

**Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с
нокаутом гена UBE2A при помощи технологии геномного редактирования
CRISPR/Cas9**

Научный руководитель – Хомякова Екатерина Александровна

Федоренко Алиса Викторовна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: afedorenko00@mail.ru

В ходе совместной работы с НИИ медицинской генетики (Томск) и институтом Шарите (Берлин) в нашей лаборатории ведется изучение феномена врожденной макроцефалии при делеции локуса Xq24. Наиболее вероятным геном-кандидатом, который может вызывать подобные аномалии развития центральной нервной системы, является ген UBE2A, находящийся в этом локусе и ассоциированный с развитием X-сцепленной умственной отсталости типа Насцименто [1, 2]. Для изучения функции гена UBE2A *in vitro* было принято решение создать модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), которые способны дифференцироваться в различные типы клеток, в частности, в нейральные. Более того, ИПСК способны самоорганизовываться *in vitro* в структуры, которые похожи по морфологическим свойствам и клеточному составу на нативные ткани мозга человека, так называемые органоиды мозга. Для получения нокаутных линий клеток мы использовали CRISPR/Cas9 геномное редактирование, для которого были подобраны три направляющие РНК (gRNA), комплементарных 2-му экзону гена UBE2A. Были сконструированы три плазмиды, каждая содержащая последовательности, кодирующие одну из gRNA, Cas9-нуклеазу и GFP-белок. Данные генетические конструкции использовали для доставки компонентов системы редактирования генома в ИПСК здоровых доноров с женским и мужским кариотипами. В ходе работы были отобраны 3 женских клона с гомозиготным нокаутом гена UBE2A и 2 мужских клона с нокаутом в гемизиготном состоянии. Результат генного нокаута в отобранных клонах был оценен функционально по экспрессии гена UBE2A при помощи количественной ОТ-ПЦР. Во всех клонах наблюдается достоверное снижение экспрессии гена UBE2A. В отредактированных клонах ИПСК был подтвержден плюрипотентного статуса и отсутствие аномалий кариотипа. Для оценки статуса инактивации X-хромосомы, в которой локализован ген UBE2A, был проведен иммуноцитохимический анализ с антителами к гистону H3K27me3. В результате было показано, что в исходных ИПСК и отредактированных женских клонах обе X-хромосомы активны. Для изучения эффекта повышенной экспрессии гена UBE2A дополнительные копии этого гена были встроены в геном ИПСК в лентивирусном векторе. Всего было собрано 4 лентивирусных вектора (с трансгеном gfp; с трансактиватором tet-ON системы; целевой вирус с кодирующей последовательностью гена UBE2A и с инвертированной кодирующей последовательностью гена UBE2A), после сборки и созревания которых проводили заражение ИПСК. В результате, при помощи лентивирусной трансфекции отобрано в работу 3 клона с индуцибельной гиперэкспрессией гена UBE2A, а также 3 контрольных клона, которые были трансфицированы вектором, не несущим функциональной копии гена UBE2A. Повышенная индуцибельная экспрессия гена UBE2A в отобранных клонах подтверждена при помощи количественной ОТ-ПЦР.

Источники и литература

- 1) Honda, S.; Orii, K.; Kobayashi, J.; Hayashi, S.; Imamura, A.; Imoto, I.; Nakagawa, E.; Goto, Y.-I.; Inazawa, J. Novel deletion atXq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation. *J. Hum. Genet.* 2010, 55, 244–247;
- 2) Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-MorganteAM. UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006;79:549–55.