

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология  
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ПОМОЩИ CRISPR/CAS9 НА  
ОСНОВЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕК293А ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ДИСФЕРЛИНОПАТИИ ЧЕЛОВЕКА**

**Работа завершена:**

"5" июня 2019 г.

(Д.Р. Аглиуллина)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель

д. б. н., профессор

"5" июня 2019 г.

(А.А Ризванов)

ассистент каф. генетики

"5" июня 2019 г.

(И.Г. Старостина)

Заведующий кафедрой

д. б. н., профессор

"05" 06 2019 г.

(В.М. Чернов)

Казань-2019

## **СОДЕРЖАНИЕ**

	СТР.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	11
1.1 Дисферлинопатии	11
1.2 Семейство белков ферлинов	12
1.3 Функции белка дисферлина	13
1.4 Система CRISPR/CAS9	17
1.5 Тест-система на основе CRISPR/Cas9 SAM	19
1.6 Дифференцировка клеток	22
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	25
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	25
2.1 Клеточные линии, используемые в работе	25
2.1.1 Клеточная линия HEK293A	25
2.1.2 Клеточная линия HEK293T	25
2.1.3 Иммортилизованная клеточная культура фибробластов Human Fibroblasts-p53-GFP	26
2.2 Процедуры пассирования и криоконсервации клеточных линий, используемых в работе	26
2.2.1 Криоконсервация клеточных линий	26
2.2.2 Пассирование клеточных линий	27
2.3 Описание плазмидных векторов, используемых в работе	28
2.4 Наработка препаративных количеств плазмид	33
2.4.1 Приготовление питательных сред для культивирования <i>E. coli</i>	33

2.4.2 Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> штамма DH5 $\alpha$ (Invitrogen)	34
2.4.3 Генетическая трансформация клеток <i>E. coli</i> штамма DH5 $\alpha$	35
2.4.4 Выделение плазмидной ДНК	35
2.4.5 Электрофорез в агарозном геле	36
2.5 Получение рекомбинантного лентивируса	37
2.6 Оптимизация необходимой концентрации антибиотиков для дальнейшей селекции культур клеток после генетических модификаций с целью транскрипционной активации	39
2.7 Проведение активации транскрипции гена дисферлина в культуре клеток HEK293A по технологии CRISPR/Cas9 SAM	40
2.8 Проведение анализа эффективности транскрипционной активации (Вестерн-блот)	42
2.9 Анализ ПЦР-РВ	43
2.9.1 Выделение общей РНК из клеточных осадков	43
2.9.2 Реакция обратной транскрипции	43
2.9.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	44
2.10 Проведение сборки рекомбинантных лентивирусов, несущих MyoD для миогенной дифференцировки фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина	46
2.11 Проведение трансдукции фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина рекомбинантными лентивирусами, несущими MyoD для миогенной дифференцировки	46

2.11.1 Проведение анализа эффективности миогенной дифференцировки (Вестерн-блот)	47
2.11.2 Проведение анализа экспрессии мРНК дисферлина в миобластах, полученных путем миогенной дифференцировки (ПЦР-РВ)	47
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>48</b>
3.1 Сборка рекомбинантных лентивирусов для, транскрипционной активации CRISPR\Cas9 SAM	48
3.2 Проведение активации транскрипции гена дисферлина в культуре клеток HEK293A по технологии CRISPR/Cas9 SAM и определение оптимальной концентрации антибиотиков для селекции клеток HEK293A	50
3.2.1 Анализ активации транскрипции гена дисферлина по методике вестерн-блот	52
3.3 Сборка рекомбинантных лентивирусов, несущих MyoD для миогенной дифференцировки фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина	53
3.4 Трансдукция фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина рекомбинантными лентивирусами несущими MyoD для миогенной дифференцировки	54
3.5 Анализ эффективности миогенной дифференцировки (Вестерн-блот)	56
3.6 Проведение анализа экспрессии мРНК дисферлина в миобластах, полученных путем миогенной дифференцировки (ПЦР-РВ)	57
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>59</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>60</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Дисферлинопатии (ДП) — это группа нейромышечных заболеваний, вызванных мутацией трансмембранных белка дисферлина (*dystrophy-associated fer-1-like*). Дисферлин играет важную роль в процессе репарации при повреждении сарколеммы, что в свою очередь приводит к притоку ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [Vincent *et al.*, 2016].

Впервые дисферлинопатия была исследована японским ученым Миоши в 60-х годах прошлого века. В 1986 году вышла статья в которой говорилось о новом типе прогрессирующей мышечной дистрофии, основанной на исследованиях 17 (8 мужчин и 9 женщин) случаев проявления этого заболевания. Мышечная атрофия у пациентов была выражена в дистальных отделах ног, в особенности в икроножных и подошвенных мышцах [Miyoshi *et al.*, 1986].

На данный момент известно около 30 генов вызывающих дистрофию мышц конечностей. Дисферлинопатии встречаются с частотой от одного случая на 200 тысяч человек, а также одного на 1300 человек в зависимости от популяции. Наибольший процент встречаемости заболевания относится к странам с близкородственными браками, в таких странах дисферлинопатии могут достигать до 30 % взрослого населения [Umakhanova *et al.*, 2017].

На сегодняшний день эффективного метода лечения дисферлинопатий нет, большинство подходов терапии находятся на стадии клинических испытаний. Генная терапия является одним из наиболее перспективных вариантов для решения данной задачи.

