

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

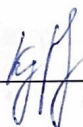
Специальность: 06.04.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Магистерская диссертация

РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ
РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 1

Работа завершена:

« 9 » 06 2023 г.



(А.В. Курненко)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

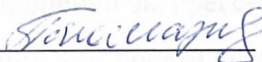
« 9 » 06 2023 г.



(В.В. Соловьева)

м.н.с., НИЛ «Генные и клеточные технологии»

« 14 » 06 2023 г.



(А.С. Пономарев)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 14 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

СОДЕРЖАНИЕ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Патопфизиология и диагностика АРВИ	8
1.2 Мутации гена трансглутаминазы-1 (TGM1) при аутосомно-рецессивном врожденном ихтиозе	12
1.3 Трансглутаминазы и их роль в формировании ороговевшей клеточной оболочки	13
1.4 Генная терапия.....	17
1.4.1 Генная терапия кожи.....	20
1.5 Аденоассоциированные вирусы	21
Заключение.....	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1 Разработка генетических конструкций	24
2.1.1 Получение плазмидного вектора.....	24
2.1.2 Получение рекомбинантного аденоассоциированного вируса	25
2.2 Анализ генетических конструкций in vitro.....	26
2.2.1 Культивирование и генетическая модификация различных клеточных культур	26
2.2.2 Оценка жизнеспособности клеток.....	27
2.2.3 Метод количественной оценки экспрессии мРНК генов с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени	28
2.2.4 Вестерн-блот анализ	29
2.2.5 Иммуноцитохимический анализ.....	30
2.3 In vivo методы анализа генетических конструкций.....	31
2.3.1 Введение генетической конструкции лабораторным животным.....	31
2.3.2 Иммуногистохимия.....	31

2.3.3 Окрашивание гематоксилин-эозином	31
2.4 Статистическая обработка результатов	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	33
3.1 Кодонная оптимизация	33
3.2. Иммуноцитохимический анализ секреции белка TGM1 в различных клеточных культурах.....	36
3.3 Исследование влияния вирусного вектора на жизнеспособность культивируемых НЕК293Т на 3 и 7 сутки.....	38
3.4 Иммуногистохимический анализ срезов кожи свиней.....	41
3.5 Оценка биохимических показателей крови свиней.....	43
ВЫВОДЫ	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	47

АДВ	аденовирусный вирус
АДЭ	аденовирусная инфекция
БЭВ	белки вирусной оболочки
АВФ-2	аденоассоциированный вирус серотипа 2
СКН	стандовые клетки кератиноцитов
АДВВ	аденоассоциированный вирус
од-ДНК	одностранный ДНК
дв-ДНК	двухстранный ДНК
дТАВ	двухассоциированный вирус дельта
АСТ	аскорбаттрансафераза
АЛТ	аланинаминотрансфераза
ГВН	гемоглобин
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством лекарств, продуктов и медицинских устройств

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APVI	аутосомно-рецессивный врожденный ихтиоз
ЛИ	ламеллярный ихтиоз
acylCer	ω -ацилцерамидов
ЛОК	липидная оболочка корнеоцитов
ОКО	ороговевшая клеточная оболочка
HGMD	Human Gene Mutation Database, база данных мутаций генов человека
PC	роговой слой
STS	стероидная сульфатаза
CSO4	сульфат холестерина
AAB	аденоассоциированный вирус
ABE	adenine base editors, редактор адениновых оснований
ББП	белки, богатые пролином
ABV-2	аденоассоциированный вирус серотипа 2
СКК	стволовые клетки кератиноцитов
рABV	рекомбинантный аденоассоциированный вирус
оц-ДНК	одноцепочечная ДНК
дц-ДНК	двуцепочечная ДНК
дтABV	аденоассоциированный вирус дикого типа
АСТ	аспартатаминотрансфераза
АЛТ	аланинаминотрансфераза
ПЙ	пропидиум йодид
FDA	Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

ВВЕДЕНИЕ

Ихтиоз – это обобщающий термин для более чем 50 типов, обычно моногенных, заболеваний, все из которых характеризуются широко распространенным гиперкератозом, ксерозом и шелушением кожи [Vahlquist, *et al.* 2020].

