

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

“КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”

ОТЧЕТ о деятельности OpenLab “Экстремальная биология”

Научный руководитель

PhD, к.б.н, в.н.с.

Гусев О.А.

Руководитель Приоритетного направления

«Биомедицина и фармацевтика»,

Директор Института фундаментальной

медицины и биологии, д-р биол. наук, проф.

Киясов А.П.

Казань 2015

Название лаборатории: “Экстремальная биология”

Дата создания лаборатории: № 01-06/236 от 12.03 .2014

Расположение: Казань, ул. Парижской комм. 9 (отдел экстремальной биологии) и ул.

Волкова-18 , РКБ-2 (отдел функциональной геномики и полногеномного секвенирования)

Научный руководитель лаборатории: Гусев Олег Александрович, в.н.с., к.б.н., Phd

Основное Место работы: в.н.с., куратор проектов, Программа Превентивной медицины и инновационной диагностики, департамент геномных технологий институт РИКЕН,
(Йокогама, Япония)

Телефон: +81-45-503-9218

E-mail: oleg.gusev@riken.jp

Приоритетное направление ППК: «Биомедицина и фармацевтика»

Основные направления деятельности и проекты (2014-2015):

Лаборатория занимается исследованиями в области функциональной геномики животных и человека с особым вниманием к адаптационным механизмам в экстремальных условиях. Также активно развивается биомедицинское направление основанное на применении высокопроизводительного секвенирования в разработке новых диагностических методов.

Основные направления работы включают:

- Полногеномная идентификация промоторов контролирующих спячку и ангидриобиоз. Исследования ориентированы на идентификацию особенностей генетического контроля процессов спячки в млекопитающих и полного аметаболизма в других группах животных. Также разрабатываются методы безводного хранения живых тканей и клеток.
- Внедрение в клиническую практику аспектов персонифицированного генетического анализа. Это достигается за счет активной интеграции знаний о фармакогенетике и других полиморфизмах клинического значения в больничную практику.
- Разработку диагностических панелей оценивающих экспрессию генов/промоторов/некодирующих РНК специфичных для того или иного сценария развития раковых заболеваний.

Научные партнеры лаборатории

National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS, Япония).

<http://www.nias.affrc.go.jp/>

Примечания: Один из ключевых партнеров КФУ в области исследования криптобиоза и гипометаболизма.

Okinawa Institute of Science and Technology

<http://www.oist.jp/>

Примечания: созданный в 2006 году инновационный институт в Японии, ориентированный на быстрое вхождение в список ведущих университетов мира

RIKEN Omics Center (Япония)

<http://www.osc.riken.jp/english/>

Примечания: ведущий институт сети RIKEN с которым у КФУ сложились тесные академические и исследовательские связи.

Kyoto University (Япония),

<http://www.kyoto-u.ac.jp/en>

Примечания: В последние годы сложились совместные интересы в области изучения гипометаболических состояний животных. В университете работает одна из наиболее известных групп по изучению спячки млекопитающих.

Karolinska Institute (Швеция),

<http://ki.se/>

Примечания: Планируется приглашение Igor Adameyko молодого руководителя лаборатории. Институт является одним из ведущих в Европе. На базе КФУ планируется запуск био-медицинских исследований по регенеративной тематике с использованием технологических разработок Karolinska Institute в области микроскопии и работы с отдельными клетками.

Московский Государственный Университет. Факультет биоинженерии и биоинформатики

<http://www.fbb.msu.ru/>

Группы факультета являются ведущими специалистами в РФ в области полногеномного секвенирования растительных и животных геномов, включая немодельные виды.

ГНЦ Институт Медико-биологических проблем РАН.

