

Алжанұлы Бахытжанның

6D060700 – «Биология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
ғылыми дәрежесін алу үшін диссертациясына
АНДАТПА

Диссертация тақырыбы: « β -жасушалардағы инсулин синтезін қолдан реттеу арқылы диабетке қарсы жасушалық терапия тәсілін жасау»

Зерттеудің жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс CRISPR/Cas9 технологиясын қолдана отырып, эмбрионалды бағаналы жасушаларда инсулин генінің экспрессиясын модуляциялау мүмкіндігін зерттеуге арналған. Жұмыста сонымен қатар генетикалық тұрғыда өзгертілген бағаналы жасушалардың *in vitro* дифференциациясы жүргізіліп, инсулин шығаратын ұйқы безінің β жасушалары алу жолы сипатталады.

Зерттеудің өзектілігі. Қант диабеті (ҚД) - бұл дүниежүзілік денсаулық сақтау жүйесі үшін үлкен мәселеге айналып отырған созылмалы метаболикалық ауру. Ауру қандағы қант деңгейінің жоғарылауымен сипатталады (гипергликемия), ол инсулиннің толық болмауынан (1 тип) және "инсулинге төзімділік" жағдайы туындауынан немесе инсулиннің салыстырмалы жетіспеушілігінен (2 тип) дамиды.

1 типті диабет ұйқы безінің β -жасушаларының ағзаның иммундық жүйесінің тікелей шабуылына байланысты дамиды. Оның себебі ғылымда әлі түсініксіз болып отыр. Ұйқы безінің β жасушалары эндокриндік жүйенің маңызды гормондарының бірі инсулинді бөліп шығарады. Бүгінгі таңда аурудың жалғыз емі ретінде жасанды түрде сырттан инсулинді қабылдау болып саналады. Қабылдамаған жағдайда қандағы қант деңгейі жоғарылайды да бірқатар жағымсыз салдарға, соның ішінде өлімге де әкелуі мүмкін.

Қазіргі таңда трансплантологияның заманауи жетістіктерін қолдана отырып, 1 типті диабеттің емі ретінде Лангерганс аралын, сондай-ақ ұйқы безін тұтастай трансплантациялау әдістері қолданылады, бірақ донор жетіспеушілігі өткір мәселе болып отыр. Осыған байланысты клеткалық терапия, яғни дені сау инсулин өндіретін β -жасушалардың трансплантациясы аурудың ең ықтимал шешімі ретінде бағалануда. Алайда, мұнда да донорлық материалдың тапшылығы мүмкіндікті айтарлықтай шектеуде. Сол себепті, бүгінгі күні ағзадағы барлық жасушалардың бастапқы көзі болып табылатын бағаналы жасушаларды пайдалану 1 типті диабетті емдеудің ең әлеуетті және көбірек зерттелетін әдісі болып табылады. Оның үстіне, генетикалық технологиялардың соңғы жетістіктерін қоса пайдалану трансплантация үшін қолайлы әрі жақсартылған қасиеттері бар жасаңа жасушаларды алудың мүмкіндіктерін және жалпы трансплантация тиімділігін арттырады.

Зерттеудің мақсаты: адамның эмбрионалды бағаналы жасушаларында инсулин генінің экспрессиясын модуляциялау үшін CRISPR құрылымын әзірлеу және геномы түрлендірілген бағаналы жасушалардан *in vitro* дифференциация арқылы инсулин синтездейтін β -жасушалар алу.

Жұмыста келесідей міндеттер алға қойылды:

- 1) dsRED репортер ақуызының гені және инсулин генінің промоторына комплементарлы 2 бағыттаушы РНҚ лентивирустық векторды әзірлеу;
- 2) инсулин транскрипциясын белсендіру (VP64) және репрессиялау (KRAB) үшін синтетикалық домендері бар жекелеген CRISPR-Cas9 плазмидаларын алу;
- 3) HEK 293 адам жасушаларында инсулин экспрессиясын анықтау арқылы CRISPR-Cas9 және лентивектор конструкцияларының тиімділігін тексеру. Қажет болған жағдайда құрылымдардың тізбектерін жетілдіру;
- 4) CRISPR-Cas9-VP64 конструкциясын және лентивирустық векторды H1 бағаналы жасушаларына енгізу;
- 5) *In vitro* жағдайда H1 жасушаларын ұйқы безінің инсулин бөлетін β -жасушаларына дейін дифференциациялау;
- 6) алынған жасушалардың инсулин синтезін жүзеге асыру қабілетін тексеру, сондай-ақ глюкозаға сезімталдығын зерттеу.

