

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

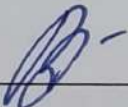
Направление: 06.03.01 - Биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
Дипломная работа

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ RAB5 И RAB11 НА АКТИВАЦИЮ NLRP3-
СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ПРИ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ *IN*
VITRO

Работа завершена:

« 5 » 06 2022 г.



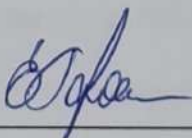
(К.А. Ворона)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., старший преподаватель

« 6 » 06 2022 г.



(Е.Е. Гаранина)

И.о. заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2022 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Хантавирусная инфекция. Строение вириона хантавируса	8
1.2 Rab ГТФазы и их роль в переносе нуклеокапсидного белка хантавируса	12
1.3 Структура и механизмы активации NLRP3 инфламмосомы. NLRP3 инфламмосома и хантавирусная инфекция	16
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Культивирование клеточной линии A549	23
2.2 Выделение плазмидной ДНК DsRed-Rab5 WT и DsRed-Rab5 DN, DsRed-Rab11 WT и DsRed-Rab11 DN	23
2.3 Трансфекция клеточной линии A549 плазмидами DsRed-Rab5 WT и DsRed-Rab5 DN, DsRed-Rab11 WT и DsRed-Rab11 DN	24
2.4 Получение лентивируса LV-HTV-S	25
2.5 Трансдукция трансфицированной линии A549 вирусом LV-HTV-S	26
2.6 Анализ биосинтеза нуклеокапсидного белка и NLRP3 белка <i>in vitro</i> методом иммуноблоттинга	26
2.7 Анализ относительной экспрессии генов цитокинов методом ПЦР реального времени	28
2.8 Мультиплексный анализ	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	31
3.1 Получение генетически модифицированных клеток A549 плазмидами DsRed-Rab5 WT, DsRed-Rab5 DN, DsRed-Rab11 WT и DsRed-Rab11 DN и трансдуцированных LV-HTV-S	31
3.2 Оценка результатов иммуноблоттинга	32

3.3 Оценка относительной экспрессии генов цитокинов методом ПЦР-РВ	34
3.4 Мультиплексный анализ	36
ВЫВОДЫ	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	40

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ANDV	Вирус Андес (англ. Andes orthohantavirus)
CASP1	Каспаза-1
CO ₂	Диоксид углерода
DAMPs	Молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждениями (англ. Damage-associated molecular patterns)
DMEM	Среда, модифицированная по методу Дульбекко
DOBV	Вирус Добрава
HTNV	Вирус Хантаан
IL-1 β	Интерлекин-1 β (англ. Interleukin--1 β)
IL-18	Интерлекин-18 (англ. Interleukin-18)
LPS	Липополисахарид (англ. Lipopolysaccharide)
NF- κ B	Ядерный фактор «каппа-би» (англ. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NLRP3	Nod-подобный рецептор семейства NALP (англ. NLR family pyrin domain containing 3)
NOD2	Nod-подобный рецептор подсемейства NOD (англ. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
PAMPs	Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (англ. Pathogen associated molecular patterns)
PRRs	Образ-распознающие рецепторы (англ. Pattern-recognition receptors)

PVDF	Поливинилиденфторид
PYD	Пириновый домен
PUUV	Вирус Пуумала
pH	Водородный показатель
SDS	Додецилсульфат натрия
SEOV	Вирус Сеул
TLRs	Толл-подобные рецепторы (англ. Toll-like receptors)
TNFR1	Рецептор фактора некроза опухоли 1 (англ. Tumor necrosis factor receptor 1)
Tris-HCl	Трис гидрохлорид
TULV	Вирус Тула
UUKV	Вирус Укуниемеи
АДФ	Аденозиндифосфат
АТФ	Аденозинтрифосфат
ГЛПС	Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
АФК	Активные формы кислорода
кДа	Килодальтон
кДНК	Комплементарная ДНК
Мкг	Микрограмм
Мкл	Микролитр
Мл	Миллилитр
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	Полимеразная цепная реакция в реальном времени
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ХЛС	Хантавирусный легочный синдром

