

Создание эффективной системы лентивирусной доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 для моделирования knock-in мутаций

Научный руководитель – Карагяур Максим Николаевич

Цабай Полина Николаевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: polinatsabai@gmail.com

Система CRISPR/Cas9 успела доказать свою эффективность и завоевать популярность среди ученых всего мира с момента открытия возможности ее использования для модификации геномов эукариот в 2013 году [1-3]. Применение системы CRISPR/Cas9 открыло новые возможности в генетике человека: она используется для моделирования, изучения и даже редактирования генетических особенностей, предрасполагающих к развитию заболеваний и определяющих реакцию организма на лечение [4-6]. Часто для исследовательских целей требуется отключить какой-либо ген, то есть внести knock-out мутацию, из-за которой синтез белка, кодируемого данным геном, становится невозможным. Однако намного интереснее вносить такие изменения, которые не будут нокаутировать интересующий нас ген, а позволят получить клетки с изменённым уровнем экспрессии белка или измененной его структурой - так называемые knock-in мутации. Получая варианты одного и того же гена - полиморфизмы на уровне клеточной культуры или модельных организмов, ученые могут изучать их роль в развитии заболеваний и предсказывать эффективность выбранной терапии.

Целью нашего исследования было создать эффективную и точную систему лентивирусной доставки компонентов системы CRISPR/Cas9 для моделирования полиморфизмов (knock-in мутаций). По итогам работы был создан комплекс двух взаимодополняющих лентивирусных векторов (рис. 1), который предположительно способен вносить замены в интересующие последовательности ДНК (knock-in). Рестрикционный профиль полученных плазмид совпал с предсказанным. Была показана эффективность экспрессии закодированных в векторах белков на клетках линии НЕК293Т: клетки экспрессировали красный и зеленый флуоресцентный белки.

В перспективе будет показано, что при заражении мезенхимных стромальных клеток (МСК) полученными лентивирусными векторами удастся получить клоны МСК, претерпевшие искомую knock-in модификацию.

Источники и литература

- 1) Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. & Doudna, J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells, *Elife*, 2, e00471. doi: 10.7554/eLife.00471.
- 2) Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A. & Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc*, 8, 2281–2308.
- 3) Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Elledge, S. J., et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9., *Science*, 339, 823–826.
- 4) Li Y, Chan L, Nguyen HV, et al. Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;854:549–555.

- 5) <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/august/a-crispr-approach-to-precision-medicine>
- 6) <http://www.pharmafile.com/news/513773/crispr-close-and-personal-take-precision-medicine>

Иллюстрации

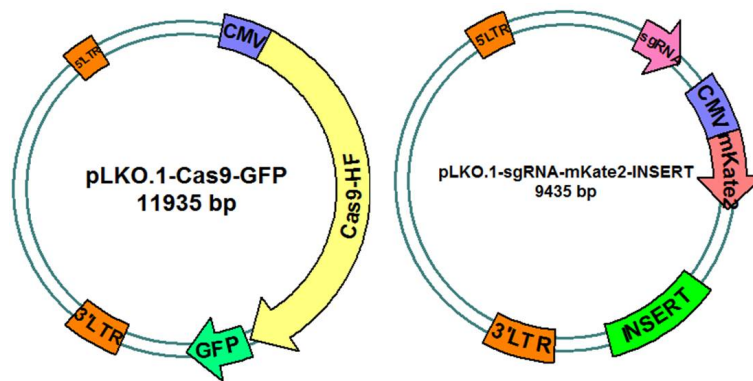


Рис. 1. Полученные лентивирусные векторы