

**Оптимизация работы системы направленного редактирования генома
CRISPR/Cas9 в культуре фибробластов человека**

Научный руководитель – Лактионов Петр Павлович

Морозова Екатерина Евгеньевна

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: morozovae613@gmail.com

Старение — это естественный процесс, который ведет к постепенному снижению адаптационных возможностей организма и функций всех его органов и систем. На клеточном уровне старение - это в конечном итоге необратимая остановка клеточного цикла, в то время как старение организма - неуклонное ухудшение его функционального состояния. В ходе старения клетки демонстрируют характерные морфологические и метаболические изменения. К ним относятся изменения паттерна экспрессии генов, активация генов супрессоров-опухолей и секреция провоспалительных агентов, объединенных понятием секреторного фенотипа, ассоциированного со старением [1]. Клеточное старение сопровождается масштабными пространственными перестройками ядра, приводящими к формированию специальных ядерных структур конденсированного хроматина (SAHF) и ассоциированной со старением деконденсацией центромер (SADS). Снижение уровня компонента ядерной оболочки ламина B1 приводит к нарушению структуры хроматина и, как предполагается, участвует в механизме формирования SAHF и SADS [2]. Снижение уровня экспрессии ламина B1 является общепринятым биомаркером клеточного старения. Целью представленной работы является оптимизация системы направленного редактирования генома CRISPR / Cas9 и получение культуры первичных фибробластов человека с делецией LMNB1.

Для создания первичных фибробластов человека, несущих делецию гена LMNB1, использовалась система направленного мутагенеза CRISPR / Cas9. Направляющие РНК были выбраны с использованием ресурса CRISPR Design и клонированы в вектор PX459. Эффективность направляющих РНК определялась с использованием системы pEGxxFP с последующим анализом методом проточной цитометрии.

Были получены генетические конструкции, кодирующие различные направляющие РНК для получения делеции гена LMNB1 с помощью CRISPR / Cas9. Отобраны наиболее эффективные направляющие РНК. Проведена оптимизация условий целевого мутагенеза методом CRISPR / Cas9 для удаления кодирующей области гена LMNB1 в первичных фибробластах человека. Была получена гетерогенная популяция клеток первичных фибробластов человека, несущих делецию гена LMNB1.

Источники и литература

- 1) Ghosh K., Capell B.C. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging // J. Invest. Dermatol. 2016. Т. 136. № 11. С. 2133–2139.
- 2) Sadaie M. и др. Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence // Genes Dev. 2013. Т. 27. № 16. С. 1800–1808.