

Изучение антисмысловой регуляции гена AFAP1-AS1 человека.

Научный руководитель – Скоблов Михаил Юрьевич

Вяхирева Юлия Владимировна

Выпускник (специалист)

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.

Пирогова, Москва, Россия

E-mail: yuliya-vyakhireva@yandex.ru

Вяхирева Ю.В.

ФГБНУ Медико-Генетический Научный центр

E-mail: yuliya-vyakhireva@yandex.ru

Введение. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) - обширный класс регуляторных РНК. Для большинства lncRNA функции не известны, но среди описанных случаев, главная - регуляция генов-мишеней на всех уровнях - от транскрипционного до трансляционного. Один из способов регуляции - антисмысловой, когда lncRNA регулирует уровень белок-кодирующего гена, либо увеличивая его уровень в случае положительной регуляции, либо уменьшая в случае негативной регуляции. В нашей работе мы исследовали антисмысловую регуляцию для гена *AFAP1-AS1* человека, который имеет перекрытие с 3 экзонами гена *AFAP1*, а также перекрытия с генами *PPIA*, *PPID*, *PAICS*, *SERBP1*, за счет *Alu*-повтора.

Материалы и методы. Работа была проведена на клеточных линиях HEK293N и K562, культивированных в среде DMEM с 10% содержанием сыворотки. Трансфекцию проводили с помощью Metafectene. В качестве контроля трансфекции использовалась плаزمид, содержащая зеленый флуоресцентный белок, или siRNA с конъюгированным красителем, в качестве негативного - клетки, трансфецированные только Metafectene. Эффективность трансфекции оценивали на проточном цитофлуориметре. Клетки лизировали в GTV-буфере, из этих лизатов выделяли РНК фенол-хлороформным методом. кДНК была получена обратной транскрипцией с рандомными гексануклеотидами. Оценка изменений уровней экспрессии производилась реакцией ПЦР в реальном времени.

Результаты. Нами была получена плазмидная конструкция с участком второго экзона гена *AFAP1-AS1* для проверки возможной цис-антисмысловой регуляции гена *AFAP1*. На клеточной линии HEK293N была проведена транзientная оверэкспрессия участка *AFAP1-AS1*, заклонированного в плазмиду pEYFP. Эффективность трансфекции составила 48%. Анализ данных ПЦР в реальном времени показал, что при оверэкспрессии *AFAP1-AS1* уровень мРНК *AFAP1* статистически значимо не изменился. Нокадаун *AFAP1-AS1* в клеточной линии K562 до 20% от исходного уровня показал снижение экспрессии *AFAP1* и увеличение экспрессии генов *PPIA*, *PAICS*.

Выводы.

Полученные результаты позволяют говорить о наличии положительной регуляции между перекрывающимися парами генов, однако, мы предполагаем, что для полноценной регуляции необходима оверэкспрессия полного гена. Также наши данные позволяют говорить о наличии отрицательной транс-антисмысловой регуляции между генами *AFAP1-AS1* и генами *PPIA* и *PAICS*. Мы предполагаем, что механизмом транс-регуляции является взаимодействие по механизму SMD (Staufen-mediated decay).