

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

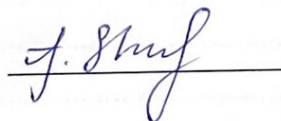
Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GM2-ГАНГЛИОЗИДОВ
IN VITRO

Работа завершена:

« 6 » 06 2023 г.



(А.А. Шаршакова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

« 6 » 06 2023 г.



(В.В. Соловьёва)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Синтез и функция фермента НехА.....	8
1.2 Механизм развития заболевания.....	9
1.3 Диагностика.....	10
1.4 Патогенез GM2-ганглиозидозов.....	11
1.4.1 Инфантильная форма.....	11
1.4.2 Ювенильная форма.....	12
1.4.3 Взрослая форма.....	13
1.5 Моделирование заболевания.....	14
1.6 Методы лечения.....	15
1.6.1 Субстрат-редуцирующая терапия.....	16
1.6.2 Ферментозаместительная терапия.....	17
1.6.3 Ферментоусиливающая терапия.....	18
1.6.4 Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.....	18
1.6.5 Генная терапия.....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	24
2.1 Клеточные линии, используемые в работе.....	24
2.1.1 Эмбриональные клетки почки человека.....	24
2.1.2 Клетки нейробластомы человека.....	24
2.1.3 Клетки аденокарциномы человека.....	24
2.1.4 Клетки опухоли головного мозга человека.....	25
2.2 Пассирование клеточных линий.....	25
2.3 Получение генетически модифицированных клеток.....	25
2.3.1 Разработка генетических конструкций.....	25
2.3.2 Электрофорез в агарозном геле.....	26

2.3.3 Выделение плазмидной ДНК (maxiprep).....	27
2.3.4 Трансфекция культур клеток HEK293, SH-SY5Y, MCF7 и SNB-19 плазмидными конструкциями pAAV-HEXA-P2A-HEXB, pAAV-HEXA, pAAV-HEXB и pAAV-HEXM.....	28
2.3.5 Получение рекомбинантных аденоассоциированных вирусов.....	29
2.3.6 Генетическая модификация HEK293, SH-SY5Y, MCF7 и SNB-19 ..	30
2.4 Анализ проведенной трансфекции и трансдукции культур клеток HEK293, SH-SY5Y, MCF7 и SNB-19	31
2.4.1 Сбор кондиционированной среды.....	31
2.4.2 Выделение мРНК из генетически модифицированных клеток.....	31
2.4.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	32
2.4.4 Вестерн-блот анализ	32
2.4.5 Определение ферментативной активности HexA.....	33
2.4.6 Иммуноцитохимия.....	34
2.5 Статистический анализ.....	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	36
3.1 Получены плазмидные конструкции pAAV-HEXA, pAAV-HEXB, pAAV- HEXA-P2A-HEXB, pAAV-HEXM, содержащие уникальные кодон- оптимизированные последовательности генов <i>HEXA</i> , <i>HEXB</i> и <i>HEXM</i> и на их основе были созданы рекомбинантные аденоассоциированные вирусы AAV9-HEXA, AAV9-HEXB, AAV9-HEXA-P2A-HEXB и AAV9-HEXM... 36	36
3.2 Генетически модифицированные HEK293, SH-SY5Y, MCF-7 и SNB-19 экспрессируют гены <i>HEXA</i> , <i>HEXB</i> и <i>HEXM</i> после трансфекции плазмидными конструкциями pAAV-HEXA, pAAV-HEXB, pAAV-HEXA- P2A-HEXB, pAAV-HEXM.....	41
3.3 Генетически модифицированные HEK293, SH-SY5Y, MCF7 и SNB-19 экспрессируют гены <i>HEXA</i> , <i>HEXB</i> и <i>HEXM</i> после трансдукции аденоассоциированными вирусами 9-го серотипа AAV9-HEXA, AAV9- HEXB и AAV9-HEXM.....	47
ВЫВОДЫ.....	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААВ	Аденоассоциированный вирус
АГ	Аппарат Гольджи
БС	Болезнь Сандхоффа
БТС	Болезнь Тея-Сакса
ГЭБ	Гематоэнцефалический барьер
ИПСК	Индукцированная плюрипотентная стволовая клетка
ИЦХ	Иммуноцитохимия
КС	Кондиционированная среда
ЛБН	Лизосомальные болезни накопления
МУГ	4-метилумбеллиферил-бета-D-N-ацетилглюкозамин
МУГС	4-метилумбеллиферил-бета-D-N-ацетилглюкозамин-6- сульфат
М6Ф	Маннозо-6-фосфат
М6ФР	Маннозо-6-фосфатные рецепторы
НСК	Нейрональная стволовая клетка
оРНК	Общая рибонуклеиновая кислота
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
СК	Стволовая клетка
СМЖ	Спинномозговая жидкость
С.О.	Стандартное отклонение
СРТ	Субстрат-редуцирующая терапия
ТГСК	Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ФЗТ	Фермент-заместительная терапия
ЦНС	Центральная нервная система
ЭПР	Эндоплазматический ретикулум
<i>GM2A</i>	Ген, кодирующий белок-активатор GM2A