<http://www.imbp.ru/>

Ключевой институт в РФ по планированию и проведению российских и совместных международных экспериментов в области космической биологии и медицины

Кадровый состав лаборатории

№ п/п	ФИО	Ученая степень	Ученое звание	Должность (в OpenLab)	Должность (осн.)
1.	Ананьева Анастасия Викторовна 18.06.1992	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
2.	Беспятых Дмитрий Андреевич 19.11.1994	-	-	лаборант	
3.	Бояршинов Андрей Владимирович 10.03.1984	к.б.н.	М.Н.С.	М.Н.С.	
4.	Газизова Гузель Рашитовна 07.01.1988	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
5.	Гусев Олег Александрович 22.08.1979	к.б.н., PhD	В.Н.С.	В.Н.С.	В.Н.С. RIKEN (Япония)
6.	Девятяров Руслан Мансурович 19.02.1992	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
7.	Кадиров Азат Гилмханович 19.08.1986	-	М.Н.С.	М.Н.С.	электроник
8.	Китаева Кристина Викторовна 02.06.1993	-	М.Н.С.	лаборант	
9.	Козлова Ольга Сергеевна 05.04.1985	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
10.	Кондратьева Сабина Александровна 01.06.1994	-	-	лаборант	
11.	Логачева Мария Дмитриевна 14.06.1983	к.б.н.	В.Н.С.	В.Н.С.	В.Н.С., МГУ
12.	Минькина Елена Александровна 20.12.1990	-	-	лаборант	
13.	Несмелов Александр Александрович 25.10.1986	к.б.н.	Н.С.	Н.С.	
14.	Рябова Алина Валерьевна	к.б.н.	М.Н.С.	М.Н.С.	

	10.08.1986				
15.	Черкасов Александр Вадимович 24.08.1985	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
16.	Шагимарданова Елена Ильясовна 27.01.1984	К.Б.Н.	С.Н.С.	С.Н.С.	
17.	Шигапова Лейля Хуззатовна 25.10.1989	-	М.Н.С.	М.Н.С.	
18.	Такахиро Кикавада		PhD	Внештатный консультант	в.н.с., NIAS (Япония)
19	Ясухиро Муракава		PhD	Внештатный консультант	в.н.с., RIKEN (Япония)
20	Йошихиде Хаяшизаки		PhD	Внештатный консультант	Директор программы PMI, RIKEN (Япония)

Перечень дорогостоящего научного оборудования

№	Инвентарный номер	Наименование оборудования	Дата поступления	Стоимость оборудования
1	КФУ-410134-0000043241	Шкаф ламинарный биологической защиты (2 класс, вертикальный поток, NU-437-400E, ш. раб. пов. 1200 мм)	30.09.2014	524154,00
2	КФУ-410134-0000045219	Центрифуга с охлаждением с комплектом роторов и адаптеров 5804 R Eppendorf	19.11.2014	540000,59
3	КФУ-410134-0000045230	Морозильник Innova U535, низкотемпературный вертикальный 535 л.от -50С до -86С	21.11.2014	709897,00
4	КФУ-410134-0000045307	Камера климатическая для роста растений ККР-001	04.12.2014	885840,00
5	КФУ-410134-0000046000	Вычислительная техника-суперкомпьютер TESLA HPC-2030+монитор DELL	11.12.2014	749380,00
6	КФУ-410134-0000045937	Амплификатор нуклеиновых кислот (ДНК-амплификатор C1000 Touch 2*48 Reaction Module. Bio-Rad.США)	11.12.2014	735881,25
7	КФУ-410134-0000047108	Детектор флуоресцентный FLD-3100 с аналитической проточной ячейкой, 8мм	30.12.2014	886000,00
8	КФУ-410134-0000049830	Микроскоп биологический для лабораторных исследований Stereo Discovery V12	31.03.2015	1468050,00

Стажировки сотрудников OpenLab “Экстремальная биология” (2014-2015)

