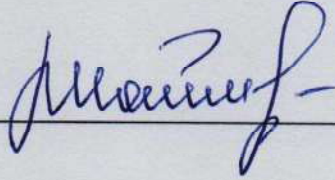


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ  
КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление подготовки: 06.04.01– Биология


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ  
РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ,  
ОДНОВРЕМЕННО ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕНЫ  $\alpha$ - И  $\beta$ -  
СУБЪЕДНИЦ  $\beta$ -ГЕКСОЗАМИНИДАЗЫ А

Студент 2 курса

"06" 05 2020г.  (А.А. Шаймарданова)

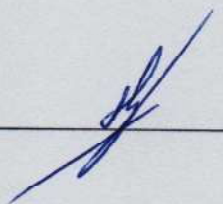
Научный руководитель

к.б.н., доцент

"06" 05 2020г.  (В.В. Соловьева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"06" 05 2020г.  (В.М. Чернов)

Казань–2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1 Болезнь Тея-Сакса .....	7
1.2 Методы терапии БТС.....	8
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	17
2.1 Объект, схема и методика исследования .....	17
2.2 Описание плазмидных векторов .....	17
2.3 Кодонная оптимизация нуклеотидных последовательностей генов	17
2.4 Создание плазмид pLX303-HEXA-IRES-HEXB, pLX303-HEXA, pLX303-HEXB, pAAV-HEXA, pAAV-HEXB.....	19
2.5 Проведение генетической трансформации клеток <i>Escherichia coli</i> .	19
2.6 Генетическая трансформация бактериальных клеток .....	<b>Ошибка!</b>
<b>Закладка не определена.</b>	
2.7 Криоконсервация бактериальной культуры .....	20
2.8 Выделение плазмидной ДНК .....	21
2.9 Электрофорез в агарозном геле .....	21
2.10 Клеточные линии, используемые в работе .....	22
2.11 Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани .....	23
2.12 Пассирование клеточных линий.....	23
2.13 Криоконсервация клеточных линий.....	24
2.14 Генетическая модификация клеток HEK293T.....	24
2.15 Сбор кондиционированной среды .....	25
2.16 Определение общего содержания белка с помощью бицинониновой кислоты.....	25
2.17 Вестерн блот анализ.....	25
2.18 Определение ферментативной активности .....	27
2.19 Получение рекомбинантных лентивирусов LV-HEXA, LV-HEXB, LV-HEXA-IRES-HEXB.....	27
2.20 Получение рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов AAV-HEXA, AAV-HEXB.....	28
2.21 Генетическая модификация МСК .....	28
2.22 Количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР).....	29
2.23 Введение лабораторным крысам генетически модифицированных кМСК и анализ ферментативной активности HexA в плазме крови .....	29
2.24 Гомогенизирование органов крыс .....	31
2.25 Определение соотношения живых и мертвых клеток в иммунных органах крыс .....	31
2.26 Мультиплексный анализ цитокинов, хемокинов и факторов роста .....	31
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	33
3.1 Получение генетических конструкций pLX303-HEXA-IRES-HEXB, pLX303-HEXA, pLX303-HEXB, pAAV-HEXA, pAAV-HEXB.....	33
3.2 Генетическая модификация клеток HEK293T.....	34

3.3 Определение общей ферментативной активности <i>Hex</i> и активности <i>HexA</i> в кондиционированной среде трансфицированных клеток <i>HEK293T</i> .....	34
3.4 Анализ экспрессии белков <i>HEXA</i> и <i>HEXB</i> .....	36
3.5 Получение рекомбинантных вирусных векторов .....	37
3.6 Выделение первичных линий клеток и их генетическая модификация .....	38
3.7 Определение количества мРНК трансгена в генетически модифицированных чМСК .....	39
3.8 Определение ферментативной активности гексозами니다зы <i>A</i> в кондиционированной среде трансдуцированных мезенхимных стволовых клеток .....	40
3.9 Введение лабораторным крысам кМСК, трансдуцированных <i>AAV-HEXA+AAV-HEXB</i> или <i>LV-HEXA+LV-HEXB</i> , и анализ ферментативной активности <i>HexA</i> .....	44
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	50
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	53
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А</b> .....	59

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Тея-Сакса (БТС, OMIM 272800) — наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное дефицитом фермента  $\beta$ -гексозаминидазы А (HexA), в результате чего происходит накопление GM2-ганглиозидов в нервной и других тканях организма. Дефицит фермента возникает вследствие различных мутаций гена *HEXA*. Тяжесть клинических признаков при БТС определяется остаточной активностью HexA, зависящей от типа (вида) мутации. В настоящее время не существует эффективного лечения болезни БТС. Описаны клинические случаи применения субстрат-редуцирующей терапии, трансплантации костного мозга или пуповинной крови, однако терапевтическая эффективность данных методов остается недостаточной для предотвращения усугубления неврологических нарушений у пациентов с БТС. Обнадёживающие результаты получены с использованием методов генной терапии для доставки генов дикого типа, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы фермента HexA.