HexA	β -гексозаминидаза A
HEXA	Ген, кодирующий α -субъединицу β -гексозаминидазы A
HEXB	Ген, кодирующий β -субъединицу β -гексозаминидазы A
HEXM	Ген, кодирующий химерную μ -субъединицу
MOI	множественность инфекции
P2A	2A пептид тешовируса свиней 1-го серотипа

ВВЕДЕНИЕ

GM2-ганглиозидозы – это группа заболеваний, относящаяся к лизосомальным болезням накопления (ЛБН) и характеризующаяся накоплением GM2-ганглиозидов в лизосомах клеток в результате мутаций в генах, кодирующих субъединицы фермента β -гексозаминидазы А (HexA) или белка-активатора GM2A. HexA является гетеродимером, который состоит из α - и β -субъединиц, которые кодируются генами *HEXA* и *HEXB*, соответственно. Были описаны три вида GM2-ганглиозидозов: Болезнь Тея-Сакса (БТС), Болезнь Сандхоффа (БС) и АВ-вариант [Leal *et al.*, 2020]. На данный момент не существует одобренной терапии для GM2-ганглиозидозов. Несмотря на то, что генетические основы этих заболеваний давно известны, многие молекулярные механизмы, от возникновения мутаций до накопления GM2-ганглиозидов, остаются не выясненными. Для лечения пациентов с GM2-ганглиозидозами были опробованы несколько стратегий терапии такие как субстрат-редуцирующая (СРТ) и фермент-заместительная терапия (ФЗТ), применение фармакологических шаперонов, трансплантация костного мозга или пуповинной крови. Однако, все перечисленные методы не являются достаточно эффективными, так как они не устраняют дальнейшее развитие неврологических нарушений у пациентов. В настоящее время наиболее перспективным методом лечения является генная терапия, так как она продемонстрировала наилучшие результаты на модельных животных. Более того, генная терапия позволяет подкорректировать состояние больного на молекулярном уровне и предотвратить дальнейшую прогрессию заболевания [Cachon-Gonzalez *et al.*, 2018].

Настоящая работа направлена на изучение перспективных генетических конструкций для генной терапии GM2-ганглиозидозов *in vitro*. Для этого были разработаны и проанализированы генетические конструкции, представляющие собой плазмидные векторы, содержащие кодон-оптимизированные последовательности генов *HEXA*, *HEXB*, а также

последовательность химерного гена *HEXM*. Также для данной работы были сконструированы и проанализированы генетические конструкции, представляющие собой рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (AAV), содержащие кодон-оптимизированные последовательности генов *HEXA*, *HEXB* и *HEXM*. Полученные конструкции были использованы для генетической модификации клеточных линий HEK293A, SH-SY5Y, MCF-7, SNB-19. Далее мы изучали эффективность генетической модификации путем проведения ПЦР-РВ, теста на активность фермента в кондиционированной среде (КС), иммуноцитохимии (ИЦХ) и вестерн-блот анализа.

Цель работы – разработать и проанализировать генетические конструкции рAAV-HEXA, рAAV-HEXB, рAAV-HEXA-P2A-HEXB, рAAV-HEXM и полученные на их основе AAV 9-го серотипа для генной терапии GM2-ганглиозидозов *in vitro*.

В работе решались следующие **задачи**:

1) Создать плазмидные конструкции рAAV-HEXA, рAAV-HEXB, рAAV-HEXA-P2A-HEXB, рAAV-HEXM, содержащие уникальные кодон-оптимизированные последовательности генов *HEXA*, *HEXB*, *HEXM* и получить на их основе рекомбинантные аденоассоциированные вирусы AAV9-HEXA, AAV9-HEXB, AAV9-HEXA-P2A-HEXB и AAV9-HEXM.

2) Генетически модифицировать линии клеток HEK293A, SH-SY5Y, MCF-7, SNB-19 с помощью плазмидных конструкций рAAV-HEXA, рAAV-HEXB, рAAV-HEXA-P2A-HEXB, рAAV-HEXM. Проанализировать уровень экспрессии генов *HEXA*, *HEXB* и *HEXM* путем ПЦР-РВ, вестерн-блот и теста на активность HexA.

3) Генетически модифицировать линии клеток HEK293A, SH-SY5Y, MCF-7, SNB-19 с помощью полученных AAV-HEXA, AAV-HEXB и AAV-HEXM. Проанализировать уровень экспрессии генов *HEXA*, *HEXB* и *HEXM* путем ПЦР-РВ, ИЦХ и теста на активность HexA.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.СТРУКТУРА

Автор работы: Шаршакова Александра Александровна
Самоцитирование
рассчитано для: Шаршакова Александра Александровна
Название работы: РАЗРАБОТКА И АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GM2-ГАНГЛИОЗИДОЗОВ IN VITRO
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

СОВПАДЕНИЯ	15%	СОВПАДЕНИЯ	15%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 29.05.2023

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 29.05.2023 18:02

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1, 4-34, содержание с.2-3
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.