

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 биоразнообразии»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА
НИГМЕТЗЯНОВА ИСЛАМА РИНАТОВИЧА

**ПРОМОТЕРОМ МЫШЦ КРЫС ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ
АТРОФИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕМ ВОССТАНОВЛЕНИИ**

Работа завершена:

" 03 " 06 2019 г.



(И. Р. Нигметзянов)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

Кандидат биологических наук, в.н.с

" 03 " 06 2019 г.



(О. А. Гусев)

Консультант

Кандидат биологических наук, доцент

" 3 " июля 2019 г.



(Л. В. Малютина)

Заведующий кафедрой

Кандидат биологических наук, доцент

" 03 " 06 2019 г.



(Р. М. Сабиров)

Казань – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЛОКОН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	7
1.2 ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ОПОРНОЙ РАЗГРУЗКЕ	11
1.3 ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ В НАЗЕМНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ	15
1.4 ИЗВЕСТНЫЕ МЕРЫ ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ АТРОФИИ МЫШЦ	19
1.5 РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МЫШЦАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ГИПОДИНАМИИ	22
1.6 ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ РНК МЕТОДОМ CAGE-SEQ	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	32
2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.2 МОДЕЛЬ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ	33
2.3 ПОДГОТОВКА И СЕКВЕНИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК CAGE	34
2.4 БИОИНФОРМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЧТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA	35
2.5 КАРТИРОВАНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИКОВ CAGE И АССОЦИАЦИЯ С ИЗВЕСТНЫМИ ГЕНАМИ	36
2.6 АННОТАЦИЯ ПРОМОТОРОВ	36
2.7 АНАЛИЗ МОТИВОВ СВЯЗЫВАНИЯ С ФАКТОРАМИ ТРАНСКРИПЦИИ	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	38
3.1 АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНОГО ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ РНК МЕТОДОМ CAGE-SEQ	38
3.2 АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ПРОМОТОРОВ В ДВУХ ТИПАХ МЫШЦ В ПРОЦЕССЕ АТРОФИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ	46
3.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОМОТОРОВ И ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ПРОЦЕСС АТРОФИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОБЕИХ ИССЛЕДУЕМЫХ МЫШЦАХ	50

3.4 Идентификация ключевых транскрипционных факторов, участвующих в контроле атрофических изменений	61
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	68
ВЫВОДЫ	70
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:.....	71

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: скелетная мускулатура, атрофия, мышечная разгрузка, вывешивание, крыса, *Rattus norvegicus*, CAGE, NGS, секвенирование, промотером.

Проведено исследование влияния различных сроков антиортостатической разгрузки (с/без последующего восстановления) на промоторную активность в типичной оксидативной *m. soleus* и в типичной гликолитической *m. EDL* лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*). Крысы (21 половозрелый самец линии Wistar массой 289 ± 57) были поделены на 1 контрольную и 6 экспериментальных групп: 1, 3 и 7 дней антиортостатического вывешивания задних конечностей (Morey-Holton, Globus, 2002) и 1, 3 и 7 дней восстановления после 7 дней вывешивания. Животные контрольной группы находились в стандартных условиях вивария. Выделенные после окончания эксперимента исследуемые мышцы замораживались в жидком азоте с последующим хранением при температуре -70 градусов по Цельсию, затем из них была извлечена тотальная РНК (набор RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Германия), которая после обработки ДНКазой (Thermo Fisher Scientific) была использована для подготовки CAGE-библиотек. Библиотеки секвенировались на платформе HiSeq Illumina 2500, и полученные данные впоследствии обрабатывались и анализировались при помощи разных программ (bash, R, bwa, samtools и т. д.). Было установлено, что промотеры в *m. soleus* не имеют значительных изменений в транскрипционной активности на всех этапах ортостатической разгрузки, кроме первого дня восстановления, где наблюдается самый резкий и сильный сдвиг экспрессии среди всех экспериментальных групп. В то же время, *m. EDL* показывает быструю и стабильную реакцию на разгрузку и быстрое восстановление после помещения в нормальные условия. Также, были определены ключевые транскрипционные факторы, осуществляющие регуляцию активности специфичных мышечных промоторов (TBP, SP, KLF, NOXA). Ключевые для *m. soleus* и *m. EDL* транскрипционные факторы менялись в ходе эксперимента, но возвращались к значениям контрольной группы к 7 дню восстановления. Такой транскрипционный фактор, как KLF16, связан с особенностями регуляции восстановительных процессов в оксидативных мышцах (*m. soleus*). Полученные нами данные хорошо согласуются с проведенными раньше морфологическими исследованиями мышечной атрофии и сильно дополняют молекулярно-генетические работы прошедших лет.

Выпускная квалификационная работа изложена на 80 страницах, содержит 37 рисунков, 7 таблиц, список литературы 77 наименований.

