

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

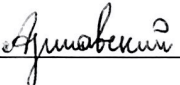
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ

Направление подготовки 06.04.01 Биология
Магистерская программа «Биоресурсы и биоразнообразие»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА
АРШАВСКОГО КИРИЛЛА ВЯЧЕСЛАВОВИЧА

**ИЗМЕНЕНИЯ ЛАНДШАФТА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФАКТОРОВ ДОЛГОВРЕМЕННОГО
КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА В ТКАНЯХ DANIO RERIO
(ACTINOPTERYGII, CYPRINIFORMES)**

Работа завершена:


« 5 » июля 2019 г.  (К.В. Аршавский)

Работа допущена к защите:

Научные руководители:

Ведущий н.с виртуальной научно-исследовательской лаборатории

OpenLab «Экстремальная биология», ассистент


« 5 » 06 2019 г.  (О.А. Гусев)

Зав. Отд. Беспозвоночных зоомузея, ст.преподаватель

« 5 » июля 2019 г.  (А.В. Беспятых)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

« 05 » 06 2019 г.  (Р. М. Сабиров)

Казань – 2019

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: *Danio rerio* (ACTINOPTERYGII, CYPRINIFORMES), CAGE, АОН, МИКРОГРАВИТАЦИЯ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, AP-1, ЦИРКАДНЫЙ РИТМ, ФОРМА И АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРОВ

Работа посвящена влиянию факторов долговременного космического полета на ландшафт инициации транскрипции в тканях глаза *D. rerio* методом Кэп-анализа экспрессии генов (CAGE).

Выявлено специфическое для космического полета повышение экспрессии генов, кодирующих ряд важных транскрипционных факторов, а так же значимое обогащение мотивов связывания этих транскрипционных факторов перед промоторами генов изменяющих активность.

Исследование морфологии промоторных областей не выявило существенных отличий в форме промоторов между экспериментальной — орбитальной и контрольной группами.

Был проведен функциональный анализ, в результате которого была показана значительная вовлеченность генов, изменяющих экспрессию в важных метаболических путях. В том числе, в условиях реального космического полета установлено влияние микрогравитации на регуляцию циркадного ритма.

В результате исследования морфологии промоторных областей не было установлено существенных отличий в форме промоторов между экспериментальной и контрольной группами. Было выявлено, что специфическое для космического полета повышение экспрессии генов, кодирующих ряд важных транскрипционных факторов.

Выпускная квалификационная работа изложена на **74** страницах, содержит **1** таблицу, **16** рисунков. Библиография **85** наименований.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
1.ВЛИЯНИЕ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА ОРГАНИЗМ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭТИХ ЭФФЕКТОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	8
1.1. ОБЗОР МЕТОДИК ПРОВЕРКИ ВЛИЯНИИ МИКРОГРАВИТАЦИИ.....	8
НА ОРГАНЫ ЧЕЛОВЕКА И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ.	8
1.1.1. Микрогравитация	8
1.1.2.РОССИЙСКИЕ И СОВМЕСТНЫЕ С ДРУГИМИ СТРАНАМИ ПРОЕКТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ МИКРОГРАВИТАЦИИ.	11
1.1.2.1. Проект «Бион-М»	11
1.1.2.2. Продолжение программы «Medaka Osteoclast» проект «AQH-3..	14
1.1.2.3. Влияние микрогравитации на экспрессию генов.....	16
1.2. КРАТКИЙ ОБЗОР СИСТЕМНЫХ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ.....	20
НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА	20
1.2.1. Костно мышечная система	20
1.2.2. Сердечно-сосудистая система.....	20
1.2.4. Иммунная система и заживление ран	21
1.2.5. Мочевыделительная система	22
1.2.6. Зрительная система	22
1.2.7. Циркадные ритмы	23
1.3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОМОТОРОВ	23
2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1. КРАТКАЯ МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА DANIO RERIO.....	26
2.2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ	29
2.3. ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	32
3.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРЕДОБРАБОТАННЫХ ДАННЫХ	36

3.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОМОТОРНОГО ЛАНДШАФТА.....	39
3.2.1. Форма промоторных областей.....	39
3.2.2. Характеристика точки инициации.....	43
3.2.3. Дифференциальная активность промоторных областей.....	46
3.2.4. Идентификация регуляторных мотивов.	55
ВЫВОДЫ	59
ЛИТЕРАТУРА.....	60
ПРИЛОЖЕНИЕ	70

ВВЕДЕНИЕ

Полвека назад возникла и сформировалась самостоятельная научная дисциплина «космическая биология». Будучи неотъемлемой частью гравитационной биологии, она была призвана сыграть важную роль в выявлении и осмыслении значения силы тяжести в эволюции живых систем на Земле.

