

Получение и анализ клеточных линий MNNG/HOS с нокаутом гена *PBOV1* с помощью системы CRISPR-Cas9

Е.А. Гук*, В.Е. Спангенберг, С.А. Брускин, Л.Г. Малошенок

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

* *lissa.guk21@gmail.com*

Ключевые слова: CRISPR-Cas; нокаут; онкогенез

Preparation and analysis of MNNG/HOS cell lines with *PBOV1* gene knockout using the CRISPR-Cas9 system

E.A. Guk*, V.E. Spangenberg, S.A. Bruskin, L.G. Maloshenok

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

* *lissa.guk21@gmail.com*

Key words: CRISPR-Cas; knockout; oncogenesis

Злокачественные новообразования ежегодно выявляются более чем у десяти миллионов человек во всем мире. Генетические маркеры являются одним из наиболее эффективных инструментов для ранней диагностики рака. Ген человека *PBOV1*, биологическая функция которого пока не установлена, демонстрирует стабильную экспрессию при ряде злокачественных опухолей. Целью работы являлась оценка вклада *PBOV1* в изменение фенотипа и профилей экспрессии генов, характерных для клеточной линии остеосаркомы MNNG/HOS. Секвенирование ампликона целевого участка гена показало наличие делеций длиной 7, 11 и 16 нуклеотидов во всех аллелях полиплоидной линии MNNG/HOS, что вызвало сдвиг рамки считывания и преждевременное формирование стоп-кодона, подтверждая полный нокаут гена. Экспрессию *PBOV1* оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени; также анализировали изменения экспрессии генов-маркеров рака. Скорость пролиферации и миграционной активности определяли методом «зарастания царапины». Организацию виментина, показателя онкогенного потенциала клеток, изучали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. В результате экспрессия *PBOV1* в линиях с нокаутом полностью отсутствовала по сравнению с клетками дикого типа. Удаление *PBOV1* снижало уровень маркера пролиферации *CDK9* и онкогенов *Nanog*, *Sox2*, *ERBB2*, одновременно повышая экспрессию опухолевого супрессора *TP53*. Пролиферация снижалась в несколько раз, а миграция полностью отсутствовала. Иммуноокрашивание показало переход от фибриллярной формы виментина вокруг ядра в клетках дикого типа к агрегатной форме в клетках с нокаутом, что соответствует деградации виментина. Таким образом, нокаут гена *PBOV1* методом CRISPR-Cas9 значительно снижает онкогенный потенциал клеточной линии остеосаркомы MNNG/HOS, уменьшая пролиферативную и миграционную активность клеток.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания ИОГен РАН «Изучение генетических процессов у микроорганизмов, растений, животных и человека», № 125040704886-1.