

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

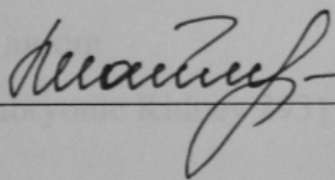
Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) — биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

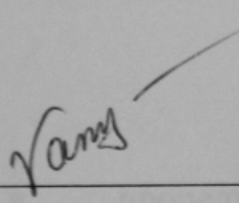
**ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНА
ДИСФЕРЛИНА ЧЕЛОВЕКА В МУТАНТНЫХ
ФИБРОБЛАСТАХ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОЖИ ПАЦИЕНТА
С ДИСФЕРЛИНОПАТИЕЙ**

Работа завершена:

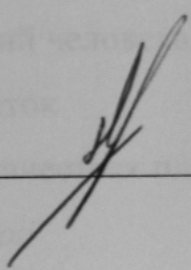
"5" "06" 2018 г.  (А.А. Шаймарданова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., старший преподаватель

"6" "06" 2018 г.  (В.В. Соловьева)

Заведующий кафедрой
д. б. н., профессор

"6" "06" 2018 г.  (В.М. Чернов)

Казань — 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Дисферлинопатия	9
1.1.1 Семейство белков ферлинов	10
1.1.2 Структура белка дисферлина	11
1.2 Генная терапия дисферлинопатии	11
1.2.1 Векторы на основе аденоассоциированных вирусов	12
1.2.2 Векторы на основе лентивирусов	13
1.2.3 Пропуск экзона в генной терапии	13
1.3 CRISPR-Cas9 для генетической модификации	15
1.3.1 CRISPR-Cas9 как инструмент для редактирования	16
1.3.2 Cas9 Synergistic Activation Mediators (SAM)	17
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Объект, схема и методика исследования	23
2.2 Используемые плазмиды	23
2.3 Используемые клеточные линии	27
2.3.1 НЕК 293 (англ. Human Embryonic Kidney 293)	27
2.3.2 Фибробласты из кожи человека	27
2.4 Работа с культурами клеток	28
2.4.1 Выделение клеток	28
2.4.2 Культивирование и процедура пассирования	
иммortalизованных клеточных линий человека	29
2.4.3 Криоконсервация культур клеток	29
2.5 Нарботка в препаративных количествах плазмид	30
2.5.2 Культивирование клеток <i>E. Coli</i>	30
2.5.3.1 Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> штамма	

DH5α (Invitrogen)	31
2.5.3.2 Генетическая трансформация клеток <i>Escherichia coli</i>	32
2.5.3.3 Приготовление бактериальной культуры <i>Escherichia coli</i> для долговременного хранения	32
2.5.3.4 Выделение плазмидной ДНК	33
2.5.3.5 Электрофорез в агарозном геле	34
2.6 Получение рекомбинантного лентивируса	35
2.6.1 Рассев клеток	35
2.6.2 Транфекция	35
2.6.3 Сбор супернатанта	36
2.6.4 Концентрирование лентивирусных частиц	36
2.7 Трансдукция лентивирусами	37
2.7.1 Иммуортализация фибробластов и получение клеточной линии	37
Human Fibroblasts-p53-EGFP	
2.7.1.1 Получение клеточной линии нормальных фибробластов здорового человека, трансдуцированных LVUHshp53-gfp	37
2.8 Оптимизация необходимой концентрации антибиотиков для дальнейшей селекции культуры клеток	38
2.9 Транскрипционная активация гена дисферлина в мутантных фибробластах кожи по 26 экзону пациента с дисферлинопатией	38
2.10 Генетическая модификация клеток линии HEK293A с помощью генетической конструкции pAd-Dysf	39
2.11 Иммуоблоттинг (вестерн-блот анализ)	41
2.12 qPCR анализ	42
2.12.1 Выделение общей РНК из клеточных осадков	42
2.12.2 Реакция обратной транскрипции	43
2.12.3 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	44
2.13 Статистический анализ	45
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	46

ВВЕДЕНИЕ

Дисферлинопатии (ДП) — это группа нейромышечных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, возникающих из-за мутаций трансмембранного белка дисферлина, играющего роль в репарации микроповреждений клеточной мембраны мышечных клеток.

Следствием мутаций в гене *dysf* является нарушение экспрессии белка дисферлина, из-за этого образованные микроповреждения клеточной мембраны мышечных клеток не восстанавливаются, вследствие этого возникает слабость в мышцах, в итоге их атрофия.