№ п/п	ФИО	Название организации	Срок прохождения стажировки	Тип прохождения стажировки
1.	Ананьева Анастасия Викторовна	Институт медико- биологических проблем РАН	11.09.14-13.11.09	Сбор материала, Обучение методам
2.	Девятяров Руслан Мансурович	Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова	25.04.14-13.07.14	Обучение методам
3.	Девятяров Руслан Мансурович	Национальный институт агробиологических наук, Тсукуба, Япония	01.08.14-30.11.14	Обучение методам
4.	Девятяров Руслан Мансурович	Институт физико-химических исследований Рикен, Йокогама, Япония	23.03.15-02.10.15	Обучение методам
5.	Козлова Ольга Сергеевна	Национальный институт агробиологических наук, Тсукуба, Япония	23.04.14-30.06.14	Обучение методам
6.	Козлова Ольга Сергеевна	Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ имени М.В. Ломоносова	08.11.15-11.11.15	Обучение методам
7.	Минькина Елена Александровна	Лаборатория системной биологии и вычислительной генетики, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН	11.10.15-14.10.15	Обучение методам
8.	Несмелов Александр Александрович	Национальный институт агробиологических наук, Тсукуба, Япония	05.04.15-06.06.15	Обучение методам
9.	Рябова Алина Валерьевна	Центр новых технологий, Варшавский университет, Варшава, Польша	15.11.15-29.11.15	Сбор материала, Обучение методам
10.	Черкасов Александр Вадимович	Центр новых технологий, Варшавский университет, Варшава, Польша	15.11.15-29.11.15	Сбор материала, Обучение методам
11.	Шагимарданова Елена Ильясовна	Лаборатория Системной биологии и геномики, Институт медицинских исследований Гарри Перкинса	29.09.15-16.10.15	Сбор материала, Обучение методам

Публикации лаборатории (2014-2015)

Indo H.,Tomiyoshi T., Suenaga Sh.,Tomita K., Suzuki H.,Masuda D., Terada M., Ishioka N.,Gusev O.,Cornette R., Okuda T., Mukai Ch., Majima H. **MnSOD downregulation induced by extremely low 0.1 mGy single and fractionated X-rays and microgravity treatment in human neuroblastoma cell line, NB-1** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 57-2, 98-104 (Wos, Scopus)

A. F. Branco, S. P. Pereira, S. Gonzalez, O. Gusev, A. A. Rizvanov and P. J. Oliveira 2015 **Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype** Plos One 10 6 JUN 29 2015 1932-6203 WOS:000358150400019 (Wos, Scopus)

R. Cornette, O. Gusev, Y. Nakahara, S. Shimura, T. Kikawada and T. Okuda 2015 **Chironomid Midges (Diptera, Chironomidae) Show Extremely Small Genome Sizes** Zoological Science 32 3 248-254 JUN 2015 Chironomid Midges (Diptera, Chironomidae) Show Extremely Small Genome Sizes 0289-0003 WOS:000355110700005 (Wos, Scopus)

R. Hatanaka, O. Gusev, R. Cornette, S. Shimura, S. Kikuta, J. Okada, T. Okuda and T. Kikawada 2015 **Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge Polypedilum vanderplanki** Planta 242 2 451-459 AUG 2015 Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge Polypedilum vanderplanki 0032-0935;1432-2048 WOS:000358168000009 (Wos, Scopus)

Petrova, NA, Cornette, R Shimura, Gusev, OA Pemba, D; Kikawada, T, Zhirov, SV Okuda, T 2015 **Karyotypical characteristics of two allopatric African populations of anhydrobiotic Polypedilum Kieffer, 1912 (Diptera, Chironomidae) originating from Nigeria and Malawi.** Comparative Cytogenetics, 9 Issue: 2 Pages: 173-188. WOS:000354296300003 (Wos, Scopus)

Schelkunov, Mikhail I.; Shtratnikova, Viktoria Yu; Nuraliev, Maxim S.; Selosse, Marc-Andre; Penin, Aleksey A.; Logacheva, Maria D. **Exploring the Limits for Reduction of Plastid Genomes: A Case Study of the Mycoheterotrophic Orchids Epipogium aphyllum and**

Epipogium roseum Genome Biology and Evolution, 2015 Volume: 7 Issue: 4 Pages: 1179-1191 Published: APR 2015 WOS:000355148800021 (Wos, Scopus)

H. P. Indo, H.-C. Yen, I. Nakanishi, K.-i. Matsumoto, M. Tamura, Y. Nagano, H. Matsui, O. Gusev, R. Cornette, T. Okuda, Y. Minamiyama, H. Ichikawa, S. Suenaga, M. Oki, T. Sato, T. Ozawa, D. K. St Clair and H. J. Majima 2015 **A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging** Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 56 1 1-7 JAN 1 2015 A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging 0912-0009;1880-5086 WOS:000351191000001 (Wos, Scopus)