Ламеллярный ихтиоз представляет собой неизлечимое наследственное кожное заболевание, связанное с ороговением, характеризующееся сухой, грубой кожей с заметным шелушением [Jaffar, *et al.* 2023]. Заболевание относится к аутосомно-рецессивному врожденному ихтиозу (АРВИ) и характеризуется общим обнаружением аномальной барьерной функции, что приводит к повышенной трансэпидермальной потере воды и компенсаторной гиперпролиферации [Troiano, *et al.* 2020]. Повышенная трансэпидермальная потеря воды и тепла приводит к гипернатриемическому обезвоживанию, другим нарушениям электролитного баланса, нарушенной терморегуляции и недостаточному потреблению калорий [Craiglow 2013]. Кроме того, при АРВИ отмечается повышение риска развития кожных инфекций, что зачастую приводит к сепсису и летальному исходу.

Мутации зародышевой линии в гене *TGM1*, который кодирует фермент трансгултаминазу 1 (TGM1), являются основной причиной общих АРВИ и в частности, ламеллярного ихтиоза [Freedman, *et al.* 2021]. Эти мутации в гене *TGM1* вызывают аномальную дифференцировку эпидермиса и нарушение барьерной функции кожи, наблюдаемые у пациентов с АРВИ. Ихтиоз значительно ухудшает качество жизни: заболевание оказывает негативное влияние на жизнь пациентов, и несколько исследований показали, что у детей показатели хуже, чем у взрослых [Troiano, *et al.* 2020].

В настоящее время не существует специфического терапевтического подхода, направленного на молекулярную причину дефицита TGM1 и применяемого в клинических условиях. Современное лечение ихтиоза сосредоточено на облегчении симптомов и включает смягчающие средства,

кератолитики, пероральные ретиноиды, аналоги витамина А, для улучшения состояния пациентов [Joosten, *et al.* 2022, Paller, *et al.* 2017]. Однако ретиноиды могут усугублять воспаление кожи и зуд и оказывать вредное воздействие (гипертриглицеридемия, тератогенность, гиперостоз), что ограничивает их использование [Paller, *et al.* 2017].

Таким образом, существует значительная потребность в разработке терапии, направленной на причину заболевания, а именно на мутацию в гене TGM1 приводящей к дефициту одноименного фермента. Генная терапия, основанная на переносе функционального гена с помощью аденоассоциированного вируса, позволит восстановить уровень функционально-активного белка TGM1 в эпидермисе, тем самым улучшив патологическое состояние пациента.

Цель работы состояла в получении рекомбинантной генетической конструкции, содержащей ген трансглутаминазы 1 и анализе продукта экспрессии данного гена.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Разработать и оценить правильность сборки рекомбинантной плазмидной конструкции на основе аденоассоциированного вируса, кодирующей кДНК гена *TGM1* (pAAV-TGM1).
2. Оценить функциональную активность плазмидной конструкции pAAV-TGM1 в культуре эмбриональных клеток почки и фибробластов человека.
3. Получить рекомбинантный аденоассоциированный вирус, содержащий ген *TGM1* (AAV-TGM1), и исследовать уровень экспрессии этого гена в различных культурах генетически модифицированных клеток.
4. Оценить жизнеспособность эмбриональных клеток почки человека после генетической модификации pAAV-TGM1.

5. Оценить экспрессию *TGM1* при подкожном введении rAAV-TGM1 и выявить влияние на биохимические показатели сыворотки крови на модели свиней.

В 2009 году на конференции по патологии в Оксфорде были определены классификация заболеваний, нарушающих кератиноциты [Mazuchal et al. 2016, 11]. Эта система номенклатуры делит их на две основные группы: наследственные и синдромные формы. В такой классификации можно выделить подгруппы, основанные на идентификации мутаций в генах, кодирующих структурные компоненты кератина. Данные мутации участвуют в различных процессах клеточной адгезии и дифференциации кератиноцитов, а также гемодинамики, но, в основном, для кератиноцитов (структурных) и функциональных рогового слоя эпидермиса [Liu et al. 2010]. Ниже, в таблице 1, приведена классификация основных форм кератина.

СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Курненко А.В.
Самоцитирование
рассчитано для: Курненко А.В.
Название работы: РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
КОНСТРУКЦИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ТРАНСГЛУТАМИНАЗЫ 1
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	2.65%	СОВПАДЕНИЯ	2.65%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	97.35%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	97.35%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 05.06.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 05.06.2023 10:48

Структура документа: Проверенные разделы: содержание с.1-2, основная часть с.3-36
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 СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; 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: Каюмов Айрат Рашитович

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.