Инактивация генов ash2l, smarca4, wdr48, elf2 в клетках человека для изучения механизма действия спарсомицина

Чекмарев И.Д.[1], Логунов С.Е.[2], Марьясина С.С.[3]
[1]Школа имени Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия
[2]РХТУ имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
[3]МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
idchekmarev@mail.ru

Спарсомицин – антибиотик, выделенный из бактерий *Streptomyces sparsogenes*. Он связывается в А-сайте большой субъединицы рибосомы и останавливает рост пептидной цепи [1], в результате чего замедляется синтез белка. Спарсомицин способен ингибировать как прокариотическкую, так и эукариотическую рибосому [2]. В связи с этим использование его в качестве антибактериального препарата не представляется возможным. Тем не менее, предположительно спарсомицин или какие-либо его синтетические аналоги могут быть использованы в качестве химиотерапевтического препарата для селективного подавления роста опухолевых клеток [3].

В рамках настоящей работы изучается влияние инактивации генов ASH2L, SMARCA4, ELF2 и WDR48 на резистентность клеток человека к спарсомицину. Эти гены отобраны в ходе предварительных экспериментов, проведенных в нашей лаборатории. Ген ASH2L кодирует белок, участвующий в образовании комплекса MLL1/MLL, необходимого для метилирования лизина-4 в гистоне H3. Белок SMARCA4 отвечает за регуляцию экспрессии путём ремоделирования хроматина. Ген WDR48 кодирует белок, взаимодействующий с убиквинтин-специфичной пептидазой 1, активируя деубиквитинирующую активность. Ген ELF2 кодирует белок, участвующий в регуляции транскрипции и обеспечивающий активность ДНК-связывающего транскрипционного фактора.

Рисунок 1. Получение плазмиды PX458-ASH2L, необходимой для инактивации гена ASH2L. A) Карта плазмиды. B) Подтверждение последовательности полученной плазмиды с помощью секвенирования: (a) темплатная и кодирующая цепи целевой последовательности ДНК; (b) результат секвенирования. Указаны олигонуклеотиды, использовавшиеся для конструирования плазмиды (ASH2L_cr_F и ASH2L_cr_R), последовательность гидовой РНК, последовательность скаффолда гидовой РНК и U6-промотер.

Для получения клеточных линий, нокаутных по изучаемым генам, отредактирован геном клеток линии HAP1 методом CRISPR/Cas9. HAP1 — линия клеток человека, полученная на основе раковых клеток. Для инактивации генов получены плазмиды на основе вектора PX458. В рамках работы получены плазмиды PX458-ASH2L (рис. 1A), PX458-SMARCA4, PX458-ELF2 и PX458-WDR48. Плазмиды получены с помощью

лигирования по липким концам участков, кодирующих гидовые РНК, в вектор PX458. Подтверждение получения целевых конструкций выполнено с помощью секвенирования (рис. 1B).

Полученные плазмиды трансфецировали в клетки HAP1 с помощью липофектамина-3000. Клетки, получившие плазмиду, обладали флуоресценцией за счёт экспрессии GFP, находящегося на плазмиде в качестве селективного маркера (рис. 2).

Светящиеся клетки отбирали с помощью клеточного сортера, после чего рассеивали в 96-луночные планшеты для получения моноклональных клеточных линий. Эти линии анализировали с помощью амплификации целевого участка ДНК методом ПЦР и далее — секвенированием. Инактивацию генов определяли по сдвигу рамки считывания (рис. 3).

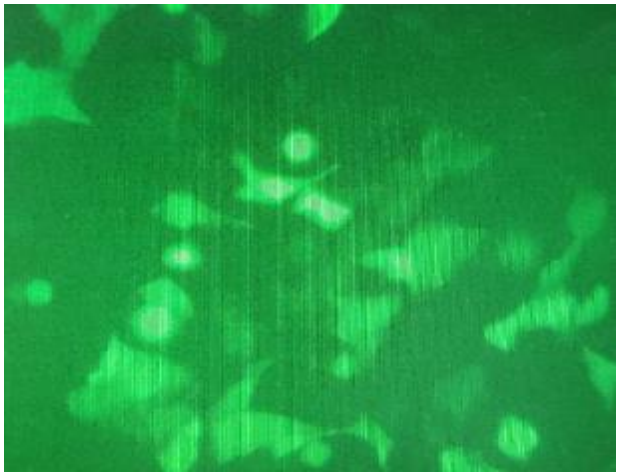

Рисунок 2. Подтверждение трансфекции плазмиды PX458-ELF2 в клетки линии HAP1 с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки, получившие плазмиду, экспрессируют GFP, закодированный на плазмиде в качестве селективного маркера.

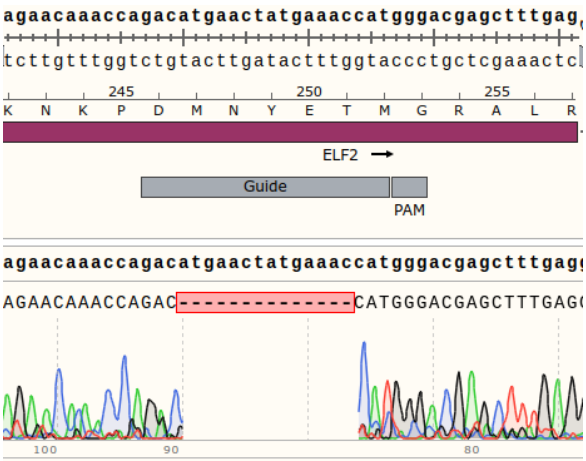

Рисунок 3. Инактивация гена ELF2 в клеточной линии HAP1. Показан фрагмент темплатной и кодирующей цепи последовательности ДНК гена ELF2, аминокислотной последовательности белка ELF2, отмечен участок, комплиментарный гидовой РНК и PAM-сайт. Внизу приведён результат секвенирования моноклональной линии с отредактированным геномом. Делеция 14-ти нуклеотидов в кодирующей области гена ELF2 приводит к сдвигу рамки считывания и инактивации гена.

В результате проделанной работы получены 2 клеточные линии, нокаутные по гену SMARCA4, 3 клеточные линии с инактивированным геном ELF2, 2 линии, нокаутные по гену WDR48 и 1 клеточная линия, нокаутная по гену ASH2L. Эти клетки используются для изучения роли соответствующих генов в выработке резистентности к спарсомицину. Предполагается, что полученные данные внесут вклад в понимание механизма действия спарсомицина, а это откроет новые пути к созданию противоопухолевых препаратов.

1. Garrett R, Grisham CM (2013). Biochemistry. Brooks/Cole, Cengage Learning.
2. Slechta L. Sparsomycin (1967). Mechanism of Action.
3. Lazaro E. et al. Interaction of the antibiotic sparsomycin with the ribosome //Antimicrobial agents and chemotherapy, 1991