ВВЕДЕНИЕ

Жизнь человека сопровождается самыми различными видами гиподинамии: малоактивный образ жизни, постельный режим больного, иммобилизация конечности (наложение гипса/лонгеты) – что приводит к атрофическим процессам в мышечной ткани. Также, в отдельный вид гиподинамии можно выделить опорную разгрузку мышц у космонавтов, вследствие их пребывания в условии невесомости. При длительном ограничении двигательной активности у скелетных мышц наблюдается снижение функциональных возможностей и различные структурные изменения, что в свою очередь сильно затрудняет последующую реабилитацию как двигательной, так и других систем организма (Таракин, 2007). Таким образом, исследование влияния гиподинамии на опорно-двигательный аппарат у млекопитающих является весьма актуальной проблемой как медицины, так и космической биологии.

Несмотря на существование значительного количества работ, выполненных по тематике атрофии мышц вследствие гиподинамии, вопрос разработки эффективных мероприятий, препятствующих атрофическим процессам, остается открытым. В настоящее время продолжается исследование различных новых способов профилактики и коррекции неблагоприятных последствий гиподинамии и функциональной разгрузки на локомоторный аппарат, такие как миостимуляция электрическим током (Leterme, Falempin, 1994; Dupont et al., 2010), превентивное воздействие повышенной (Takeda et al., 2009) и пониженной температуры (Deng et al., 2015) на организм млекопитающего.

При изучении последствий опорной разгрузки мышц у людей используется большое количество различных моделей и методик, среди которых наиболее часто применяются сухая иммерсия и постельная гипокинезия. Из-за биоэтических соображений и различных сложностей, связанных с изучением механизмов атрофии мышц в организме человека, для исследования эффектов гравитационной разгрузки используются различные

модели животных (Powers, 2014). В частности, при работе с такими модельными биообъектами как крысы используется методика антиортостатического вывешивания (АОВ) задних конечностей, разработанная В. Е. Новиковым и Е. А. Ильиным (Новиков, Ильин, 1980). Из преимуществ данной модели перед остальными можно выделить возможность изучения морфологических и биохимических изменений в различных тканях и органах, дешёвизну и возможность вносить поправки в ходе эксперимента. Результаты экспериментов, проводившихся с использованием этой методики в земных условиях, совпадают с результатами экспериментов, проводимых на международной космической станции (МКС) (Новиков, Ильин, 1981). Однако, с точки зрения молекулярно-генетических методов исследования, феномен атрофии мышечных волокон в условиях гиподинамии изучен недостаточно: не изучены многие регуляторные элементы генома, не выявлены все ключевые и альтернативные промоторы, отвечающие за процессы патологии/восстановления и т. д.

Таким образом, **целью** настоящей работы явилось изучение профилей экспрессии генов в мышцах *m. soleus* и *m. edl* у крыс при ортостатической разгрузке и последующем восстановлении.

Для достижения цели нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести эксперимент по направленной атрофии и восстановлению мышц задних конечностей крыс методом ортостатической разгрузки.
2. Провести анализ дифференциальной экспрессии промоторов в двух типах мышц в процессе атрофии и восстановления методом *scage-seq*.
3. Определить промоторы и гены, вовлеченные в процесс атрофических изменений в двух исследуемых мышцах.
4. Идентифицировать ключевые транскрипционные факторы, участвующие в контроле атрофических изменений в мышцах крыс в условиях ортостатической разгрузки.

ВЫВОДЫ

1) Наибольшее количество уникальных дифференциально экспрессирующихся промоторов обнаруживается и при сравнении *m. soleus* из группы «Вывешивание 7 дней; восстановление 1 день» с *m. soleus* из контрольной группы. Промоторы в *m. soleus* не имеют значительных изменений в транскрипционной активности на всех этапах ортостатической разгрузки, после чего, на первый день восстановления, наблюдается резкий и сильный сдвиг экспрессии.

2) *m. EDL* показывает быструю и стабильную реакцию на разгрузку и быстрое восстановление после помещения в нормальные условия.

3) Атрофические изменения на уровне промоторов в обоих мышцах отмечаются уже на первый день ортостатической разгрузки, после чего наблюдается уменьшение дифференциально экспрессирующихся генов и связанных с ними промоторов.

4) Ключевые транскрипционные факторы, осуществляющие регуляцию активности специфичных мышечных промоторов - это TBP, SP, KLF, NOXA .

5) Такой транскрипционный фактор как KLF16 связан с особенностями регуляции восстановительных процессов в оксидативных мышцах (*m. soleus*).

6) Ключевые для *m. soleus* и *m. EDL* транскрипционные факторы меняются в ходе эксперимента и возвращаются к значениям контрольной группы к 7 дню восстановления.