

Специфическое подавление активности малых ядрышковых РНК с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в клетках человека

Научный руководитель – Степанов Григорий Александрович

Виноградов Дмитрий Игоревич

Студент (бакалавр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: dm1vin52@gmail.com

В настоящий момент времени перспективным направлением для тонкой регуляции экспрессии генов является контроль уровня и активности некодирующих РНК. Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) относят к коротким некодирующим РНК. По наличию консервативных последовательностей выделяют класс C/D бокс РНК, которые в комплексе со специфичными белками осуществляют 2'-О метилирование нуклеотидов в процессе созревания рибосомной РНК.

Целью данной работы являлось направленное редактирование генов мяоРНК, закодированных в интронах гена *Gas5*, с помощью системы CRISPR/Cas9 для специфического подавления их активности в клетках человека.

В работе была использована система геномного редактирования CRISPR/Cas9, которая способна вносить двунитевые разрывы в целевые области генома. В интронах гена *Gas5* закодировано 10 C/D-боксов-мяоРНК, для которых описана их каноническая функция и выявлены мишени 2'-О-метиличивания в составе рибосомных РНК. С другой стороны, недавно было показано, что малые ядрышковые РНК гена *Gas5* имеют и неканонические регуляторные функции, а изменения их уровня связывают с развитием различных заболеваний человека. Индивидуальный нокаут генов мяоРНК с помощью системы CRISPR/Cas9 позволяет подтвердить основную роль мяоРНК, а также выявить неканонические функции. Для этого были получены направленные на гены-мишени конструкции на основе плазмидного вектора рх458. Мутации вносились в гены SNORD76, SNORD78, SNORD81. Трансфицированные клетки человека 293FT моноклонировали и отобрали клеточные линии с мутациями в целевых районах. Выявленные мутации затронули функциональные участки мяоРНК, что привело к снижению уровня целевых РНК в мутантных клетках, однако, при этом уровень зрелой днкРНК *Gas5* гена-хозяина не изменился.

Отдельной задачей стало получение на основе клеток 293FT клеточных линий с индивидуальным нокаутом генов двух мяоРНК *SNORD77* и *SNORD80* одновременно. Были отобраны моноклональные клеточные линии, содержащие мутации в генах-мишенях и со сниженным уровнем обеих РНК-мишеней. Целевые мяоРНК направляют -2'-О-метиличивание одного и того же нуклеотида 28S рРНК человека. Методом терминации обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени удалось продемонстрировать неполное подавление целевого метилирования в полученных клеточных линиях.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073 и частичной поддержке