

Нокаут гена CCR5 в клетках человека при помощи системы редактирования генома CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Дашинимаев Эрдэм Баирович

Гольцова Александра Сергеевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: agatusha@gmail.com

Одним из ко-рецепторов связывания вируса иммунодефицита человека с целевой иммунной клеткой является трансмембранный белок CCR5 (С-С рецептор хемокина 5). Существует и описана популяция людей с мутацией *CCR5-Δ32*, заключающейся в делеции 32-х нуклеотидов в последовательности гена, кодирующего CCR5 и приводящая к сдвигу рамки считывания. Данная мутация в гетерозиготном состоянии значительно снижает риск инфицирования ВИЧ, в гомозиготном - заражение становится практически невозможным. Учитывая последние успехи биомедицины и молекулярной биологии в области систем редактирования генома, становятся актуальными исследования по разработке методов нокаута данного гена в различных клетках человека.

Целью данной работы является отработка метода нокаута гена CCR5 в клетках человека при помощи системы CRISPR/Cas9. Работа проводилась на линиях клеток МТ-4 (Т-клеточная лимфома) и 1608-hT (иммортиализованные фибробласты кожи). В клетки трансфецировали генетические конструкции, кодирующие нуклеазу Cas9 и гидовую РНК против участка гена CCR5. Конструкции также содержали элементы, кодирующие флуоресцентные маркеры EGFP и TagRFP, необходимые для дальнейшего сортирования клеток. Сортированные клетки далее клонировались методом предельных разведений, и впоследствии полученные клоны анализировали при помощи обычного и цифрового ПЦР, а также T7E1-анализа. Кроме того, использовали метод капиллярного электрофореза для подтверждения полученных данных.

В ходе проведения работы, нами были подобраны оптимальные условия для трансфекции методом электропорации, учитывающие максимальную выживаемость клеток и эффективность попадания конструкций. Среди полученных клонов нами были обнаружены клетки с необходимыми мутантными аллелями, что подтверждается проведёнными анализами. В ряде случаев мы зафиксировали значительное изменение длины нуклеотидной последовательности мутантных аллелей относительно аллелей дикого типа.

Предполагается, что в полученных мутантных линиях, клетки будут обладать полной или частичной резистентностью к вирусу иммунодефицита человека. Таким образом система редактирования генома CRISPR/Cas9 может использоваться для нокаута гена *CCR5*, что в итоге может привести к появлению инновационных методов лечения людей с синдромом приобретенного иммунодефицита при ВИЧ-инфекциях.