O. Gusev, Y. Suetsugu, R. Cornette, T. Kawashima, M. D. Logacheva, A. S. Kondrashov, A. A. Penin, R. Hatanaka, S. Kikuta, S. Shimura, H. Kanamori, Y. Katayose, T. Matsumoto, E. Shagimardanova, D. Alexeev, V. Govorun, J. Wisecaver, A. Mikheyev, R. Koyanagi, M. Fujie, T. Nishiyama, S. Shigenobu, T. F. Shibata, V. Golygina, M. Hasebe, T. Okuda, N. Satoh and T. Kikawada 2014 **Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge** Nat Commun Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5784> WOS:000342928500002 (Wos, Scopus)

R. R. Islamov, O. A. Gusev, A. Tanabe, M. Terada, O. V. Tyapkina, K. A. Petrov, A. A. Rizvanov, I. B. Kozlovskaya, E. E. Nikolskiy and A. I. Grigorjev 2014 **Genomic analysis of mouse lumbar spinal cord after 30-day space flight on biosatellite Bion-M1** Doklady Biochemistry and Biophysics Pleiades Publishing 458 1 177-178 2014/09/01 Genomic analysis of mouse lumbar spinal cord after 30-day space flight on biosatellite Bion-M1 Dokl Biochem Biophys 1607-6729 (Wos, Scopus)

N. Novikova, E. Deshevaya, M. Levinskikh, N. Polikarpov, S. Poddubko, O. Gusev and V. Sychev 2015 **Study of the effects of the outer space environment on dormant forms of microorganisms, fungi and plants in the 'Expose-R' experiment** International Journal of Astrobiology 14 1 137-142 JAN 2015 Study of the effects of the outer space environment on dormant forms of microorganisms, fungi and plants in the 'Expose-R' experiment 1473-5504;1475-3006 WOS:000348641500016 (Wos, Scopus)

M. Sugimoto, Y. Oono, O. Gusev, T. Matsumoto, T. Yazawa, M. A. Levinskikh, V. N. Sychev, G. E. Bingham, R. Wheeler and M. Hummerick **2014 Genome-wide expression analysis of reactive oxygen species gene network in Mizuna plants grown in long-term spaceflight**
Bmc Plant Biology 14 JAN 6 2014 Genome-wide expression analysis of reactive oxygen species gene network in Mizuna plants grown in long-term spaceflight 1471-2229
WOS:000334469800001 (Wos, Scopus)

I. Сведения о наиболее значимых научных результатах НИР Open Lab Экстремальная биология

1. Наименование результата:

Атлас экспрессии промоторов в криптобиотической клеточной культуре Pv11

2. Результат научных исследований и разработок (выбрать один из п. 2.1 или п. 2.2)

2.1. Результат фундаментальных научных исследований

- теория	☐
- метод	☐
- гипотеза	☐
- другое (расшифровать):	

База данных

2.2. Результат прикладных научных исследований и экспериментальных разработок

- методика, алгоритм	☐
- технология	☐
- устройство, установка, прибор, механизм	☐
- вещество, материал, продукт	☐
- штаммы микроорганизмов, культуры клеток	☐
- система (управления, регулирования, контроля, проектирования, информационная)	☐
- программное средство, база данных	☐
- другое (расшифровать):	

3. Результат получен в Приоритетном направлении развития науки, технологий и техники в Российской Федерации:

- Безопасность и противодействие терроризму	☐
- Индустрия наносистем	☐
- Информационно-телекоммуникационные системы	☐
- Науки о жизни	V
- Перспективные виды вооружения, военной и специальной техники	☐
- Рациональное природопользование	☐
- Транспортные и космические системы	☐
- Энергоэффективность, энергосбережение, ядерная энергетика	☐

4. Коды ГРНТИ:

34.15.23, 34.03.33, 34.33.15, 34.03.23

5. Назначение:

Источник информации для изучения регуляторных участков генома в уникальной клеточной культуре Pv11 в ответ на обезвоживание.

