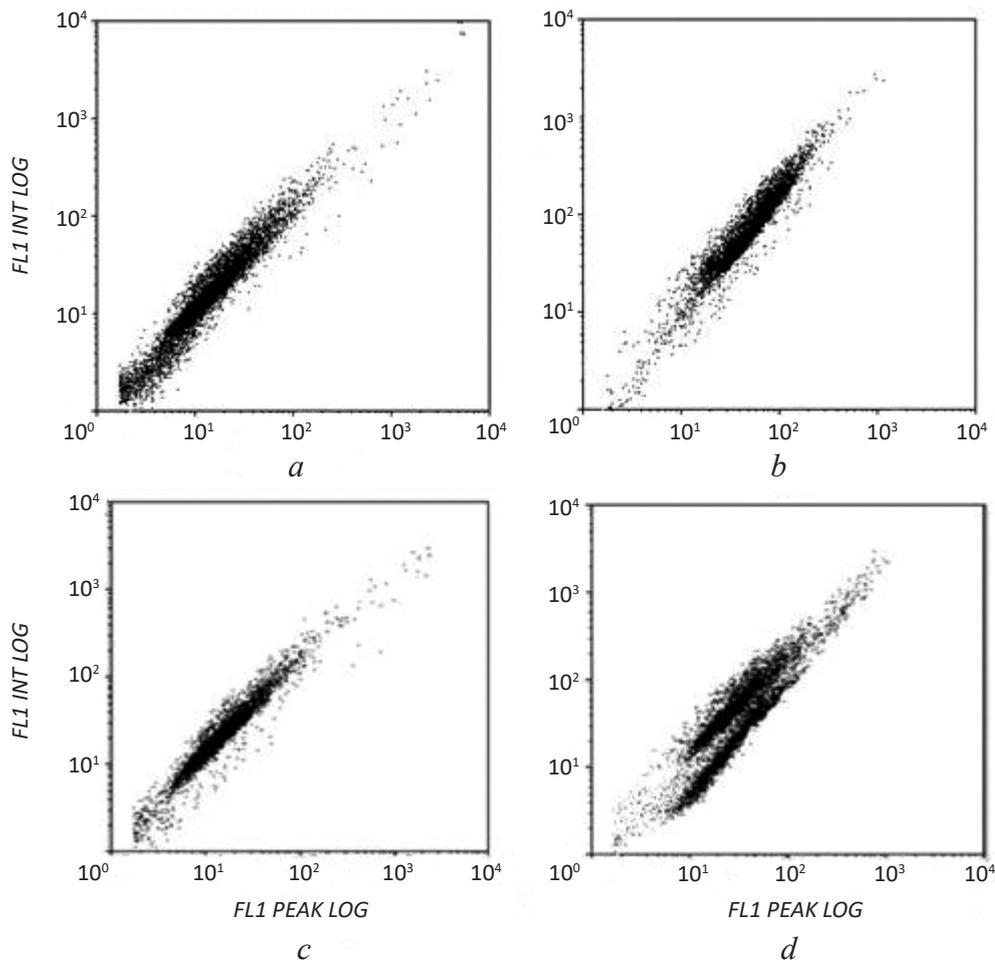
Для характеристики уровня экспрессии модельного белка в отобранных клонах, а также для оценки их гетерогенности и стабильности клоны изолировали, снимали с подложки и затем

Таблица 2

### Уменьшение доли флуоресцирующих клеток в трансфицированном и контрольном пулах CHO-S при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду

#### Reducing of percentage of fluorescent cells in CHO-S transfected and control pools before and after transfer of immobilized cells to fresh medium

Трансфицирующая конструкция	До переноса		После переноса	
	Плотность суспензии, $\cdot 10^6$ кл/мл	% светящихся клеток от общего числа жизнеспособных	Плотность суспензии, $\cdot 10^6$ кл/мл	% светящихся клеток от общего числа жизнеспособных
Контроль (EYFP+)	2,20	12,2%	2,20	14,30%
CBD-PDGFR+	1,20	9,1%	1,32	4,16%
TiBP-EYFP+	1,98	9,5%	2,31	4,30%



**Рис. 3.** Характеристика стабильно трансфицированных, закрепленных на целлюлозной подложке клеточных линий с помощью проточной цитометрии: *a* – интенсивность флуоресценции у исходного трансфицированного пула; *b* – у клона с наибольшей интенсивностью флуоресценции; *c*, *d* – у однородной и неоднородной клеточной суспензии со средней интенсивностью свечения, соответственно

