

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.04.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Магистерская диссертация

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ В
НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ СВИНЕЙ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО
ВИРУСА СЕРОТИПА O1G001, КОДИРУЮЩЕГО ГЕН
АРИЛСУЛЬФАТАЗЫ А.

Работа завершена:

« 4 » 06 2023 г.



(Юсеф Али)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

« 4 » 06 2023 г.



(В. В. Соловьева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент кафедры генетики

« 4 » 06 2023 г.



(А. Р. Каюмов)

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Метахроматическая лейкодистрофия	8
1.2 Типы МЛД	8
1.3 Патогенез МЛД.....	9
1.4 Олигодендроциты	10
1.4.1 Типы олигодендроцитов.....	10
1.4.2 Дифференцировка и созревание олигодендроцитов	10
1.4.3 Синтез сульфатидов и их роль в дифференцировке олигодендроцитов.....	11
1.5 Подходы к лечению МЛД.....	12
1.5.1 Терапия стволовыми клетками.....	12
1.5.2 Фермент-заместительная терапия (ФЗТ).....	13
1.5.3 Генная терапия	14
Заключение	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
2.1 Объект, схема и методика исследования	21
2.2 Получение плазмидных векторов	21
2.3 Генетическая трансформация клеток <i>E.Coli</i>	22
2.4 Выделение плазмидной ДНК	23
2.5 Электрофорез в агарозном геле.....	23
2.6 Получение рекомбинантных аденоассоциированных вирусов AAVOlig001-ARSA	24
2.7 Трансдукция клеток SH-SY5Y.....	25
2.8 Вестерн блот анализ.....	25
2.9 Лабораторные животные и условия содержания	27
2.10 Забор материала	27
2.11 Гомогенизация органов.....	28
2.12 Определение ферментативной активности ARSA	28
2.13 Иммуногистохимический анализ	29
2.14 Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР).....	29

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Анализ плазмидных конструкций.....	31
3.2 Анализ экспрессии генов фермента ARSA в клетках SH-SY5Y.....	31
3.3. Определение ферментативной активности ARSA в клетках SH-SY5Y	32
3.4. Анализ уровня экспрессии гена <i>ARSA</i> в органах нервной системы свиней.....	33
3.5 анализ уровня ферментативной активности ARSA в органах нервной системы свиней.....	35
3.6 Динамика ферментативной активности ARSA в плазме крови и спинномозговой жидкости свиней	37
3.7 Иммуногистохимический анализ экспрессии <i>ARSA</i> в органах нервной системы свиней после введения AAVOlig001-CMVenCBh-ARSA..	38
ВЫВОДЫ	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	45

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

6-OHDA	6-гидроксидофамин
ААВ	аденоассоциированный вирус
Г.О.	грудной отдел
ГК/кг	геномная копия/килограмм
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ИГХ	иммуногистохимия
кДНК	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	колониеобразующие единицы
кПЦР	количественная полимеразная цепная реакция
ЛБН	лизосомные болезни накопления
ЛВ	лентивирусы
МЛД	метахроматическая лейкодистрофия
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
МСК	мезенхимные стволовые клетки
П.О	поясничный отдел
ПНС	Периферическая нервная система
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
РТПХ	болезнь трансплантата против хозяина
С.О.	стандартное отклонение
С.М.	спинной мозг
СМЖ	спинномозговая жидкость
ТАЕ	англ. Tris-acetate-EDTA
ФЗТ	фермент-заместительная терапия
ЦНС	центральная нервная система
Ш.О.	шейный отдел