На сегодняшний день нет эффективных методов лечения ДП, большинство подходов терапии направлены на облегчение клинических проявлений, не решая фундаментальных причин проявления заболевания. Генная терапия является одним из наиболее перспективных методов для лечения ДП. Достижение эффективной доставки здорового гена в мышечные клетки и высокого уровня экспрессии дисферлина на длительное время является наиболее важной задачей генной терапии ДП. Таким образом, разработка эффективных геннотерапевтических препаратов на сегодняшний день является актуальной проблемой.

Для разработки геннотерапевтических препаратов обязательным условием является существование моделей заболевания. Создание клеточной модели, точно воспроизводящей все молекулярно-генетические аспекты заболевания, необходимо для дальнейшего выяснения молекулярных основ патогенеза дисферлинопатии, которые на сегодняшний день до конца не изучены. Исследователям, изучающим ДП, предстоит выяснить молекулярные механизмы репарации клеточной мембраны, какую роль играет дисферлин в восстановлении плазмалеммы, в ассоциации с какими другими белками происходит репарация и т.д. Все эти и другие вопросы на сегодняшний день остаются открытыми. Тщательное изучение и выяснение всех этапов позволит оптимизировать методы терапии данного типа

заболеваний, существующих на сегодняшний день. Так же, тест-системы необходимы для разработки и тестирования геннотерапевтических препаратов.

Для создания тест-системы ДП мы выбрали за основу фибробласты кожи пациента. Известно, что дисферлин экспрессируется и выполняет свою функцию в мышечных и некоторых других клетках (моноцитах, клетках плаценты, сердца и т.д.). В связи с определенными сложностями при заборе биопсии мышц, при культивировании и модификации миобластов, было решено использовать для этих целей фибробласты кожи пациента. Фибробласты намного лучше поддаются генноинженерным манипуляциям и проще культивируются. К тому же, для больных нейромышечными заболеваниями, процедура изъятия биопсии мышц является более болезненной процедурой, чем кожи.

Проблема использования фибробластов, как объектов для разработки и тестирования генных препаратов при ДП заключается в том, что в них не экспрессируется дисферлин. Эту проблему можно решить, активировав ген дисферлина в данных клетках.

В нашей работе мы предлагаем создание тест-системы на основе мутантных фибробластов, выделенных из кожи пациента с дисферлинопатией. Создание тест-системы на основе клеток, полученных из организма пациента, максимально подходит для создания индивидуальных генных препаратов для терапии неизлечимых заболеваний, что особенно актуально для таких редких наследственных заболеваний, как ДП, т.к. мутации гена, кодирующего дисферлин индивидуальны и сильно вариабельны. Более 400 мутаций *dysf* были описаны в базе данных мышечной дистрофии (<http://www.dmd.nl>).

Цель работы — создать тест-систему дисферлинопатии путем активации транскрипции гена дисферлина человека с помощью системы CRISPR-Cas9 в фибробластах кожи пациента с мутацией в 26 экзоне.

Задачи работы:

- 1) Выделение фибробластов из кожи пациента с ДП и иммортализация нативных фибробластов методом нокаута гена супрессора опухоли белка p53.
- 2) Нарботка в препаративных количествах рекомбинантных плазмидных конструкций, кодирующих SAM-gRNA1, dCas9-VP64, MS2-P65-HSF1 для получения рекомбинантных лентивирусов, кодирующих транскрипционные факторы (SAM-gRNA1, dCas9-VP64, MS2-P65-HSF1).
- 3) Подборка оптимальных концентраций антибиотиков для дальнейшей селекции трансдуцированных клеток путем проведения MTS-теста.
- 4) Активировать транскрипцию гена дисферлина в мутантных фибробластах из кожи пациента с помощью системы SAM.
- 5) Анализ транскрипционной активности гена дисферлина с помощью вестерн-блот и qPCR.

Таблица 1. — Клинические характеристики наиболее распространенных форм диферинопатии

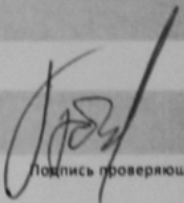
	Миопатия Миосин (MM)	Пояснично-крестцовая мышечная дистрофия типа 2B (LGMD 2B)	Дистальная миопатия с поражением сердечной грушевой мышцы голени (DMAT)
Наследование	Аутосомно-рецессивное		
Средний возраст дебюта	24-7,4	26,2-9,2	14 до 28 лет



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Шаймарданова Алиса Алмазовна
Факультет, кафедра, номер группы	
Тип работы	Не указано
Название работы	Шаймарданова Алиса Алмазовна антиплагиат.docx
Название файла	антиплагиат.docx
Процент заимствования	6,26%
Процент цитирования	0,43%
Процент оригинальности	93,31%
Дата проверки	21:46:01 05 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; 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.