

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕСКАЛЦИНА НА
ПРОЦЕССЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА**

Работа завершена:

«30» мая 2017г.



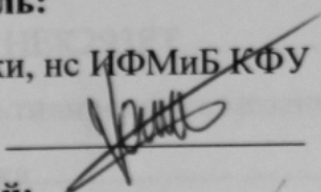
Колобынина К.Г.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., асс. каф. генетики, нс ИФМиБ КФУ

«30» мая 2017г.

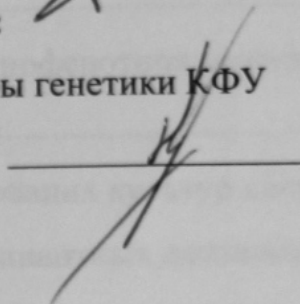


Соловьева В.В.

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор кафедры генетики КФУ

«5» июня 2017г.



Чернов В.М.

Казань-2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	10
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 EF-hand Ca ²⁺ -связывающие белки.....	12
1.2 Тескалцин.....	17
1.3 Lentivirальные векторные системы в генной и клеточной терапии.....	29
1.4 Мезенхимные стволовые клетки из жировой ткани (МСК-ЖТ).....	35
1.5 Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток человека.....	37
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
2.1 Плазмидные векторы.....	41
2.2 Работа с бактериальными клетками.....	41
2.2.1 Бактериальный штамм.....	41
2.2.2 Приготовление ночной культуры клеток <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.3 Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i>	43
2.2.4 Генетическая трансформация клеток <i>Escherichia coli</i>	44
2.2.5 Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток <i>E. coli</i> TOP 10.....	44
2.3 Культивирование эукариотических клеток.....	46
2.3.1 Клеточная линия HEK293FT.....	46
2.3.2 Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	47
2.3.3 Определение иммунофенотипа мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	47
2.3.4 Процедура пассирования культур клеток.....	48
2.3.5 Получение рекомбинантных лентивирусов.....	49
2.3.6 Генетическая модификация мезенхимных стволовых клеток.....	50

2.4 Оценка жизнеспособности генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток	51
2.5 ПЦР в реальном времени на наличие экспрессии белка тескалцина в мезенхимных стволовых клетках человека.....	52
2.6 Иммуноблоттинг (вестерн-блот анализ) на наличие экспрессии белка тескалцина в мезенхимных стволовых клетках человека.....	54
2.7 Остеогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	55
2.8 Адипогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	56
2.9 Хондрогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека.....	56
2.10 Анализ остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировок мезенхимных стволовых клеток человека.....	57
2.11 Транскриптомный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в мезенхимных стволовых клетках из жировой ткани человека	58
2.12 Статистический анализ.....	59
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.....	60
3.2 Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека	61
3.3 Определение иммунофенотипа выделенных мезенхимных стволовых клеток	61
3.4 Получение рекомбинантных лентивирусов	63
3.5 Анализ жизнеспособности МСК-ЖТ после генетической модификации рекомбинантными лентивирусами.....	65
3.6 Анализ экспрессии тескалцина в МСК-ЖТ с помощью ПЦР в реальном времени.....	67
3.7 Анализ экспрессии тескалцина в МСК-ЖТ с помощью иммуноблоттинга	68

3.8 Направленная дифференцировка генетически модифицированных МСК-ЖТ в три нативных направления.....	69
3.9 Транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии генов МСК-ЖТ с модуляцией экспрессии тескалцина.....	74
ВЫВОДЫ	80
Заключение	81
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	82

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота	ОП — оптическая плотность
дальтон	п.н. — пар нуклеотидов
дДа — децидалтон	РНК — рибонуклеиновая кислота
кРНК — короткая интерферирующая РНК	сек — секунда
КЭЗ — каломасобрадукшие единицы	см — сантиметр
ИЛ-6 — интерлейкин-6	т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов
М — моль	Трис — трис (тригидроксиметил)аминометан
мин — минута	УФ — ультрафиолет
мл — миллилитр	ЦНС — центральная нервная система
мг — миллиграмм	ЭДГА — этилендиаминпентроуксусная кислота
мкг — микрограмм	А — адстрек
мкл — микролитр	АВА — атлас мозга Алиена (англ. Allen Brain Atlas)
мкМ — микромоль	Аки — протеинкиназа В (англ. RAC-alpha kinase/threonine-protein kinase)
мкМ — миллимоль	αMEM — α-модифицированная минимальная среда Иглы (англ. Minimum Essential Medium Eagle α)
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота	AML — острый миелоидный лейкоз (англ. Acute myeloid leukemia)
миРНК — малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота	
МСК — мезенхимальные стволовые клетки	

ВВЕДЕНИЕ

Кальций — один из важнейших металлов в живом организме. В качестве универсального вторичного посредника он играет важнейшую роль в сигнальной системе клетки и, таким образом, контролирует жизненно важные функции: мышечное сокращение, пролиферацию и дифференцировку клеток, клеточный цикл, апоптоз и прочие физиологические процессы. EF-hand Ca^{2+} -связывающие белки принимают участие во многих важных процессах в организме, включая передачу сигналов, регуляцию ионных токов и дифференцировку клеток. Одной из таких молекул является открытый в 2001 году белок тескалцин. Тескалцин играет важную роль в злокачественной трансформации клеток, а также взаимодействует с субъединицей 4 сигнасомы COP9, Na^+/H^+ -антипортом 1 типа и контролирует экспрессию факторов транскрипции семейства Ets через RMA-индуцированный ERK-путь. Согласно литературным данным, показана ассоциация тескалцина с онкологическими заболеваниями и возможность его применения в качестве онкомишени для диагностики онкологических заболеваний. Также показано его участие в развитии головного мозга человека и процессах дифференцировки определенных культур клеток *in vitro*. Последнее представляет особый интерес, поскольку открытие новых медиаторов дифференцировки клеток, в частности, стволовых, которые потенциально могут стать одним из нескольких специализированных типов, расширяет приложения регенеративной медицины для восстановительной терапии различных дегенеративных поражений.

Для более глубокого понимания возможных молекулярных механизмов регуляции клеточных функций тескалцина необходимы дальнейшие исследования.

Цель работы — установить влияние модуляции экспрессии белка тескалцина на дифференцировку мезенхимных стволовых клеток в трех нативных направлениях *in vitro*.

Задачи исследования: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) С помощью рекомбинантных лентивирусов создать чистые линии мезенхимных стволовых клеток человека с долговременной эктопической экспрессией белка тескалцина и нокдауном тескалцина.
- 2) Провести оценку интенсивности дифференцировки полученных МСК-ЖТ в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях.
- 3) Провести транскриптомный анализ дифференциальной экспрессии генов МСК-ЖТ с сверхэкспрессией и нокдауном тескалцина.

Работа выполнена на базе научно-образовательного центра (НОЦ)

Фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.