

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

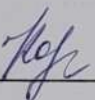
Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА NLRP3 ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ  
MIR-223 НА IN VITRO МОДЕЛИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ

Работа завершена:

«5» 06 2022 г.



(Я.М.Козловская)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., стар. преп.

«6» 06 2022 г.



(Е.Е. Гаранина)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

«6» 06 2022 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b> .....	2
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	10
1.1 Рак предстательной железы.....	10
1.1.1 Клиническая картина заболевания.....	10
1.1.2 Клеточные линии, созданные из тканей РПЖ.....	11
1.2 Инфламасомы и их структура.....	12
1.2.1 Активация инфламасомы NLRP3.....	13
1.2.2 Роль NLRP3-инфламасомы в прогрессировании рака предстательной железы.....	15
1.3 Микро РНК.....	17
1.3.1 miR-223 и NLRP3 сигналинг.....	18
1.3.2 miR-223 при РПЖ.....	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	21
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	21
2.1 Культивирование клеточной линии РС3.....	21
2.2 Получение лентивируса LV-miR223-Decoy.....	21
2.3 Концентрирование лентивирусных частиц.....	23
2.3.1 Получение стабильной клеточной линии РС3-miR223-Decoy.....	23
2.4 Обработка клеток.....	23
2.5 Выделение тотальной РНК и белков.....	23
2.6 Реакция обратной транскрипции.....	25

2.7 ПЦР в реальном времени.....	25
2.8 Анализ экспрессии белка NLRP3 методом иммуноблоттинга ...	26
2.9 Мультиплексный анализ.....	27
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>29</b>
3.1 Получение стабильной клеточной линии PC3 со сниженной экспрессией miR-223.....	29
3.2 Оценка экспрессии генов активации инфламмосомы NLRP3 в клеточных линиях методом ПЦР-РВ.....	30
3.3. Анализ экспрессии белков NLRP3 и CASP1 <i>in vitro</i> методом вестерн блота.....	32
3.4 Анализ профиля секреции цитокинов и хемокинов по технологии xMAP Luminex.....	33
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>36</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>37</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

APS	Персульфат аммония
AR	Андрогеновый рецептор
ASC/ PYCARD	Цитозольный адаптерный белок
CARD	( <i>Caspase activation and recruitment domain</i> ) Домен активации и рекрутирования каспаз
CASP1	Каспаза-1
CAT	Каталаза
CO <sub>2</sub>	Диоксид углерода
DAMPs	( <i>Damage-associated molecular pattern</i> ) Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями
DMEM	Среда, модифицированная по методу Дульбекко
DOC	Орнитиндекарбоксилаза
ECM	( <i>Extracellular matrix</i> ) Внеклеточный матрикс
EGCG	Галлат эпигаллокатехина
EGF	Эпидермальный фактор роста
FOXO1	Фактор транскрипции, который у человека кодируется геном FOXO1
GR	Глутатионредуктаза
GST	Глутатион-S-трансфераза
IGF - I	( <i>Insulin-like growth factor</i> ) Инсулиноподобный фактор роста 1
IL-18	( <i>Interleukin 18</i> ) Интерлейкин- 18
IL-1 $\beta$	( <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i> ) Интерлейкин -1 бета
ITGA3	Интегрин альфа-3

ITGB1	Интегрин бета-1
KEGG	Киотская энциклопедия генов и геномов
LPS	Липополисахарид
LRR	Богатые лейцином повторы
mQ	Деионизированная вода
NACHT	Домен, содержащий белки NAIP, CIITA, NET-E и TEP1
NF-κB	Фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла
NLR	<i>(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors)</i> Нуклеотид-связывающие олигомеризацию доменоподобные рецепторы
NLRP3	Домен пирина семейства NLR, содержащий рецептор 3
PAMPs	<i>(Pathogen-associated molecular pattern)</i> Связанные с патогенами молекулярные паттерны
PBS	Фосфатно-солевой буфер
PC3	Клеточная линия рака простаты
PC3 miR-223	Клеточная линия рака простаты со сниженной экспрессией miR-223
Decoy	эксепрессией miR-223
PVDF	Поливинилиденфторид
PYD	Пириновый домен
pH	Водородный показатель
RISC	РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс
SDS	Натрий додецилсульфат
TEMED	Тетраметилэтилендиамин
TLR	Toll-подобные рецепторы

Tris-HCl	Трис гидрохлорид
UTR	( <i>Untranslated region</i> ) Нетранслируемая область
ДГПЖ	Доброкачественная гиперплазия предстательной железы
кДНК	комплементарная ДНК
ЛУ	Лимфатические узлы
мг	миллиграмм
мин	минута
мкг	микрограмм
мкл	микролитр
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
нг	нанограмм
нг/мкл	нанограмм на микролитр
ПААГ	Полиамилакрид
ПЖ	Предстательная железа
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РПЖ	Рак предстательной железы
сек	секунда
см	сантиметр
тыс.	тысяч
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний в мире и одной ведущих причин смерти от рака у мужчин в экономически развитых странах [Белёв в соавт., 2014].

