

Исследование молекулярного механизма варианта сплайсинга с.3139+1G>T в гене CFTR**Гурьев Всеволод Денисович***Студент (бакалавр)*

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

E-mail: divebomber0@gmail.com

Муковисцидоз - гетерогенное, аутосомно-рецессивное заболевание, широко распространенное среди европейского населения. Заболевание обусловлено наличием мутаций в обеих копиях гена муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости (*CFTR*), кодирующего одноименный белок, который представляет собой ионный канал, отвечающий за перенос хлорид-ионов из клетки. Утрата функции приводит к нарушению ионного транспорта в эпителиальных клетках различных органов. Пациенты, с диагностированным заболеванием, страдают от таких симптомов как повышенная вязкость экзокринного секрета, приводящая к цилиарной дисфункции, скоплению слизи и хронической эндобронхиальной инфекции в легких [3]. На данный момент известно о более чем 2000 патогенных вариантах данного гена, около 12% из которых являются вариантами, приводящими к нарушению сплайсинга [1].

Целью настоящей работы является исследование молекулярного механизма влияния варианта с.3139+1G>T, на сплайсинг пре-мРНК гена *CFTR*.

На первом этапе работы на матрице геномной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции был амплифицирован фрагмент длиной 800 пар нуклеотидов, содержащий 19 экзон с примыкающими участками интронов. Полученный фрагмент был клонирован по Гибсону в плазмиду pSp13-Flu2-TK-del. Успешность клонирования была подтверждена секвенированием по Сэнгеру. Для проверки работоспособности, полученной конструкции, была проведена трансфекция культуры эукариотических клеток НЕК293 с последующим выделением из культуры РНК и проведением реакции обратной транскрипции. На полученной таким образом матрице кДНК была поставлена ПЦР. В результате был получен продукт длиной 151 п.н., что соответствует длине 19 экзона дикого типа. В результате была получена генетическая конструкция, корректно экспрессирующая 19 экзон гена *CFTR*.

На втором этапе данной работы исследуемый вариант с.3139+1G>T был введён в полученную ранее конструкцию с помощью сайт-направленного мутагенеза. Для оценки влияния данного варианта на сплайсинг, была проведена трансфекция культуры эукариотических клеток НЕК293 минигеном, несущим вариант. Из данной культуры была выделена РНК, с последующим получением кДНК путем обратной транскрипции. На полученной кДНК была поставлена ПЦР. В результате, было показано, что вариант с.3139+1G>T, приводит к полному пропуску 19 экзона.

Таким образом в результате данной работы было показано, что исследуемый вариант приводит к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона в позиции 1009. Такое укорочение белка *CFTR* приводит к потере нуклеотид-связывающего домена (NBD-2), участвующего в процессе открытия ионного канала, в связи с чем, белок утрачивает свою функцию [2].

Источники и литература

- 1) Deletang, K., Taulan-Cadars, M. Splicing mutations in the CFTR gene as therapeutic targets // Gene Therapy. 29, p.399–406 (2022).

- 2) Fangyu Liu, et al. Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel // Cell. 2017. 169, 85-95 (2017).
- 3) Proesmans, M., Vermeulen, F. & De Boeck, K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect // European Journal of Pediatrics 167, 839–849 (2008).