ARSA	арилсульфатаза А (англ. Arylsulfatase A)
CSPG4	хондроитинсульфатный протеогликан 4 (англ. chondroitin sulfate proteoglycan 4)
DMEM	англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Фосфатно-солевой раствор Дульбекко (англ. Dulbecco's phosphate-buffered saline)
GalCer	галактозилцерамида (англ. Galactosylceramide)
ITR	инвертированные концевые повторы (англ. Inverted terminal repeats),
LS-LB	англ. low salt Luria-Bertani
MOI	множественность инфекции (англ. Multiplicity of infection)
OMIM	база данных наследственных заболеваний человека (англ. Online Mendelian Inheritance in Man)
OPCs	клетки-предшественники олигодендроцитов (англ. Oligodendrocytes precursor cells)
PBS	натрий-фосфатный буфер (англ. Phosphate-buffered saline)
PDGFR α	α -субъединицы рецептора тромбоцитарного фактора роста (англ. α -subunit of the platelet derived growth factor receptor)
pH	водородный показатель
PMO	премиелинизирующие олигодендроциты (англ. premyelinating oligodendrocytes)
PSAP	просапозин (англ. prosaposin)
rhARSA	рекомбинантный человеческий ARSA (англ. Recombinant human ARSA)
ρ .NCS	ρ -Нитрокатехол сульфат (англ. ρ - Nitrocatechol Sulfate)

ВВЕДЕНИЕ

Лизосомальные болезни накопления (ЛБН) представляют собой группу генетических заболеваний, характеризующихся накоплением определенных веществ в различных органах тела в больших количествах. Обычно эти заболевания связаны с дисфункцией лизосом. Эта дисфункция в большинстве случаев вызвана мутациями в генах, кодирующих лизосомные ферменты. [Rajkumar, Dumbre, 2023]. Более 70 заболеваний были идентифицированы как ЛБН. Эти заболевания в основном наследуются по аутосомно-рецессивному типу, а 3 из них сцеплены с X-хромосомой [Platt *et al.*, 2018]. Накопление макромолекул в лизосомах приводит к клеточной дисфункции, повышению уровня апоптоза и, в конечном итоге, к увеличению или дисфункции пораженного органа [Alkhzouz *et al.*, 2021].

К этой группе заболеваний относится метахроматическая лейкодистрофия (МЛД, OMIM 250100), впервые описанная Scholz в 1925 г. Это заболевание вызывается мутациями в гене арилсульфатазы А (*ARSA*), приводящими к накоплению сульфатидов в органах нервной системы и некоторых других внутренних органах. Накопление сульфатидов приводит в итоге к повреждению миелиновой оболочки и нейродегенерации, а в некоторых случаях (в зависимости от вида) — к летальному исходу [Ferreira, Gahl, 2017].

До сих пор МЛД считается неизлечимым. Сообщалось о нескольких клинических испытаниях с использованием терапии по уменьшению количества субстрата и трансплантации пуповинной крови. Но эти методы не считаются надежными, так как не могут предотвратить обострение заболевания. В то время как новые подходы к генной терапии, использующие векторы для доставки гена дикого типа, выглядят многообещающе. Среди этих векторов есть аденоассоциированные вирусы (ААВ), и с использованием этих векторов было проведено несколько исследований с обнадеживающими результатами.

Настоящая работа проводится с использованием относительно нового серотипа AAV/Olig001 для доставки кодон-оптимизированного гена *ARSA* в нервную систему крупных лабораторных животных.

Целью работы являлось оценить эффективность доставки кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности гена *ARSA* с использованием AAV серотипа Olig001 в нервную систему крупных лабораторных животных.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Разработать генетическую конструкцию на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа Olig001, кодирующую кодон-оптимизированную кДНК гена *ARSA*.
2. Получить и охарактеризовать клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y, генетически модифицированную с помощью AAV/Olig001-ARSA.
3. Оценить биораспределение, уровень экспрессии гена *ARSA* и ферментативной активности ARSA в нервной системе свиней после интратекального введения.

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

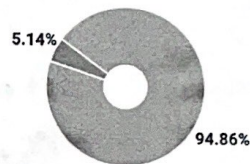
ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ STRUCTURE

Автор работы: Юсеф Али Мохамед
Самоцитирование
рассчитано для: Юсеф Али Мохамед
Название работы: Юсеф_Али_Магистерская_диссертация
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВПАДЕНИЯ	5.14%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	94.86%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 01.06.2023



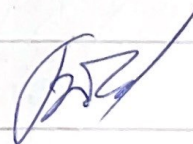
Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с. 1-29

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи:



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.