

Получение нокаутных по LPAP клеток Jurkat методом SORTS

Научный руководитель – Филатов Александр Васильевич

Бязрова М.Г.¹, Круглова Н.А.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: manhva@yandex.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru*

LPAP (Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein) - небольшой трансмембранный белок лимфоцитов, образующий прочный комплекс с фосфатазой CD45 [2]. LPAP был обнаружен более 30 лет назад, но его функция до сих пор неизвестна. Предполагается, что он участвует в проведении сигнального каскада лимфоцитов, регулируя активность CD45 [1].

Один из способов определения функции белка - подход 'loss-of-function': ген, кодирующий белок, нокаутируют и анализируют последствия этого события. Важным этапом при работе на клеточном уровне является отделение нокаутированных клеток от общей популяции. Для поверхностных белков это достигается путем сортировки. Для внутриклеточных белков традиционно используется клонирование. Это длительный и трудоемкий процесс, где заранее трудно предсказать, какое количество клонов необходимо проанализировать, прежде чем делать вывод о наблюдаемом фенотипе, что особенно осложняется в случае гетерогенных культур, таких как Jurkat. Преодолеть это затруднение и получить поликлональную популяцию, нокаутную по внутриклеточному белку, можно с помощью метода SORTS, недавно предложенного группой А. Zotova с соавт. [3]. С помощью технологии CRISPR/Cas9 в ген целевого белка вставляется последовательность, которая блокирует экспрессию эндогенного белка. При этом экспрессируется короткая конструкция, локализуемая на плазматической мембране и несущая пептидную метку во внеклеточной части. Наличие метки позволяет отбирать клетки с нокаутом, а использование двух меток - клетки с нокаутом по двум аллелям.

Цель настоящей работы состояла в нокаутировании гена LPAP в клетках Jurkat методом SORTS. Для этого были подобраны конструкции донорской ДНК с плечами гомологии по статье Zotova et al. [3]. Затем донорскую ДНК, нуклеазу Cas9 и пару гидовых РНК трансфицировали в клетки Jurkat путем электропорации. Через 5 суток анализировали экспрессию белковых меток с помощью проточной цитометрии. Позитивные клетки сортировали и наращивали для повторного тестирования.

Полученные клетки являются удобным инструментом для изучения функции белка LPAP в лимфоцитах.

Исследование поддержано грантом РФФИ №18-34-00705 мол_а.

Источники и литература

- 1) Kruglova N.A. et al. Constitutive and activation-dependent phosphorylation of lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein (LPAP) // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 8. P. e0182468.
- 2) Schraven B. et al. A functional complex is formed in human T lymphocytes between the protein tyrosine phosphatase CD45, the protein tyrosine kinase p56lck and pp32, a possible common substrate // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 21, № 10. P. 2469–2477.

- 3) Zotova A.A. et al. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycophosphatidylinositol-anchored epitope tags. Sci Rep (in press)