6. Описание, характеристики:

Совместно с японским исследовательским центром РИКЕН создана генетическая база на основе данных полученных методом кэп-анализа экспрессии РНК в клеточной культуре Pv11, устойчивой к полному

обезвоживанию. Данные получены по 8 точкам, отражающие различные циклы обезвоживания (вплоть до полностью сухого состояния) и регидратации клеток до их оживления и восстановления работоспособности. Данные получены на платформе секвенирования HiSeq, где на каждую точку исследования приходится 40 миллионов прочтений в двух повторностях. Полученная база данных используется для идентификации регуляторных элементов в геноме контролирующих формирования в клетках молекулярного щита сохраняющего их жизнеспособность. Результаты анализа могут быть использованы, в том числе, для создания рекомбинантных конструкций для работ по направленному повышению устойчивости клеток животных к потере воды.

7. Правовая защита (ОИС):

Не требуется

8. Авторы:

Гусев О.А., Кикавада Т., Шагимарданова Е.И., Девятяров Р. М.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ПРОМОТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОМА, АНГИДРОБИОЗ, УСТОЙЧИВОСТЬ, ПРОМОТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНОМА, ТРАНСКРИПТОМЫ, ЗАЩИТНЫЕ БЕЛКИ, ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ

Объектом исследования является клеточная культура Pv полученная из эмбриональной клеточной массы *Polypedilum vanderplanki*, наиболее сложного организма способного к ангидробиозу – полному обезвоживанию без потери жизнеспособности.

Цель работы – в научном партнерстве с сетью институтов RIKEN изучить особенности активности генома на уровне отдельных клеток, способных к выживанию при полном отсутствие воды. Выявление минимального набора генов, активность которых обеспечивает формирование молекулярного щита защищающего клетки от негативных эффектов обезвоживания. В результате исследования был проведен анализ современной научно-технической и методической литературы по проблеме изучения устойчивости организмов к полному обезвоживанию. Проведена оценка уровня транскрипционной активности генов в цикле индуцированного ангидробиоза: инкубации с трегалозой и далее в ответ на потерю воды и последующую регидратацию в культуре клеток Pv11. Совместно с японскими партнерами успешно опробированы методы подготовки библиотек CAGE на основе извлеченной из клеток Pv11 РНК для дальнейшего анализа активности регуляторных зон в геноме в ангидробиозе.

Результаты работы могут быть использованы как основа для прикладных научных исследований, которые направлены на улучшение существующих методик хранения биоматериалов различного происхождения и создание новых подходов в консервирования биомолекул, клеток и тканей живых существ.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов адаптаций животных-экстремофилов разного уровня организации часто приводит к созданию новых генетических конструкций, способных повышать устойчивость организмов сельскохозяйственного или промышленного

значения, а также к разработке новых фармакологических препаратов и консервантов [1]. Одним из перспективных направлений в области «экстремальной биологии», является изучение устойчивости животных к обезвоживанию. Некоторые живые организмы способны сохранять жизнеспособность при потере воды, индуцируя состояние полного отсутствия метаболизма (феномен ангидробиоза). При этом жизнеспособность организмов сохраняется в течение весьма длительного времени (от десятков лет у эукариот и сотен лет у прокариот). Механизмы ангидробиоза достаточно хорошо изучены для прокариот (индукция споруляции у бактерий) и высших растений (формирование семян). Среди представителей царства животных ангидробиоз встречается только у беспозвоночных малого размера и трудно поддающихся лабораторным манипуляциям (тихоходки, коловратки, артемии). В связи с этим, данные о молекулярных механизмах устойчивости к обезвоживанию в этих группах все еще очень фрагментарны [2]. Самым высокоорганизованным организмом способным переносить полное отсутствие воды являются личинки африканской хирономиды (комара-звонца) *P. vanderplanki*. В основе способности к обезвоживанию лежит замещение воды в клетках на дисахарид трегалозу, что приводит к "застекловыванию" клеток и предотвращению повреждения органелл [3]. Показано, что ангидробиоз - свойство отдельных клеток, а не гормонально контролируемый процесс [4]. Успехом последних лет явилось разработка протокола культивирования культуры эмбриональных клеток *P. vanderplanki* (клеточная линия Pv11), способной к ангидробиозу. При стандартном культивировании, клетки спящей хирономиды чувствительны к обезвоживанию, однако модификация среды позволила экзогенно индуцировать способность к ангидробиозу [5-6]. Кроме того, первые положительные результаты по применению белков хирономиды для повышения устойчивости к обезвоживанию культуры человеческих клеток HepG2 дает уверенность в успешности разработки методов долгосрочного безводного хранения клеток и тканей [7].

