

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ МУКОВИСЦИДОЗА. ПРИРОДА МУТАЦИИ

Ермоленко Д.А., Мисюкевич А.Ю., Полешко А.Г., Волотовский И.Д.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

Муковисцидоз — тяжелое моногенное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутацией гена CFTR (трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза). Продуктом данного гена является трансмембранный белок большинства эпителиальных клеток, функционирующий как цАМФ-зависимый хлорный канал в клетках легких и ЖКТ [1,2], дефект которого приводит к патологическому функционированию легких, поджелудочной железы, ЖКТ, репродуктивной системы и печени [3]. Известно, что наиболее часто встречающаяся мутация, участвующая в формировании патологического фенотипа по данному заболеванию (70% случаев) является мутация F508del (делеция фенилаланина в 508 положении) в 10 экзоне гена [4].

Целью работы явилось определение природы мутации в гене CFTR у больного П. 20-ти лет, приводящей к нарушению нормального функционирования транспортного белка CFTR, ответственного за развитие тяжелого наследственного заболевания — муковисцидоза, с целью последующего проведения CRISPR/Cas9 редактирования мутированного гена.

В качестве объекта исследования использовались фибробласты кожи, полученные от больного муковисцидозом. Клетки выделяли методом экспланта и культивировали при 37 °С, 5% CO₂ в среде DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ед./мл. стрептомицина/пенициллина, соответственно. В дальнейшем из клеток выделяли ДНК и проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием пары праймеров (F: ACTGGAGCCTTCAGAGGGTAA, R: TGGCATGCTTTGATGACGCT), фланкирующих целевой участок гена CFTR в области 10 экзона, предположительно несущий мутацию F508del. Анализ полученных последовательностей ПЦР-продуктов проводили методом секвенирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США), при котором флуоресцентно-меченные фрагменты ДНК разделяли методом капиллярного гель-электрофореза, с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, согласно рекомендациям производителя.

В результате проведения прямого секвенирования и биоинформатического анализа данных, у пациента П. обнаружена мутация в гене CFTR в компаудном состоянии, с известной мутацией del508F, приводящая к выпадению аминокислоты фенилаланина в 508 положении транспортного белка, локализованную в 10 экзоне гена и неизвестной мутацией, расположение которой остается неизвестной, т.к. она может находиться в пределах всего гена CFTR и которая совместно с F508del приводит к фенотипу организма и появлению симптомов заболевания: нарушению созревания белка CFTR и его полному отсутствию на поверхности клеток. Полученные данные будут использоваться в дальнейшем для коррекции мутации с использованием системы редактирования CRISPR/Cas9.

Библиографические ссылки

1. Riordan J., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA // Science. 1989. Vol. 245. P. 1066–1073.
2. Linsdell, P. Functional architecture of CFTR // Molecular Membrane Biology. 2013. Vol. 31. P. 1–16.
3. Nichols D., Chmiel J. Inflammation and its genesis // Pediatric Pulmonology. 2015. Vol. 50. P. 39–56.
4. Bombieri C., Seia M. Genotypes and Phenotypes in Cystic Fibrosis and Cystic Fibrosis // Semin Respir Crit Care Med. 2015. Vol. 36. P. 180–193.