Зерттеу объектілері мен материалдары. HEK293 жасушалары, HEK 293T жасушалары, ғылыми зерттеулер үшін қолданылатын H1 эмбрионалды бағаналы жасушалары, лентивирус, MIN6 тышқан жасушалары, адамның ұйқы безінің Лангерганс аралшықтары.

Зерттеу әдістері. Адамның жасушаларының культурасы, бактериялық культура, синтетикалық РНҚ дизайнын әзірлеу, Surveyor нуклеазалық талдау әдісі, CRISPR-dCas9 құрылымын әзірлеу, құрылымдарға нуклеотидтік тізбектерді молекулалық клондау, лентивирустық векторды құру, трансдукция, трансфекция, ағындық цитометрия, РНҚ бөлу, кДНК синтезі, сандық ПТР, агарозды гель электрофорезі, бағаналы жасушалардың бағытталған *in vitro* дифференциациясы, жасушаларды иммундық әдіспен бояу, статистикалық өңдеу.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы.

CRISPR кешенін инсулин генінің промоторына бағыттау үшін бірнеше бағыттаушы РНҚ (БРНҚ) дизайнды жасалды. Солардың ішінен ең тиімді 2 БРНҚ талдап алынды. Таңдап алынған БРНҚ-ларды мақсатты жасушаларға жеткізу үшін лентивирустық жаңа вектор жасалды.

Белсенділігінен айырылған Cas9, яғни dCas9, нуклеаза және vp64 транскрипция активаторы және сәйкесінше Krab репрессоры бар dcas9-VP64 және dcas9-Krab плазмидалары зерттелді. Аталған плазмидаларды трансфекциялау арқылы олардың қажетті ақуыздарын тұрақты түрде экспрессиялайтын HEK 293 жасушалары алынды.

Дайын болған dCas9-VP64 HEK 293 және dCas9-KRAB HEK 293 жасушаларына лентивектормен трансдукциялау арқылы БРНҚ тасымалданды. Нәтижесінде CRISPR кешені бағаналы жасушалардағы инсулин экспрессиясын белсендіруге және одан әрі төмендетуге қабілетті екендігі көрсетілді.

Әзірленген CRISPR-Cas9 плазмидалары және лентивирустық вектор H1 бағаналы жасушаларға сәтті енгізілді. Әрбір құрылымның барлық негізгі гендерінің экспрессиясының жоғарылауымен расталды.

Генетикалық тұрғыда түрлендірілген бағаналы жасушалардың инсулин синтездейтін ұйқы безінің β -жасушаларына дейін *in vitro* дифференциациясы жүргізілді. Дифференциация нәтижесінде NKX 6.1, MAFA және инсулин сияқты табиғи β -жасушалардың негізгі маркерлерін синтездейтін жасушалар алынды. Әр геннің статистикалық тұрғыдан маңызды экспрессиялары анықталды. Алынған жасушаларда инсулин экспрессиясының жоғары көрсеткіші, ал соматостатин мен глюкагонның төмендетілген экспрессиялары расталды.

Өз кезегінде CRISPR-VP64 кешенімен трансфекцияланған бағаналы жасушалардан алынған β -жасушалардың инсулин экспрессиясының жоғарылағаны эксперименталды түрде анықталды. Бұл нәтиже эндогендік инсулиннің синтезін модуляциялауда CRISPR технологиясының қолдану аясының кең екендігін көрсетеді.

Зерттеулердің нәтижесінде CRISPR-cas9 әдісімен инсулиннің транскрипциясын алдымен HEK 293 адам жасушаларында, содан кейін H1 эмбрионалды бағаналы жасушаларда реттеу мүмкіндігі эксперименталды түрде көрсетілді. Сондай-ақ, генетикалық түрлендірілген H1 жасушаларын ұйқы безінің β -жасушаларына дейін дифференциациялауға болатындығы және сонымен бірге дифференциация кезінде CRISPR құрылымының гендері өздерінің экспрессиялау қабілетін жоғалтпайтыны көрсетілген.

