

Разработка модели буллёзного эпидермолиза простого типа на культуре клеток HaCaT

Научный руководитель – Гурская Надежда Георгиевна

Евтушенко Надежда Алексеевна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: hopevt@gmail.com

Буллёзный эпидермолиз (БЭ) — группа клинически гетерогенных генодерматозов, характеризующихся образованием волдырей и эрозий на коже при незначительных механических травмах. Наиболее распространенной формой БЭ является простой буллёзный эпидермолиз (ПБЭ). Заболевание наследуется аутосомно-доминантно, в большинстве случаев (75%) обусловлено мутациями в генах кератина 5 (K5) (ген *krt5*) и кератина 14 (*krt14*) [1]. Эти промежуточные филаменты экспрессируются в базальных кератиноцитах в форме биспирального гетеродимера. Неправильно фолдированные мутантные формы кератина с повышенной частотой образуют глобулярные агрегаты в культурах клеток, полученных из пациентов с ПБЭ. Создание модели заболевания — важная задача для изучения механизмов нарушений физиологии кератиноцитов, ассоциированных с ПБЭ, а также для разработки методов генотерапии для пациентов.

Целью данной работы является разработка модели ПБЭ на культуре клеток HaCaT, с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

Область редактирования была выбрана в соответствии с данными, показывающими, что 2В домен в экзоне 7 *krt5* часто несет мутации, приводящие к агрегации K5 у пациентов с ПБЭ [2]. С помощью электропорации была проведена временная трансфекция клеток вектором, кодирующим Cas9, и вектором, кодирующим гидовую РНК. Из полученной в результате редактирования библиотеки клонов были выделены линии индивидуальных клонов. После секвенирования ПЦР амплифицированной области редактирования был идентифицирован клон, несущий инсерцию 19 н.п. в экзоне 7. Данный клон был охарактеризован с помощью иммуноцитохимического (ИЦХ) анализа повышенной агрегацией K5.

На втором этапе редактирования Cas9 была направлена на начало экзона 1 *krt5* для нокаута мутантной аллели в полученном клоне. В одном из полученных аналогичным образом клонов была обнаружена инсерция во втором кодоне от начала рамки считывания, приводящая к раннему появлению стоп-кодона. Экспрессия K5 была не обнаружена в данном клоне с помощью ИЦХ анализа.

Этот клон представляет модель редкой рецессивной формы ПБЭ [3] и может быть использован как мишень для разработки генной терапии. Кроме того, являясь фенотипическим нокаутом по гену *krt5*, он будет использоваться в качестве инструмента для изучения экспрессии различных мутантных форм *krt5* путем трансфекции генетических конструкций, кодирующих их.

Источники и литература

- 1) Bolling M. C., Lemmink H. H. et al. Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients // British Journal of Dermatology 2011 No. 164(3) P. 637–644.

- 2) Coulombe P., Lee C.H. Defining Keratin Protein Function in Skin Epithelia: Epidermolysis Bullosa Simplex and Its Aftermath // The Journal of investigative dermatology. 2012. No. 132. P. 763-775.
- 3) Tryon R.K., Tolar J., Preusser S.M., et al. A homozygous frameshift variant in the KRT5 gene is compatible with life and results in severe recessive epidermolysis bullosa simplex // The Journal of the American Academy of Dermatology. 2019. No 5(7). P. 576–579.