На сегодняшний день большое внимание уделяется исследованиям в области гравитационной физиологии по изучению влияния гравитации на организм человека на орбитальных космических станциях. В связи с этим, ставится значительное количество экспериментов на Земле имитирующих условия космического полета, немало осуществляется и реальных космических экспериментов на борту пилотируемых и беспилотных космических аппаратов. Ключевым направлением в этих экспериментах становится анализ структурных и функциональных изменений в тканях живых организмов под воздействием микрогравитации и других факторов космического полета, а также поиск путей для устранения этих негативных последствий. Для таких масштабных исследований нужны качественные эксперименты, которые в большинстве стран ставятся на Земле. Прежде всего, это связано с крайне дорогостоящей доставкой материалов и оборудования на орбиту и проблематичностью оказания космонавтам квалифицированной медицинской поддержки в случае ухудшения состояния здоровья во время полета.

Многочисленные наблюдения показали, что пребывание человека в космосе влечет за собой изменения в клеточном обмене веществ, функциях иммунных клеток (Spielmann, 2018), клеточном делении, почках (Whitson et al., 2009; Noskov, 2013; Smith et al., 2014), развитии костных клеток, а также тенденциями к развитию нарушения ряда функций, в частности, в сердечно-сосудистой системе (Blaber, 2010; Hughson et al., 2018) и зрительной (Mader et al., 2011, 2015; Lee et al., 2016; Makarov, 2017).

В нашем исследовании обсуждается влияние микрогравитации на организм рыбы *Danio rerio* (Hamilton, 1822) и возможные меры противодействия этим воздействиям.

Циклом экспериментов показано, что нарушение базовых показателей под действием длительной невесомости в меньшей степени проявляется у водных животных, в частности у рыб. У них не происходит серьезных сдвигов в функционировании систем организма по причине того, что они эволюционно приспособились в водной среде к низким энергетическим тратам на преодолении гравитационных сил.

Таким образом, следует ожидать, что водные организмы, в том числе и водные млекопитающие, смогут перенести длительную невесомость значительно легче, чем наземные животные и человек. В то же время использование водных организмов (в ситуации, когда гравитационная составляющая скомпенсирована водной средой) позволяет вычлнить дополнительные факторы влияния космического пространства на организм. В дальнейшем по этим факторам можно найти причину отрицательных реакций конкретных физиологических систем человеческого организма на условия микрогравитации и возможные меры противодействия им. Одним из основных пробелов в наших знаниях в этой области является влияние микрогравитации на клеточном и генетическом уровне.

С целью продолжения исследований по воздействию микрогравитации на остеобласты и остеокласты (Chatani et al., 2015; Chatani et al., 2016), была сформирована программа российско-японских экспериментов AQH-Aquarium на борту международной космической станции по выявлению влияния долгосрочного космического полета на рыбах Японская медака *Oryzias latipes* и Полосатая гирелла *Danio rerio*. В рамках данного проекта было осуществлено и наше исследование, целью которого стала оценка изменения ландшафта экспрессии генов на уровне сайтов инициации транскрипции под воздействием факторов длительного космического полета в тканях *D. rerio*, в ходе которого решались следующие задачи:

1. Сравнить показатели экспрессии генов в образцах органов глаза и сердца рыб из групп, содержащихся на Земле и на Международной Космической Станции (МКС) и провести функциональное обогащение дифференциально экспрессирующихся групп генов.

2. Оценить форму промоторных областей генов и динамику ее изменения под действием условий космического полета.

3. Выявить наиболее представленные мотивы связывания транскрипционных факторов и произвести их идентификацию. Проанализировать особенности регуляции промоторной активности в ответ на стресс.

4. Реконструировать регуляторные механизмы, определяющие динамику ответа на действие факторов продолжительного космического полета

ВЫВОДЫ

1. Исследование морфологии промоторных областей не выявило существенных отличий в форме промоторов между экспериментальной — орбитальной и контрольной группами.

2. Анализ транскрипционного ответа на воздействие факторов длительного космического полета позволил выявить группы генов, значимо изменяющих экспрессию по сравнению с земными условиями. Значительная часть таких генов быстро активируется в начальной стадии космического полета в ответ стресс при изменении ключевых физических параметров среды обитания, однако, в дальнейшем происходит снижение числа дифференциально экспрессируемых генов за счет адаптационных процессов.

3. Функциональный анализ продемонстрировал значительную вовлеченность генов, изменяющих экспрессию, в важные метаболические пути. В том числе, в условиях реального космического полета установлено влияние микрогравитации на регуляцию циркадного ритма.

4. Выявлено специфическое для космического полета повышение экспрессии генов, кодирующих ряд важных транскрипционных факторов, семейств Sp/Klf и AP-1, а так же значимое обогащение мотивов связывания этих транскрипционных факторов перед промоторами генов изменяющих активность, что может свидетельствовать о наличии особой системы регуляции транскрипции, чувствительной к условиям космического полета.