Зерттеудің теориялық және практикалық маңыздылығы. Зерттеу барысында HEK 293 адам жасушаларының жасуша биологиясы, сондай-ақ H1 бағаналы жасушаларының биологиясы туралы іргелі білім алынды. Бұл өз кезегінде геномдық редакциялау технологиясын қолдана отырып, ғылыми зерттеулер үшін аталған жасушалардың мінез-құлқын одан әрі түсінуде айтарлықтай теориялық білімге ие.

Практикалық тұрғыдан алғанда, жүргізілген зерттеу геномдық өңдеу технологиясына сүйене отырып I типті қант диабеті үшін жасушалық терапияның ықтимал жаңа әдісін қолдану мүмкіндігін көрсетті. Аталған ауру осы уақытқа дейін әлі күнге дейін емдеу әдісі жоқ саналатын аурулардың бірі болып табылады. Науқастардың өмірін сақтап қалу үшін қол жетімді жалғыз терапия саналатын экзогендік инсулин қабылдау ұзақ мерзімді асқынуларға әкеледі. Осы орайда зерттеу барысында алынған нәтижелер ғылымның осы бағытындағы жаңа білім ретінде қызмет атқаратын болады.

Қорғауға шығарылатын негізгі тұжырымдар:

1. Инсулиннің гидтік РНҚ-сын CRISPR әдісімен инсулин экспрессиясын реттеуде пайдалану үшін лентивирус негізіндегі векторға құрастыруға болады;

2. Синтетикалық транскрипция факторларын плазмида құрамындағы dCas9 нуклеазасымен байланыстыруға болады. Жасушаларға енгізген кезде VP64 транскрипция активаторы және репрессор KRAB домені сәйкесінше транскрипцияны күшейтеді немесе төмендетеді;

3. CRISPR-Cas9-VP64 плазмидасынан және инсулин гРНҚ лентивекторынан тұратын CRISPR кешені адамның кәдімгі HEK 293 жасушаларында инсулин экспрессиясын белсендіруге қабілетті. Осы

модификацияланған жасушаларға dCas9-Krab плазмидасын қосу инсулин экспрессиясының төмендеуіне әкеледі;

4. Инсулин экспрессиясын реттеуге арналған CRISPR негізіндегі әзірленген тәсіл H1 эмбрионалды бағаналы жасушаларында кәдімгі HEK 293 адам жасушаларындағыдай тиімділікті көрсетеді. Сонымен қатар, инсулин гРНК жоқ H1 жасушалары сәйкесінше мақсатты геннің экспрессия деңгейінің жоғарылауын көрсетпейді;

5. CRISPR әдісімен өзгертілген H1 бағаналы жасушаларын ұйқы безінің β жасушаларына дейін *in vitro* жағдайда дифференциациялау инсулин синтездейтін жасушалардың жаңа қатарын алуға мүмкіндік береді. Алынған жасушалар кәдімгі, яғни өзгертілмеген H1 жасушаларынан алынған жасушаларға қарағанда инсулинді көбірек бере алады, дегенмен табиғи Лангерганс аралшықтарының жасушаларымен салыстырғанда инсулинді аз бөледі;

6. Жұмыс барысында алынған жасушалардың ортадағы глюкоза концентрациясының өзгеруіне сезімталдығы табиғи Лангерганс аралшықтарының жасушаларымен салыстырғанда төмен.

Жұмыстың негізгі нәтижелері және қорытындылары:

1. Құрамында dsred репортер гені және инсулин промоторына комплементарлы екі гидті РНК бар лентивирустық вектор әзірленді;

2. dCas9-VP64 және dCas9-KRAB гендерін тұрақты экспрессиялайтын HEK 293 жасушаларының қатарлары алынды;

3. Синтетикалық транскрипция факторлары гРНК және dCas9 нуклеазасымен бірге пайдаланылған кезде HEK 293 жасушаларында эндогендік инсулин экспрессиясын белсендіруге (VP64, шамамен 900х), сондай-ақ төмендетуге (KRAB, шамамен 600х) қабілетті екендігі эксперименталды түрде көрсетілді;

4. Жасалған CRISPR кешені H1 бағаналы жасушаларында инсулин экспрессиясын жоғарылатуға (шамамен 900х) қабілетті екенін көрсетті;

5. *In vitro* бағытталған дифференциация арқылы CRISPR әдісімен өңделген H1 бағаналы жасушаларынан инсулин өндіретін β -жасушаларды алу мүмкіндігі эксперименталды түрде көрсетілді. Дифференциация процесі кезінде алынған жасушалардағы CRISPR кешені гендерінің тиімділігі төмендейтіні анықталды, бірақ инсулиннің анықталарлықтай экспрессиясы сақталатыны белгілі болды;

6. Жұмыс барысында алынған жасушалардың ортадағы глюкоза концентрациясының өзгеруіне сезімталдығы, зерттеу басында күтілгендей, табиғи Лангерганс аралшықтарының жасушаларымен салыстырғанда төмен болатыны анықталды.

