

Генная модификация мутантных фибробластов кожи человека по технологии CRISPR/Cas9 SAM с целью активации транскрипции гена дисферлина *in vitro*

Научный руководитель – Ризванов Альберт Анатольевич

Шаймарданова Алиса Алмазовна

Студент (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия

E-mail: aliceshaimardanova@mail.ru

Дисферлинопатии — группа нейромышечных заболеваний, возникающих вследствие отсутствия/нарушения функциональности белка дисферлина вследствие мутаций в гене *dysf*. Дисферлин играет важную роль в репарации мембран мышечных клеток. Синтез дефектного белка приводит к нарушению процессов репарации в мышечной ткани и ее атрофии. Несмотря на высокую интенсивность исследований дисферлинопатии остаются группой неизлечимых наследственных заболеваний. Одной из основных причин низкой эффективности методов лечения является отсутствие модели, наиболее точно воспроизводящей патологические процессы данного заболевания. Широко используются модели на основе животных, однако из-за значительных генетических отличий они не способны в полной мере воспроизвести все особенности протекания болезни у человека. Перспективным способом лечения дисферлинопатий в настоящее время является генная терапия и модельные системы на основе клеточных линий человека, дефектных по дисферлину, представляют интерес для тестирования новых генотерапевтических препаратов.

Известно, что дисферлин в большом количестве экспрессируется в мышечных клетках, однако в связи с определенными трудностями выделения и культивирования данного типа клеток возникает необходимость поиска альтернативных источников клеточного материала. В качестве клеточной модели для исследования дисферлинопатий в настоящей работе предложены фибробласты кожи человека, в которых с использованием системы CRISPR-Cas9 SAM активирована экспрессия дисферлина.

В настоящей работе из кожи пациента с дисферлинопатией с мутацией в 26 экзоне гена *dysf* были выделены фибробласты и immortalized путем инактивации белка-онкосупрессора p53. Для этого нативные фибробласты были генетически модифицированы рекомбинантным лентивирусом, кодирующим кДНК к нуклеотидной последовательности гена p53. Рекомбинантные лентивирусные частицы получали путем ко-трансфекции клеток HEK293T кальций-фосфатным методом с использованием векторной, упаковочной и оболочечной плазмид. Отсутствие экспрессии p53 в генетически модифицированных фибробластах подтверждали с помощью вестерн-блот анализа и ПЦР в режиме реального времени.

Для транскрипционной активации immortalized фибробластов использовали рекомбинантные лентивирусы, кодирующие транскрипционные факторы P65 и VP64 а также гидовую РНК. После лентивирусной трансдукции проводили селекцию генетически модифицированных immortalized фибробластов с использованием антибиотиков зеоцина, гигромицина и бластицидина. Полученная таким образом культура фибробластов с экспрессией мутантной формы дисферлина может быть использована для дальнейших исследований молекулярных механизмов патогенеза дисферлинопатий и разработки новых технологий терапии нейромышечных заболеваний.