

Разработка регуляторного контура для количественной регуляции экспрессии *aroB*

Научный руководитель – Каменский Петр Андреевич

Васильев Руслан Алексеевич

Аспирант

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

E-mail: ruavasilev@gmail.com

Васильев Р.А.^{1,2,3*}, Полушкина И.Д.^{1,3}

¹ *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

² *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия*

³ *Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, Москва, Россия*

• *e-mail: <mailto:ruavasilev@gmail.com>*

Ключевые слова: искусственные сети, РНК-переключатель, регуляторная сеть, сплайсинг интеинов, РНК-интерференция

Развитие методов генной терапии, в особенности геномного редактирования, имеет большой потенциал в медицине. Однако их использование не ограничивается непосредственно редактированием - существует длинный ряд заболеваний, этиология которых зависит от уровня экспрессии конкретных генов. Поэтому разработка интегрированных в геном инструментов количественной регуляции экспрессии генов представляет собой важный шаг к терапии таких заболеваний. Например, количественный сдвиг в экспрессии аполипопротеина В (*apoB*) гепатоцитами в числе прочего может служить причиной семейной гиперхолестеринемии [1]. С целью регуляции экспрессии *apoB* мы планируем собрать замкнутую регуляторную сеть, регулирующую уровень экспрессии *apoB* посттранскрипционно.

Методы: Мы разрабатываем 2 модельные системы, представляющие собой замкнутые на *apoB* сети с регулируемыми друг друга элементами. Первая представлена следующей петлей обратной связи: уровень синтеза *apoB* снижается с помощью микроРНК, уровень которой в свою очередь регулируется с помощью активатора транскрипции dCas9-VP64. Последний перед стадией трансляции вступает во взаимодействие с мРНК *apoB* и только в этом случае запускает синтез микроРНК. Ключевым элементом этой модельной системы является РНК-переключатель, запрещающий неконтролируемую трансляцию dCas9-VP64 и разрешающий ее только при связывании мРНК *apoB*. Вторая модельная система основана на редактировании гена *apoB* с целью добавления к нему половины белка dCas9-VP64 со специальным фрагментом, интеином, который позволяет «сшить» эту половину с оставшейся половиной внутри клетки. Таким образом, объединение двух половин dCas9-VP64 в единый белок полностью зависит от *apoB*. Получившийся белок как и описанном выше случае активирует микроРНК, которая подавляет синтез *apoB*, замыкая цепь. В результате мы намерены получить закрытую многокомпонентную систему с петлей обратной связи. Для проверки полученного РНК-переключателя на способность регулировать трансляцию нами были собраны генетические конструкции, кодирующие ген EGFP

под контролем РНК-переключателя, и протестированы в системе сопряженной *in vitro* транскрипции/трансляции [2].

Результаты: Последовательности РНК-переключателя, контролирующего трансляцию на примере EGFP, а также последовательности, кодирующие интеины с половинами dCas-VP64, были клонированы в составе плазмидных векторов. Была показана способность РНК-переключателя регулировать трансляцию в ожидаемой манере: в отсутствие триггерной мРНК (ароВ) продукция EGFP была ингибирована в *in vitro* системе сопряженной транскрипции/трансляции, с другой стороны уровень белка EGFP был аналогичен положительному контролю (полученному с нативной мРНК EGFP).

Заключение: Текущие результаты позволяют заключить, что разработанный РНК-переключатель может быть использован в качестве инструмента регуляции трансляции, а также может быть в дальнейшем применен в работах на культурах клеток млекопитающих.

Благодарности: Выполнен по соглашению РФФИ (№ 18-29-07046).

Источники и литература

- 1) Vega G. L. et al. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia //The Journal of clinical investigation. – 1986. – Т. 78. – №. 5. – С. 1410-1414.
- 2) Pelham H. R. B., Jackson R. J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates //European Journal of Biochemistry. – 1976. – Т. 67. – №. 1. – С. 247-256.