

Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 в целях исследования роли Nhex в развитии цирроза печени

Научный руководитель – Карагяур Максим Николваевич

Гаджикурбанов Магомед Набигуллаевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биологической и медицинской химии, Москва, Россия

E-mail: magomed_19@mail.ru

Nhex - это белок-фактор транскрипции, который участвует в регуляции развития клеток крови и дифференцировке гепатоцитов. Показано, что уровень его синтеза обратно коррелирует со скоростью деления раковых клеток, кроме того, есть указания, что он может быть задействован в ответе гепатоцитов на токсические воздействия. Мы предположили, что Nhex может играть роль при развитии фиброза и цирроза печени.

К сожалению, у нас нет генетических животных моделей для исследования роли Nhex в зрелых гепатоцитах. Поэтому мы решили использовать клеточную модель, выбрав в качестве объекта для исследования клетки гепатокарциномы человека HepG2, которую можно неограниченно пассировать, и которая, в силу происхождения, напоминает зрелые гепатоциты человека.

Существует два основных подхода для изучения функции белка в клетках - это сверхпродукция или снижение уровня этого белка в клетке с целью сравнения свойств модифицированных клеток с измененным уровнем белка и исходными немодифицированными клетками. Результаты сверхпродукции часто трудно интерпретировать, поэтому мы решили выключить ген Nhex в клетках HepG2 с помощью генетического подхода, использующего систему CRISPR/Cas9 для редактирования генома.

Эта система основана на транзиентном введении в клетки млекопитающих генетической конструкции, содержащей кДНК бактериальной нуклеазы Cas9 и короткой, т.н., gRNA (guide RNA), связывание которой с геномной ДНК по принципу комплементарности определяет место разрезания нуклеазой Cas9. Таким образом, в нужном месте геномной ДНК можно создать двухцепочечный разрыв, в месте которого за счет неточной репарации может быть добавлено (или удалено) несколько нуклеотидов. В случае, если этот разрыв создать в начале кодирующей части гена можно с большой вероятностью добиться сдвига рамки считывания, что приведет к функциональному нокауту белка.

С помощью программы для подбора gRNA мы выбрали последовательность короткой РНК для нокаута Nhex. Вектор, содержащий эту РНК, ген Cas9 и флуоресцентный маркер GFP (для оценки пропорции трансфицированных клеток) ввели в клетки HepG2, с помощью проточного цитофлуориметра отсортировали трансфицированные клетки. Были получены как клоны, производные одиночных клеток, так и тотальная популяция модифицированных клеток. Характер изменений в ДНК, выделенных из отдельных клонов с помощью амплификации фрагментов ДНК, определили с помощью секвенирования по Сэнгеру. В результате нами были получены линии HepG2 с генетическим нокаутом гена Nhex, которые после дальнейшей характеристики будут использованы для изучения роли этого белка в развитии фиброза (цирроза) печени.

Источники и литература

- 1) Карагяур М.Н. Васильев П.А., Дыйканов Д.Т., Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Рубцов Ю.П. Оптимизация метода модификации генома CRISPR-CAS9 для создания модельных систем на основе трансформированных клеток со сложным кариотипом.
- 2) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F Multiplex Genome Engineering using CRISPR/Cas Systems. Science.