

Создание клеточной модели болезни Хантингтона с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Малахова Анастасия Александровна

Шаринова Динара Витальевна

Студент (бакалавр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: dinarizazhiya@yandex.ru

Болезнь Хантингтона - это наследственное нейродегенеративное заболевание человека, вызванное мутацией в гене *HTT*. В первом экзоне этого гена имеется тракт тринуклеотидных повторов CAG, которых в норме может быть от 9 до 36. В мутантном гене этот тракт удлиняется, количество повторов превышает 36 и может достигать 80. Вследствие этого, мутантный белок HTT имеет удлиненный полиглутаминовый тракт, принимает неправильную конформацию и образует агрегаты в ядре и цитоплазме клеток. Это приводит к гибели нейронов стриатума и коры головного мозга человека. Механизмы развития заболевания до конца не изучены, не существует методов терапии, способных предотвратить развитие нейродегенерации. Именно поэтому одной из актуальных задач является создание адекватной клеточной модели данного заболевания для изучения молекулярных механизмов развития болезни, а также для тестирования потенциальных лекарственных препаратов.

Целью данной работы было создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона. С помощью современной технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 необходимая мутация была внесена в геном клеток линии НЕК293. Методом нуклеофекции в клетки были доставлены две плазмиды: первая кодирует компоненты системы CRISPR/Cas9 и маркерный белок GFP, необходимый для отбора успешно трансфицированных клеток. Другая плазида - донорная, содержит удлиненный тракт CAG-повторов, фланкированный плечами гомологии к первому экзону гена *HTT* и служит матрицей для гомологичной рекомбинации.

В ходе работы было получено более 100 клонов клеток, среди которых были выбраны 8 клонов, несущих мутации в первом экзоне гена *HTT* - инсерции и делеции разного размера. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и ОТ-ПЦР было показано, что HTT экспрессируется как в нормальных, так и в мутантных линиях клеток, но не образует внутриклеточных агрегатов. Однако при добавлении ингибитора протеасом mg132 наблюдается повышенный уровень гибели мутантных клеток, по сравнению с нормальными. Также было исследовано влияние мутации на жизнеспособность клеток. Мутантные клеточные линии демонстрируют повышенный уровень апоптоза при окраске на Annexin V/PI (7% против 0,5% для нормальных клеток). Оценка пролиферативной активности с помощью реагента ХТТ достоверно показала сниженную скорость пролиферации мутантных клеток.

Таким образом, полученные клеточные линии могут служить модельным объектом для изучения некоторых молекулярных аспектов развития болезни Хантингтона.