

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление : 06.03.01(ОКСО 020400.62) – биология

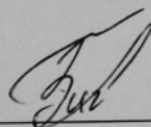
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВАЦИИ TOLL- ПОДОБНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ
ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ
НУКЛЕОКАПСИДНЫЙ БЕЛОК ВИРУСА АНДЕС

Работа завершена:

«06» 06 2018 г.



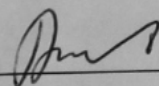
(Зиганшина Г.Р.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

Д.б.н., доцент

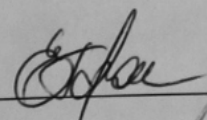
06 " 06 2018 г.



(Ризванов А.А.)

К.б.н., с.н.с.

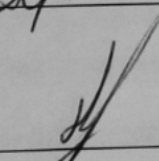
" 06 " 06 2018 г.



(Гаранина Е.Е.)

Зав.каф. генетики, д.б.н., проф.

" 6 " 06 2018 г.



(Чернов В.М.)

Казань – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Хантавирусы и хантавирусные инфекции	8
1.2 Строение генома хантавирусов	8
1.3 Нуклеокапсидный белок хантавирусов	10
1.4 Молекулярные механизмы патогенеза хантавирусной инфекции	11
1.5 Особенности инфекции вирусом Андес (ANDV)	14
1.6 Активация Toll-подобными рецепторами (TLR) или цитоплазматическими RIG-1-подобными рецепторами (RLR)	15
1.7 Значение активации RhoA в проницаемости MEC	16
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1 Клонирование гена нуклеокапсида (S-сегмента) вируса ANDV в плазмидный вектор pDONR221	19
2.2 Приготовление компетентных клеток и трансформация с культурой E.coli Top10	20
2.3 ПЦР-скрининг колоний	20
2.4 Клонирование гена AND-S в экспрессионный вектор pLX303	21
2.5 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных колоний набором QIAfilter Plasmid Midiprep Kit (QIAGEN)	23
2.6 Получение рекомбинантных лентивирусов LV- AND-S, LV- AND-M путем ко- трансфекции клеток HEK 293T	24
2.7 Трансфекция культур клеток A549 и THP-1 siRNA TLR7 и siRNA TLR9	24
2.8 Выделение тотальной РНК из культур клеток A549, THP-1 трансфицированной плазмидами pBud с использованием тризола	25
2.9 Постановка реакции обратной транскрипции	27
2.10 Оценка транскрипционной активности мРНК нуклеокапсида вируса Андес методом ПЦР-РВ	27

2.11 Анализ экспрессии нуклеокапсидного белка вируса Андес методом вестерн блота	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
3.1 Клонирование гена and-s в плазмидный вектор pDONR221	30
3.2 Получение плазмидной конструкции pLX-AND-S	32
3.3 Оценка транскрипционной активности мРНК нуклеокапсида вируса Андес методом ПЦР-РВ	33
3.4 Анализ экспрессии нуклеокапсидного белка вируса Андес методом вестерн блота	35
ВЫВОДЫ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	38

ВВЕДЕНИЕ

В России болезнь, вызываемая хантавирусами, или геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является эндемичной и поражает десятки тысяч людей каждый год. Приблизительно от 150000 до 200000 случаев ГЛПС приводят к госпитализации каждый год по всему миру. Случаи ГЛПС регистрируются в Татарстане, Башкортостане (до 2000 случаев), Удмуртии, Челябинской области и Дальневосточном регионе России. Летальность ГЛПС колеблется от <1% до 10% в зависимости от штамма вируса.

Грызуны, такие как *Clethrionomys glareolus*, являются резервуаром для хантавируса Puumala (PUUV) — основного возбудителя ГЛПС в России. Хантавирусы обычно приводят к бессимптомной инфекции у естественных хозяев-грызунов, в то время как инфекция в организме человека приводит к серьезной острой инфекции. Уровень смертности колеблется от 0,1% до 10% в зависимости от штамма вируса. В большинстве случаев ГЛПС диагностируют в сельской местности. Таким образом, ГЛПС является профессиональным риском для фермеров, крестьян, работников лесного хозяйства, лесорубов, военнослужащих и т.д. Хотя сезонные пики случаев ГЛПС варьируются в зависимости от штамма хантавирусов, они всегда совпадают с повышением сельскохозяйственной деятельности человека весной и осенью.

ГЛПС является одной из форм лихорадок, при которой основные клинические синдромы связаны с нарушением гемостаза и функцией почек. Вирусы, связанные с тяжелой формой заболевания, включают Хантаан (HTV), Dobrava (DOBV0), и Сеул (SOE), а мягкая форма ГЛПС связана с вирусом Puumala (PUUV). Для ГЛПС характерны почечная недостаточность, кровоизлияния от небольших петехий до тяжелых внутренних кровотечений и ДВС-синдрома (диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови). ДВС и почечная недостаточность является основной причиной смерти больных ГЛПС. В настоящее время не существует единого фактора,

объясняющего сложность патогенеза ГЛПС. Также в настоящее время отсутствуют эффективные подходы в терапии ГЛПС и ХЛС, а лечение направлено исключительно на устранение симптомов заболевания. Таким образом, понимание молекулярных основ патогенеза способно расширить представление о взаимодействии хантавируса с клеткой-реципиентом, а также выявлении механизмов противовирусной защиты.

Ввиду того, что хантавирусы принадлежат к патогенам II класса и требуют дополнительной биологической защиты (в большинстве лабораторий уровень биологической защиты 2), это осложняет изучение молекулярных механизмов патогенеза при работе с дикими штаммами вирусов. Следовательно, реконструкция клеточной модели хантавирусной инфекции весьма необходима.

Цель работы — установить роль активации Toll-подобных рецепторов в эпителиальных клетках карциномы легкого человека и TLR-1, экспрессирующего нуклеокапсидный белок вируса Андес.

В рамках цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Получение рекомбинантных лентивирусов, экспрессирующих нуклеокапсидный белок вируса Андес (LV-AND-S).
- 2) Генетическая модификация клеток A549 кДНК TLR3 и TLR7, а также рекомбинантными лентивирусом LV-AND-S.
- 3) Исследование транскрипционной активности мРНК вируса Андес в генетически модифицированных клетках A549 и TLR1.
- 4) Исследование биосинтеза нуклеокапсидного белка в генетически модифицированных клетках методом вестерн-блота.



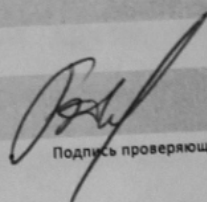
АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Казанский (Приволжский)
федеральный университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Зиганшина Гульшат Равиловна
Факультет, кафедра, номер группы	
Тип работы	Не указано
Название работы	Зиганшина Гульшат Равиловна Зиганшина гульшат антиплагиат.docx
Название файла	Зиганшина гульшат антиплагиат.docx
Процент заимствования	16,29%
Процент цитирования	0,53%
Процент оригинальности	83,18%
Дата проверки	21:40:07 05 июня 2018г.
Модули поиска	Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция РГБ; Коллекция eLIBRARY.RU; Кольцо вузов; Модуль поиска общепотребительных выражений; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Сводная коллекция ЭБС
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.