**Fig. 3.** Fluorescent intensity detected by flow cytometry in stably transfected and adsorbed on cellulosic support cell lines: (*a*), original transfected pool; (*b*), clone with highest fluorescent intensity; (*c*) and (*d*), homogenous and heterogeneous cell suspensions with medium fluorescence intensity, respectively

подвергли суспензионному культивированию. В процессе выращивания, на 20-м и 35-м пассажах, в клеточных культурах измеряли интенсивность флуоресценции с помощью проточной цитометрии (рис. 3). В качестве контроля и для нормирования экспрессии белка гена *EGFP* использовали пул клеток на четвертый день после трансфекции. Некоторые клоны показывали существенную гетерогенность, что хорошо иллюстрируется полученными изображениями (см. рис. 3*b*, 3*c*). Гетерогенность моноклональных линий СНО-ЕУФР соответствует литературным данным [19]: на рис. 3*d* показана единственная в коллекции неоднородная популяция, обнаруженная путем цитометрии.

Таким образом, модифицированная и использованная нами технология представляет собой комбинацию селекции на носителе, дифференци-

рованного отбора клеток с помощью оценки инструментальными методами коэкспрессирующего гена белка и методов отбора клонов.

С помощью этой технологии, в частности комбинированной селекции по связыванию с целлюлозной подложкой и устойчивости к повышенным концентрациям генетина, из  $500 \cdot 10^3$  получивших трансген трансфектантов были получены клеточные линии со стабильной в течение 20–35 пассажей и высокой экспрессией модельного белка, которая более чем в 30 раз превосходила соответствующее среднее для исходного пула значение (данные цитометрии на 35-м пассаже). Модифицированный метод р-hook позволил изолировать генетически измененные клетки на основе сильного и специфичного взаимодействия между целлюлозой и экспонированным на мембране химерным белком. Трансфицированные

клетки могли быть отобраны уже через 10–15 сут после трансфекции. Жесткие условия отбора не влияли на жизнеспособность полученных клеточных линий, не оказывая токсического эффекта на их пролиферацию. При использовании описанной селективной системы возможен эффективный отбор стабильных по экспрессии целевого белка клеточных линий, метаболизм которых претерпел минимальные изменения по сравнению с исходным штаммом. Стабильность клеточных линий усиливается за счет селекции в популяции генетически стабильных трансфектантов и самоуничтожения тех колоний, которые расщепляются при нестабильной экспрессии (показателем такого самоуничтожения является уменьшение числа колоний при культивировании и вымывание некоторых из них с носителя).

