

Эмбриональные стволовые клетки мыши с нокаутом гена *PSMB8* как модель для изучения роли субъединицы иммунопротеасомы $\beta 5i$ /LMP7 в индукции клеточной плюрипотентности

Научный руководитель – Цимоха Анна Сергеевна

Кузнецов Алексей Викторович

Сотрудник

Институт цитологии РАН, Saint Petersburg, Россия

E-mail: alsiberia13@gmail.com

Значительный интерес для регенеративной медицины и фундаментальных исследований в области биологии развития представляют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) которые, как и эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) характеризуются способностью к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Молекулярные механизмы индукции клеточной плюрипотентности в настоящее время остаются недостаточно изученными, и сам процесс репрограммирования носит стохастический характер и характеризуется низкой эффективностью и гетерогенностью получаемых иПСК. Известно, что в поддержании клеточной плюрипотентности и дифференцировке как иПСК, так и ЭСК участвует убиквитин-протеасомная система (УПС) - ключевой игрок поддержания белкового гомеостаза за счет селективной деградации внутриклеточных белков. Так, показано, что эффективность индукции иПСК из эмбриональных фибробластов мыши сильно снижается при ингибировании активности протеасомы. Кроме того, имеются данные, указывающие на участие иммунопротеасомы в процессе репрограммирования.

В качестве клеточной модели для изучения роли иммунопротеасомы в индукции клеточной плюрипотентности, мы получили линии ЭСК мыши с нокаутом гена *PSMB8*, который кодирует каталитическую субъединицу иммунопротеасомы $\beta 5i$ /LMP7. Дифференцированные производные данных клеток можно использовать для получения иПСК и изучения эффектов, вызванных инактивацией гена *PSMB8* в процессе репрограммирования. Для осуществления нокаута мы трансфицировали ЭСК мыши плазмидой, кодирующей систему CRISPR/Cas9 с направляющей РНК к целевому гену и флуоресцентный маркер для селекции клеток, получивших плазмиду. Первичный анализ отобранных по флуоресцентному сигналу отдельных клонов ЭСК, проводили методом иммуно-блоттинга с антителами к продукту гена *PSMB8*. Поскольку в ЭСК мыши ген *PSMB8* не экспрессируется, мы подвергали отобранные клоны ЭСК дифференцировке *in vitro* и последующей активации синтеза иммунопротеасом воздействием $IFN\gamma$. Клоны ЭСК, не синтезирующие продукт гена *PSMB8*, были отобраны для верификации нокаута, которую осуществляли с помощью амплификации целевого участка геномной ДНК и его анализа с помощью секвенирования на содержание точечных мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания. Также с помощью секвенирования мы подтвердили целостность участков геномной ДНК, которые с наибольшей вероятностью могут выступать в качестве дополнительных мишеней для выбранных нами направляющих РНК (off-target сайты). Полученные нами линии ЭСК мыши с верифицированным нокаутом гена *PSMB8* и не содержащие мутаций в пяти наиболее вероятных off-target сайтах в дальнейшем будут использованы для установления роли иммунопротеасомы в процессе клеточного репрограммирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (22-14-00390).