В настоящей работе предлагается способ клеточно-опосредованной генной терапии, суть которого заключается в модификации аллогенных мезенхимных стволовых клеток (МСК) генетической конструкцией, кодирующей гены HexA, и введении полученных клеток пациенту внутривенно.

Цель работы — разработка метода генно-клеточной терапии болезни Тея-Сакса с применением аллогенных мезенхимных стволовых клеток, генетически модифицированных рекомбинантными лентивирусами, кодирующими кДНК генов *HEXA* и *HEXB* человека.

Задачи работы:

- 1) Разработать и синтезировать плазмидные конструкции pLX303-HEXA-IRES-HEXB, pLX303-HEXA, pLX303-HEXB, pAAV-HEXA, pAAV-HEXB. Подтвердить правильность сборки генетических конструкций рестрикционным анализом;

2) Провести генетическую модификацию клеток HEK293T с помощью плазмид pLX303-HEXA-IRES-HEXB, pLX303-HEXA, pLX303-HEXB, pAAV-HEXA, pAAV-HEXB и проанализировать ферментативную активность HexA и общую ферментативную активность Hex в генетически модифицированных клетках. Проанализировать экспрессию рекомбинантных белков HEXA и HEXB в генетически модифицированных клетках HEK293T методом вестерн блота;

3) Получить в препаративных количествах рекомбинантные лентивирусы LV-HEXA-IRES-HEXB, LV-HEXA, LV-HEXB и адено-ассоциированные вирусы AAV-HEXA и AAV-HEXB;

4) Выделить мезенхимные стволовые клетки (чМСК) из жировой ткани человека выделить и провести их генетическую модификацию рекомбинантными лентивирусами LV-HEXA-IRES-HEXB, LV-HEXA, LV-HEXB и рекомбинантными адено-ассоциированным вирусом AAV-HEXA, AAV-HEXB. Оценить уровень экспрессии мРНК генов HEXA и HEXB в генетически модифицированных чМСК. Проанализировать ферментативную активность HexA и общую ферментативную активность Hex в генетически модифицированных чМСК;

5) Полученными LV-HEXA+LV-HEXB и AAV-HEXA+AAV-HEXB модифицировать крысиные МСК (кМСК), ввести аллогенные модифицированные кМСК лабораторным крысам внутривенно. Проанализировать эффективность и безопасность генно-клеточного препарата.

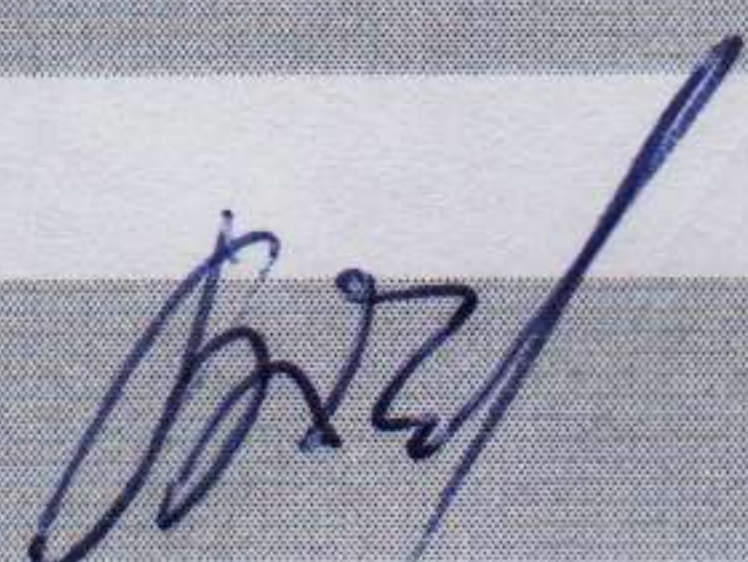




## СПРАВКА

### о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.Структура

Автор работы	Шаймарданова Алиса Алмазовна
Подразделение	
Тип работы	Не указано
Название работы	Шаймарданова Алиса Магистерская диссертация 22052020
Название файла	Шаймарданова Алиса Магистерская диссертация 22052020.docx
Процент заимствования	12.75 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.32 %
Процент оригинальности	86.93 %
Дата проверки	16:09:57 22 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Модуль выделения библиографических записей; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по elibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	22.05.2020  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.