## ЛИТЕРАТУРА

- Noh S. M., Sathyamurthy M., and Lee G. M. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2013, 2(4), 391–397. doi: 10.1016/j.coche.2013.08.002
- Wurm F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 1393–1398. doi: 10.1038/nbt1026
- Kim S. J., Kim N. S., Ryu C. J., et al. Characterization of chimeric anti-body producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 58, 73–84. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980405)58:1<73::AID-BIT8>3.0.CO;2-R
- Kim N.S., Kim S.J., and Lee G.M. Clonal variability within dihydrofolate reductase-mediated gene amplified Chinese hamster ovary cells: stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 20, 60(6), 679–688. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19981220)60:6<679::AID-BIT5>3.0.CO;2-Q
- Yoshikawa T., Nakanishi F., Ogura Y., et al. Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74, 435–442. doi: 10.1002/bit.1134
- Yeyati P.L., Agmon V., Fillat C., et al. Fluorescence-based selection of retrovirally transduced cells in the absence of a marker gene: direct selection of transduced type B Niemann-Pick disease cells and evidence for bystander correction. *Hum. Gene Ther.*, 1995, 6, 975–983. doi: 10.1089/hum.1995.6.8-975
- Beausejour C.M., Eliopoulos N., Momparler L., et al. Selection of drug-resistant transduced cells with cytosine nucleoside analogs using the human cytidine deaminase gene. *Cancer Gene Ther.*, 2001, 8, 669–676. doi: 10.1038/sj.cgt.7700358
- Wei K., Huber B.E. Cytosine deaminase gene as a positive selection marker. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 3812–3816. doi: 10.1074/jbc.271.7.3812
- Chesnut, J.D., Baytan, A.R., Russell, M., et al. Selective isolation of transiently transfected cells from a mammalian cell population with vectors expressing a membrane anchored single-chain antibody. *J. Immunol. Methods.*, 1996, 193, 17–27. doi: 10.1016/0022-1759(96)00032-4
- Cheng T.L., Roffler S. Membrane-tethered proteins for basic research, imaging, and therapy. *Med. Res. Rev.*, 2008, 28(6), 885–928. doi: 10.1002/med.20127
- Gotoh H., Matsumoto Y. Cell-surface streptavidin fusion protein for rapid selection of transfected mammalian cells. *Gene*. 2007, 389, 146–153. doi: 10.1016/j.gene.2006.10.019
- David R., Groebner M., Franz W.M. Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker. *Stem. Cells.*, 2005, 23, 477–482. doi: 10.1634/stemcells.2004-0177
- Kawahara M., Kimura H., Ueda H., and Nagamune T. Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 315, 132–138. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.030
- Kawahara M., Ueda H., Morita S., et al. Bypassing antibiotic selection: positive screening of genetically modified cells with an antigen-dependent proliferation switch. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, e32. doi: 10.1093/nar/gng032
- Kawahara M., Ueda H., Tsumoto K., et al. Selection of highly productive mammalian cells based on an inducible growth advantage using an antibody/receptor chimera. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, 93, 399–404. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80074-3
- Guillaume V., Thomas B., Aneta J. M., et al. Enhanced Cellular Adhesion on Titanium by Silk Functionalized with titanium binding and RGD pep-tides. *Acta Biomater.*, 2013, 9(1), 4935–4943. doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.003
- Wernérus H., Lehtio J., Teeri T., et al. Generation of Metal-Binding Staphylococci through Surface Display of Combinatorially Engineered Cellulose-Binding Domains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(10), 4678–4684. doi: 10.1128/AEM.67.10.4678-4684.2001
- Tabdili H., Barry A.K., and Langer M.D. Cadherin point mutations alter cell sorting and modulate GTPase signaling. *J. Cell Sci.*, 2012, 15, 125(14), 3299–3309. doi: 10.1242/jcs.087395
- Pilbrough W., Munro T.P., and Gray P. Intracolonial protein expression heterogeneity in recombinant CHO Cells. *PLoS One*. 2009, 4(12), e8432. doi: 10.1371/journal.pone.0008432

## Modification of a System Based on the Use of Markers of Selection and Sorting for Screening of Stable Transfectants

I.G. VOROBYOVA<sup>1,\*</sup>, R.R. SHUKUROV<sup>2</sup>, D.G. KOZLOV<sup>3</sup>, T.B. KORYAGINA<sup>1</sup>, N.V. ANTIPOVA<sup>1</sup>, and V.N. STEPANENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Shemyakin-and- Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russ. Acad. Sci., 117997, Moscow Russia

<sup>2</sup>The International Biotechnology Center "Generium" (LLC IBC Generium), 127006, Moscow Russia

<sup>3</sup>The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center "Kurchatov Institute", 117545, Moscow Russia

e-mail: iva1647@yandex.ru\*

Received December 4, 2017

Accepted March 1, 2018

**Abstract** – A p-hook technique based on the expression of protein domains on the cell surface has been modified and used for the selection and effective high-sensitive sorting of stably transfected CHO-S cells. A model EYFP protein served as a target produced protein and also as an expression-marking protein. Chimerical proteins TiBP-PDGFR and CBD-PDGFR that provided a capacity of binding to carriers, titanium and cellulosic support, were constructed. As a result of the combined selection with the use of the chimerical CBD-PDGFR protein that is exposed on the membrane a series of clonal lines with high and stable production of the model protein was obtained. The level of the model protein gene expression in three clones from the screened series exceeded by more than 30 times the mean level for the original cell pool. The stability of the expression was retained in the culture at the late (20<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup>) passages. The use of the constructed chimerical CBD-PDGFR marker of selection and sorting permits to rapidly screen high-productive and stable transfectants, which reduces the cost of creating a collection of efficient cell lines.

*Key words:* adhesion, CHO cells, selection, sorting, titanium-binding domain, cellulose-binding domain, expression, exposed chimerical proteins.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-9-17