Основными достижениями в последние годы в области технологий генной инженерии является система CRISPR (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9(англ. *CRISPR associated protein 9*). Используя эту систему, последовательности ДНК в геноме и их функциональные выходы теперь легко редактируются или модулируются геном любого организма [Hsu *et al.*, 2014]. Хотя геномные особенности

систем CRISPR / Cas9 еще предстоит изучать, но уже известно об их способности выполнять целенаправленные, высокоэффективные изменения последовательности генома и экспрессии генов, трансформировать биологические исследования и стимулировать разработку новых молекулярных методов лечения для человека [Paix *et al.*, 2016]. Система CRISPR / Cas9 представляет собой простой и быстрый инструмент, позволяющий эффективно модифицировать эндогенные гены разных типов клеток. Кроме того, ее модифицированная версия с транскрипционными репрессорами или активаторами позволяет осуществлять устойчивую репрессию или активацию транскрипции целевых генов [Hryhorowicz *et al.*, 2017]. С помощью дезактивированного белка Cas9 (dCas9, англ *nuclease-deactivated Cas9*), есть возможность ингибировать транскрипцию либо на уровне инициации, либо на уровне удлинения. В целом, контроль экспрессии генов зависит от возможности связывания dCas9 с доменом-активатором, таким как VP64, тем самым инициируя экспрессию необходимого гена [Baliou *et al.*, 2018].

Прямое перепрограммирование клеток, также называемое трансдифференцировкой, позволяет изменить один тип соматических клеток непосредственно в другой без необходимости перехода через индуцированное плюрипотентное состояние. Таким образом, этот подход интересен для лечения заболеваний и травм, где существует дефицит пролиферирующих клеток для восстановления тканей [Grath *et al.*, 2019]. Исследования показали, что белковая инженерия главного фактора транскрипции MyoD может усиливать превращение дермальных фибробластов человека в фенотип скелетных миоцитов. Слияние мощных доменов активации транскрипции с MyoD привели к увеличению экспрессии миогенных генов, образованию миофибрилл, слиянию клеток и глобальному перепрограммированию сети миогенных генов. Эти новые типы клеток могут затем использоваться для моделирования специфических для пациента заболеваний, скрининга лекарств или регенеративной медицины. Миогенное

репрограммирование, индуцированное сверхэкспрессией MyoD, широко изучалось как средство генной терапии на клеточной основе при нарушениях скелетных мышц, таких как мышечная дистрофия [Ami M et all 2015].

Поиск подхода генной терапии мышечных дистрофий требует соответствующей модели заболевания *in vitro*. Учитывая низкую распространенность миодистрофии, разнообразие мутаций и форм заболеваний, получение биопсии для выделения и культивирования клеток в лаборатории часто затруднено или невозможно. В данной связи создание в лабораторных условиях клеточных тест-систем (моделей заболеваний) из имеющегося биоматериала является первостепенной задачей с целью дальнейшего испытания генных препаратов для таких редких наследственных заболеваний, как дисферлинопатии.

В нашей работе мы создали два типа тест-систем с применением CRISPR/Cas9-SAM, а также MyoD-опосредованное прямое перепрограммирование, которое было достигнуто с использованием лентивируса, несущего домен активации транскрипции VP64, связанный с N-концом гена MyoD человека дикого типа. Транскрипционная активация мРНК гена дисферлина была проведена на клеточной модели HEK293A, тогда, как индукция дифференцировки миобластов проводилась на иммортализованных фибробластах пациента с дисферлинопатией.

Цель работы — создать два вида тест-систем с применением CRISPR/Cas9-SAM и MyoD-опосредованное перепрограммирование *in vitro* для разработки и скрининга лекарственных препаратов для терапии дисферлинопатии.

Для достижения цели, решались следующие задачи:

- 1) Провести сборку рекомбинантных лентивирусов для транскрипционной активации CRISPR\Cas9 SAM (SAM-gRNA1, SAM-gRNA4, dCas9-VP64, MS2-P65-HSF1).
- 2) Активировать транскрипцию гена дисферлина в культуре клеток HEK293A по технологии CRISPR/Cas9 SAM, провести анализ присутствия

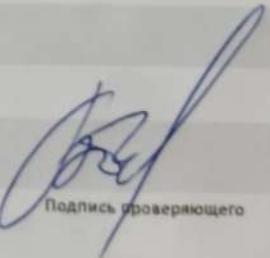
белка дисферлина в культуре клеток HEK293A после проведения активации транскрипции гена *DYSF*.

- 3) Провести сборку рекомбинантного лентивируса, несущего ген MyoD для миогенной дифференцировки фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина.
- 4) Провести трансдукцию фибробластов с мутацией в 26 экзоне гена дисферлина рекомбинантным лентивирусом, несущим ген MyoD для миогенной дифференцировки.
- 5) Провести анализ эффективности миогенной дифференцировки путем иммуноблоттинга. Подтвердить транскрипцию мРНК дисферлина в дифференцированных миобластах помощью полуколичественного анализа методом ПЦР в реальном времени.



## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
**Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы	Агиуллина Диана Рустамовна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Диплом
Название файла	Диплом_Тест_Системы.docx
Процент заимствования	8,73%
Процент цитирования	0,51%
Процент оригинальности	90,76%
Дата проверки	14:30:15 31 мая 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
ФИО проверяющего	
Дата подписи	31.05.2019
	 Подпись проверяющего

Чтобы убедиться  
в подлинности справки,  
используйте QR-код, который  
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.