

Технология редактирования генома CRISPR/Cas9 для удаления гена урокиназного рецептора для снижения пролиферации нейробластомы .

Научный руководитель – Семина Екатерина Владимировна

Шмакова Анна Андреевна

Студент (специалист)

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

E-mail: anya.shmakova@list.ru

Нейробластома - одна из самых распространенных опухолей у детей, на долю которой приходится около 10% от всех онкологических заболеваний в детском возрасте (до 15 лет). Одной из особенностей опухоли является её способность к стремительной прогрессии и раннему метастазированию, и наличие метастазов является одним из неблагоприятных факторов в прогнозе нейробластомы [1].

В ряде исследований показано, что в низкодифференцированных типах опухолей, для которых характерно неблагоприятное гистологическое строение, и к которым также относится нейробластома, наблюдается гиперэкспрессия урокиназы (uPA) и её рецептора (uPAR). При этом высокий уровень uPA и uPAR коррелирует с высоким риском инвазии и метастазирования нейробластомы и рассматривается как прогностический маркер неблагоприятного исхода [2]. Таким образом, использование эффективных подходов для снижения активности генов *uPA* или *uPAR* рассматривается как один из перспективных подходов к т.н. ген-специфичному направленному лечению нейробластомы.

В настоящей работе мы использовали технологию редактирования генома CRISPR/Cas9 для нокаутирования гена *uPAR* в линейной культуре клеток нейробластомы мыши Neuro2a. Нами были созданы невирусные плазмидные конструкции, содержащие никазу Cas9 и две гидовые последовательности, направленные к первому экзону гена *uPAR*. Такая система вносит двухцепочечные разрывы в ген *uPAR*, репарация которых приводит к необратимому нарушению функции гена. Для анализа эффективности созданной плазмиды проводили последовательные трансфекции нейробластомы с последующей оценкой уровня мембранной экспрессии uPAR. После трёх трансфекций Neuro2a более чем у половины клеток (52%) экспрессия uPAR на мембране клеток отсутствовала полностью. Последующая сортировка клеток после третьей трансфекции позволила отобрать клоны, не содержащие uPAR, для последующего исследования их пролиферации. Было обнаружено, что степень подавления экспрессии uPAR влияет на скорость пролиферации клеток, и наименьшая скорость пролиферации наблюдается в клонах Neuro2a, где uPAR отсутствовал.

Таким образом, полученные нами данные позволяют использовать технологию CRISPR/Cas9 для получения клеток со сниженной экспрессией *uPAR*, которые могут стать моделью в дальнейшем изучении роли урокиназной системы в развитии, прогрессировании и метастазировании нейробластомы. Выключение гена *uPAR* в опухолевых клетках при помощи данной технологии может рассматриваться в качестве возможного терапевтического подхода для снижения пролиферации опухолевых клеток при лечении нейробластомы.

Источники и литература

- 1) Строганова А.М., Карселадзе А.И. Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы // Успехи молекулярной онкологии. 2016. №1. С. 32-43.

- 2) Li, Peng et al. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma // Journal of Pediatric Surgery. 2004. № 39(10). P.1512 – 1519.