

Использование системы CRISPR-Cas9 для нокаута гена β -микроглобулина.

В.К. Димитриев^{1,2}, П.А. Бобровский², В.Н. Лазарев^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (государственный университет)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Для современной хирургии одной из актуальных проблем является отторжение тканей при трансплантации. Реакция отторжения пересаженных тканей в случае негативной гистосовместимости получило название реакции «трансплантат против хозяина». Одной из причин отторжения является реакция цитотоксических Т-лимфоцитов хозяина на молекулы главного комплекса гистосовместимости клеток донора. У человека данный комплекс исторически называется HLA (Human Leucocyte Antigen).

Белки системы HLA класса I представляют из себя гетеродимер, тяжёлая цепь которого состоит из трёх вариативных альфа-субъединиц, расположенных на поверхности клетки, а также цитоплазматического и трансмембранного доменов. Лёгкая цепь, β -микроглобулин (B2m), не имеет трансмембранного домена и нековалентно связана с альфа-субъединицами тяжёлой цепи. Все молекулы HLA класса I содержат в себе B2m, являющийся крайне консервативной субъединицей [1]. Поэтому его инактивация с высокой вероятностью приведёт к нокауту всех систем HLA I класса. В свою очередь, нокаут системы HLA, весьма вероятно, поможет избежать реакции «трансплантат против хозяина». Таким образом, станет возможно создать ткани, пригодные для пересадки любому человеку без риска отторжения.

Целью работы являлся нокаут гена β -микроглобулина в клетках линии НЕК 293 с использованием системы CRISPR-Cas9. Для её достижения были поставлены следующие задачи: пользуясь биоинформатическими методами, найти сайты-мишени для системы CRISPR-Cas9 в экзонах гена *b2m* с минимальным количеством возможных нецелевых двухцепочечных разрывов в геноме; создать плазмиды, кодирующие гайд-РНК и белок Cas9, а также репортерный белок для контроля эффективности трансфекции; трансфицировать клетки линии НЕК 293 полученными конструкциями и провести анализ эффективности редактирования генома.

В ходе работы с помощью сервиса crispr.mit.edu [2] были найдены 4 сайта-мишени, расположенные в первом и втором экзонах гена *b2m* (в скобках указано число возможных неспецифических сайтов в генах):

5`-GAGTAGCGCGAGCACAGCTA-3` (8)

5`-CAGTAAGTCAACTTCAATGT-3` (12)

5`-ACCCAGACACATAGCAATTC-3` (13)

5`-CGTGAGTAAACCTGAATCTT-3` (10)

Использование для трансфекции нескольких типов плазмид, каждая из которых кодирует один из элементов системы CRISPR-Cas9, невыгодно, т.к. эффективное редактирование будет проходить только в клетках, трансфицированных плазмидами каждого типа. Нами были сконструированы векторы, содержащие по два сайта клонирования для подобранных последовательностей, кодирующих гайд-РНК, под промотором hU6, а также полипептид hCas9-T2A-GFP под промотором CBh.

Поскольку на первом этапе работы нас интересовала проверка работоспособности гайд-РНК, в каждую плазмиду была заклонирована только одна кодирующая гайд-РНК последовательность. В случае же использования двух гайд-РНК возможна потеря фрагмента генома, заключённого между их сайтами-мишенями, что также приведёт к нокауту гена. Данными плазмидами были трансфицированы клетки линии НЕК 293. Через 48 часов после трансфекции клетки были

рассеяны с целью получения моноклональных культур. После этого культуры клеток были лизированы, и проведена амплификация фрагмента генома, соответствующего гену *b2m*, с последующим секвенированием ампликона по Сэнгеру. Были отобраны клоны, в которых произошёл двухцепочечный разрыв в сайте-мишени с последующей репарацией, что привело к потере 4 нуклеотидов. В настоящий момент проводится подробный анализ полученных клонов.

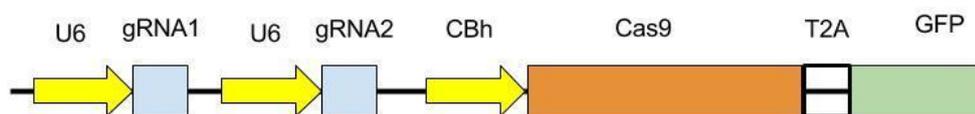


Рис.1. Схема участка плазмиды, сконструированной для редактирования генома в клетках человека. Условные обозначения: U6, CBh – промоторы U6 и CBh соответственно; Cas9 – ген эндонуклеазы; GFP – ген зелёного флуоресцирующего белка; T2A – ген саморасщепляющегося пептида вируса *Thosea asigna*.

	350	360	370	X	380
F1	ATGGATGAAA	CCCAAGACACATAGCA	-----	GGAAATTTGAC	
R1	ATGGATGAAA	CCCAAGACACATAGCA	-----	GGAAATTTGAC	
F2	ATGGATGAAA	CCCAAGACACATAGCA	ATTCA	GGAAATTTGAC	
R2	ATGGATGAAA	CCCAAGACACATAGCA	ATTCA	GGAAATTTGAC	

Рис. 2. Анализ эффективности редактирования гена *b2m*. Риды F1 и R1 соответствуют ампликону фрагмента генома клона, подвергнутого редактированию. Риды F2 и R2 — ридам клона, не подвергнутого редактированию. Чёрным выделен сайт распознавания gRNA. Прочерки в регионе X соответствуют нуклеотидам, утерянным вследствие репарации по типу негомологичного сшивания концов.

Литература:

[1] Karabekian Z., Idrees S., Ding H., Jamshidi A., Posnack N.G., Sarvazyan N. Downregulation of beta-microglobulin to diminish T-lymphocyte lysis of non-syngeneic cell sources of engineered heart tissue constructs // Biomed. Mater. 2015 V. 10 N. 3 P. 1 – 10.

[2] <http://crispr.mit.edu/#submit-many> ; дата обращения 14.10.2016