ВВЕДЕНИЕ

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) и хантавирусный легочный синдром (ХЛС) являются природно-очаговыми зоонозными инфекциями, которые распространены во всем мире. Россия включила ГЛПС в официальную систему отчетности Министерства здравоохранения в 1978 году, и ежегодно из Европейской части России регистрируются от 10 000 до 12 000 клинических случаев хантавирусных инфекций, в основном характеризующейся почечной недостаточностью [Klempa, *et al.*, 2008]. В настоящее время, несмотря на значительный рост заболеваемости хантавирусной инфекцией в России, наблюдается отсутствие эффективных методов лечения [Dheerasekara, *et al.*, 2020].

ГЛПС и ХЛС вызывается вирусами, принадлежащими к порядку *Bunyavirales* семейства *Hantaviridae*. Хантавирусы - это оболочечные, одноцепочечные, РНК(-) вирусы, являющиеся неклеточными инфекционными агентами, которые патогенны для человека. К ним относятся такие вирусы, как вирус Хантаан (HTNV), вирус Сеул (SEOV), Добрава (DOBV), Пуумала (PUUV), вирус Тула (TULV) и другие [Yashina, *et al.*, 2021].

Было обнаружено, что в проникновении хантавирусов внутрь клетки и транспортировке вирусных частиц во внутренних компартментах участвуют белки внутриклеточного везикулярного транспорта - Rab ГТФазы [Spearman, 2017]. Так, установлено, что эндосомные белки Rab5a и Rab7a участвуют в переносе вируса. Было обнаружено, что Rab5a ГТФаза способствует проникновению вируса во внутриклеточный компартмент и обеспечивает транспортировку вируса в ранние эндосомы. Транспортировка субстрата из ранней эндосомы к поздним эндосомам и биогенез лизосом происходит с помощью Rab7 белка [Guerra & Vucchi, 2016].

При заражении организма хантавирусами, происходит активация механизмов защиты врожденной иммунной системы [Carty, *et al.*, 2021].

Показано, что существует определенная взаимосвязь между образованием комплекса NLRP3 инфламмосомы и хантавирусной инфекцией. В данном исследовании была рассмотрена роль Rab-ГТФаз в активации мультипротеинового комплекса, компонента врожденной иммунной системы, который отвечает за регулирование иммунных реакций в организме - NLRP3 инфламмосомы.

Целью работы являлось установить влияние Rab5 и Rab11 ГТФазы на активацию NLRP3 сигнального пути при хантавирусной инфекции.

В работе решались следующие **задачи**:

1) Генетическая модификация клеток A549 плазмидами, кодирующими нативную и доминантно негативную форму белков Rab5 и Rab11 и трансдукция трансфицированных клеток вирусом LV-HTV-S.

2) Оценка уровня экспрессии мРНК генов сигнального пути NLRP3 (*NLRP3*, *IL-1 β* , *IL-18*), а также мРНК гена нуклеокапсидного белка в генетически модифицированных клетках A549 методом ПЦР в режиме реального времени.

3) Анализ синтеза белка NLRP3 и нуклеокапсидного белка в трансфицированных клетках методом иммуноблоттинга.

4) Установление различий в секреции цитокинов и хемокинов методом мультиплексного анализа.

СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Ворона К.
Самоцитирование
рассчитано для: Ворона К.
Название работы: ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ RAB5 И RAB11 НА АКТИВАЦИЮ NLRP3-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ПРИ ХАНТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

- **ВНИМАНИЕ, ДОКУМЕНТ ПОДОЗРИТЕЛЬНЫЙ:** ОБНАРУЖЕНЫ ПОПЫТКИ МАСКИРОВКИ ЗАИМСТВОВАНИЙ. РЕКОМЕНДУЕТСЯ ПРОВЕРИТЬ ПОЛНЫЙ ОТЧЕТ
- **ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ:** НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	7.38%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	7.38%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.01%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.01%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.61%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.61%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 03.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 03.06.2022 20:23

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; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; 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.