

Получение клеточной линии кератиноцитов HaCaT с нокаутом гена TP53

Научный руководитель – Русанов Александр Леонидович

Ромашин Даниил Дмитриевич

Сотрудник

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

E-mail: daniil.romashin@gmail.com

Клетки иммортализованной линии кератиноцитов HaCaT широко применяются при исследовании свойств нормальных кератиноцитов человека. Линия HaCaT была получена в результате спонтанной иммортализации, в результате которой клетки также приобрели две точечные Gain-of-Function мутации (H179Y и R282Q) в гене TP53 [1]. Мутантный белок mutp53, экспрессируемый клетками HaCaT, имеет множество функциональных отличий от белка дикого типа [2] и существенно влияет на скорость роста и пролиферации клеток. Для исследования влияния mutp53 на программу дифференцировки в клетках HaCaT был проведен нокаут гена TP53 с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9n D10a. Верификацию проведения редактирования проводили методами ИФА, иммуноблоттинга и секвенирования участка гена в области сайтов узнавания нуклеаз Cas9n D10a. Было зарегистрировано полное подавление экспрессии белка mutp53, а также были идентифицированы изменения в аллелях TP53 в результате проведения генетического редактирования в клетках HaCaT.

В данной работе нами было продемонстрировано влияние mutp53 на экспрессию таких маркеров дифференцировки как FLG, IVL и TGM1. Было показано, что клетки, дефектные по mutp53, обладают меньшей скоростью роста пролиферации и более дифференцированным фенотипом по сравнению с клетками HaCaT дикого типа. Также было проведено исследование влияния mutp53 в ответ на воздействие таких индукторов p53 как UVA-излучение и ионы кадмия. Было показано, что данные воздействия оказывают меньшее цитотоксическое действие на клетки с нокаутом mutp53, чем на клетки дикого типа. Полученные результаты позволяют охарактеризовать более детально функции mutp53 и его роль в процессе дифференцировки кератиноцитов HaCaT. Кроме того, создание данной клеточной линии позволяет расширить представление об ограничении применения клеток HaCaT в качестве модели для изучения свойств нормальных кератиноцитов человека.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы).

Источники и литература

- 1) 1. Martynova E, Pozzi S, Basile V, Dolfini D, Zambelli F, Imbriano C, Pavesi G, Mantovani R. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget*. 2012 Feb;3(2):132-43. 2. Goh AM, Cof ll CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011; 223: 116-26.
- 2) 2. Goh AM, Cof ll CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011; 223: 116-26.