Распространенность РПЖ зависит от этнических и географических особенностей. Наиболее высокая заболеваемость наблюдается у афроамериканцев, проживающих в США (на 60% выше, чем у американцев европеоидной расы), наименее высокая – у мужчин, проживающих в Китае [Tan *et al.*, 2016; Stanford *et al.*, 1999]. Помимо расовых особенностей к факторам риска развития РПЖ относят генетическую предрасположенность, возраст мужчины и особенности питания. Вероятность развития опухоли предстательной железы (ПЖ) у мужчины, у которого один из ближайших родственников первой степени родства (отец или брат) болел РПЖ, выше в 1,8 раза, чем если болели двое родственников или более (отец и брат или оба брата), риск заболевания РПЖ возрастает в 5,51 и 7,71 раза, соответственно [Steinberg *et al.*, 1990; Stewart *et al.*, 2017]. Также риск развития РПЖ повышается у мужчин, употребляющих большое количество жиров животного происхождения [Denis *et al.*, 1999].

В России РПЖ занимает второе место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями у мужчин (14,9%) и третье место в структуре смертности (8,2%) [Алексеев в соавт., 2020].

Хроническая воспалительная микросреда является одним из предрасполагающих факторов, которые могут стимулировать злокачественную трансформацию [Zhang *et al.*, 2017]. Микроокружение опухоли содержит разнообразные воспалительные компоненты, лейкоциты, провоспалительные цитокины и опухолевые клетки, которые могут способствовать ангиогенезу, росту опухоли и метастазированию [Li *et al.*, 2017]. Инфламмасома представляет внутриклеточный олигомерный белковый

комплекс, который играет ключевую роль в регуляции воспаления [Afonina *et al.*, 2017]. Инфламмосомы активируются в ответ на молекулярные паттерны, связанные с патогенами (PAMPs), и молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMPs), высвобождаемые из инфицированных клеток, поврежденных тканей и опухолей. PAMPs и DAMPs связываются с Toll-подобными рецепторами (TLR) и запускают экспрессию про-воспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18. Активность наиболее изученной NLRP3-инфламмосомы, содержащей нуклеотидсвязывающий домен, богатый лейцином повтор (NLR) и пириновый домен, содержащий рецептор 3 (NLRP3), жестко регулируется в покоящихся клетках. Однако, измененная экспрессия NLRP3 была обнаружена при нескольких патологических состояниях, включая онкопатологии [Bauernfeind *et al.*, 2009].

Растущее количество доказательств указывает на то, что нормальные регуляторные механизмы РНК могут быть нарушены из-за aberrантной экспрессии онкогенных микроРНК в раковых клетках. Следовательно, идентификация aberrантно экспрессируемых микроРНК является важным шагом на пути к выяснению новых регуляторных сетей микроРНК в клетках РПЖ. Недавние исследования нескольких сигнатур микроРНК в РПЖ показали, что экспрессия miR-223 часто снижается в тканях опухоли по сравнению с тканями в предстательной железе в условиях нормы [Szczyrba *et al.*, 2010]. Предполагается, что miR-223 действует как супрессор опухоли при РПЖ.

**Целью** работы являлось исследование экспрессии гена NLRP3 при ингибировании miR-223 на *in vitro* модели рака предстательной железы.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Получить клеточную линию PC3 со сниженной экспрессией miR-223.



2) Оценить уровень экспрессии генов и белков активации инфламмосомы NLRP3 в клеточных линиях PC3 и PC3 miR-223 Decoy методами ПЦР в режиме реального времени и вестерн блота.

3) Оценить уровень транскрипционной активности микроРНК miR-223 в клеточных линиях PC3 и PC3 miR-223 Decoy методом ПЦР в режиме реального времени.

4) Провести анализ профиля секреции цитокинов и хемокинов в культуре обработанных клеток PC3 по технологии xMAP Luminex.



## СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Козловская Я.М.  
Самоцитирование  
рассчитано для: Козловская Я.М.  
Название работы: Анализ экспрессии гена NLRP3 при ингибировании miR-223 на in vitro модели рака предстательной железы  
Тип работы: Выпускная квалификационная работа  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

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

ЗАИМСТВОВАНИЯ		18.79%	ЗАИМСТВОВАНИЯ		18.79%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		79.91%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		79.91%
ЦИТИРОВАНИЯ		1.3%	ЦИТИРОВАНИЯ		1.3%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 02.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 02.06.2022 12:38

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 (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирование по eLIBRARY.RU; Перефразирование по Интернету; Перефразирование 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.