Диссертацияның ғылыми жобалармен байланысы.

Жұмыс М.А. Айтхожина атындағы молекулалық биология және биохимия институтының құрылымдық және функционалдық геномика зертханасында орындалды. Зерттеу ҚР ҒЖБМ Ғылым комитетінің гранттық қаржыландыру конкурсы шеңберінде «МикроРНК негізінде диабеттік ретинопатияны диагностикалау және болжау үшін жаңа әрі аз инвазивті

биомаркерді сәйкестендіру" AP08857430 гранттық жобасы қаражаты есебінен жүзеге асты. Сонымен қатар, сипатталған зерттеулердің бір бөлігі Британдық Колумбия университетінің қант диабетін зерттеу орталығында (Ванкувер қаласы, Канада) жүргізілді. Орталықтағы зерттеу балалар диабетін зерттеу қорының гранттық қаржыландыруы (Juvenile Diabetes Research Foundation - JDRF, қазіргі уақытта - Breakthrough T1D) аясында жасалды.

Диссертацияда сипатталған нәтижелерге автордың қосқан үлесі. Докторант осы диссертацияда сипатталған барлық эксперименттерді өз бетінше орындады. Сонымен қатар зерттеу барысында алынған нәтижелерге өз бетінше талдау жасады, кестелер мен сызбаларды жасап, әдебиеттерді іздеді және осы диссертацияны өз қолымен жазды.

Зерттеудің нәтижелерін апробациялау. Зерттеу нәтижелері Қазақстандағы және шетелдегі келесідей республикалық және халықаралық конференцияларда таныстырылды: V Халықаралық Фараби оқулары, 2018 ж. Алматы, Қазақстан; «International trends in Science and Technology» халықаралық конференциясы, 2018 ж. Варшава, Польша; Академик М.А.Айтхожиннің 80 жылдығына арналған «Молекулалық биология, биотехнология және биохимиядағы іргелі зерттеулер мен инновациялар» атты жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы, 2019 ж. Алматы, Қазақстан; Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби Әлемі» халықаралық ғылыми конференциясы, 2019 ж. Алматы, Қазақстан; VI Халықаралық жас ғалымдар Конгресі, 2019 ж. Алматы, Қазақстан; А.Д.Дүйсекеевтің 80 жылдығына арналған «Қазіргі замандағы денсаулық сақтауды дамытудың жаһандық тенденциялары» халықаралық ғылыми-практикалық конференция, Алматы, Қазақстан, 8-9 желтоқсан 2022 ж.; «Advanced Technologies and Treatments for Diabetes» халықаралық конференциясы, Берлин, Германия, 2023 ж.; I халықаралық «Asfen.Форум, жаңа буын – 2023» форумы; М.А.Айтхожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институтының құрылғанына 40 жыл толуына арналған «Молекулалық биология, биохимия, биотехнология саласындағы іргелі және қолданбалы зерттеулер» атты жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы, Алматы, Қазақстан, 2023 ж.; Қазақстан Республикасының диабет қауымдастығының конференциясы, Алматы, Қазақстан, 2023 ж.

Публикациялар. Диссертацияның мазмұны мен негізгі нәтижелері 13 баспа жұмыстарында, оның ішінде Web of Science және/немесе Scopus дерекқорына кіретін нөлдік емес импакт-факторы бар шетелдік журналдарда 2 мақала және 1 тезис түрінде, республикалық ғылыми басылымдарда 3 мақала (оның ішінде ҚР ҒЖБМ ҒЖБССҚ тізімінен 2 мақала), сондай-ақ халықаралық ғылыми-практикалық конференциялар жинақтарында 1 мақала және 6 тезис түрінде жарыққа шықты.

Диссертацияның құрылымы. Диссертация 90 беттен және белгілеулер мен қысқартулардан, кіріспеден, әдеби шолу, материалдар мен әдістерден, нәтижелер мен талқылаудан, қорытындыдан және 169 атаудан тұратын пайдаланылған әдебиеттер тізімінен тұрады. Сондай-ақ 32 суреттен тұрады.