Расшифровка генома спящей хирономиды позволила установить ключевые особенности генома, связанные с со способностью к устойчивости к обезвоживанию [8-10]. В частности, выявлены кластеры генов, не найденные в геномах в других насекомых, отвечающие за формирование «молекулярного щита» при обезвоживании. Дальнейшее понимание тканеспецифичной активности генов и белков участвующих в ангидробиозе в рамках предлагаемого проекта обеспечит научно-технический задел для

направленного повышения устойчивости к обезвоживанию в отдельных типах клетках и тканях животных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Особенности транскриптомной активности ангидробиотической клеточной культуры Pv11

Ключевым шагом для успешности следующих этапов реализации проекта была адаптация африканских хирономид и клеточной культуры Pv11 в лаборатории “Экстремальная биология”. Было подписано соглашение о совместных исследованиях и предоставлении биологического материала с университетом Илларина (Нигерия). Таким образом полностью соблюдены условия Нагойского протокола регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместного использования (приложение к конвенции о биологическом разнообразии). В октябре 2014 года во время визита руководителя и других иностранных участников исследовательской группы были оборудованы ростовые камеры для содержания насекомых; были оптимизированы температурный режим, режим влажности и освещения необходимые для полного жизненного цикла насекомых в лабораторных условиях. Было проведено несколько тренингов для российских участников группы и аспирантов КФУ, с целью освоения методов препарирования личинок хирономид для последующего извлечения РНК из различных органов насекомых для анализа экспрессии генов. Часть полученного биоматериала была заморожена для дальнейшего полногеномного секвенирования методом CAGE. Также на базе лаборатории оптимизированы условия поддержания клеточной линии Pv11. Был опробован ряд сред и сделан вывод, что среда IPL является наиболее подходящей для поддержания культуры клеток и инициации в них ангидробиоза. Успешно освоены методы и обеспечена инфраструктура для поддержания культуры ангидробиотических хирономид и клеточной линии Pv11 на базе КФУ. По результатам серии экспериментов с Pv11 были оптимизированы условия индукции ангидробиоза в клеточной линии. Показано что оптимальным для полностью безводного хранения клеток с последующей реактивацией до 80% из них является цикл: преинкубация с 200mM раствором трегалозы, добавленной непосредственно в среду IPL; с последующим пассивным обезвоживанием (6-8 часов). Определены ключевые точки отражающие критические изменения в морфологии и физиологии клеток и, соответственно, вероятно наиболее информативные для анализа экспрессии генов и промотерной активности.

Далее было осуществлено секвенирование генома клеточной линии Pv11 хирономиды с использованием двух подходов спаренных прочтений: paired ends (PE) и mate pairs (MP). С использованием комбинации специализированного ПО и различных методик олучена более точная и целостная сборка генома клеточной культуры хирономиды (значение N50 увеличено более чем в 2 раза). Установлено, что геном клеточной линии отличается от генома личинок на 1-2% на нуклеотидном уровне. В частности, с использованием новых данных mRNASeq было идентифицировано 27 новых кодирующих белки генов не описанных в изначальной версии расшифровки генома хирономиды [10]. С использованием многофункционального геномного браузера Zenbu (разработан под при участии коллеги из RIKEN) и данных геномной сборки визуализирован геном клеточной культуры хирономиды.

На основе новых данных о структуре генома клеточной культуры Pv11 и анализа экспрессии мРНК (методом SE mRNA-Seq) были получены полногеномные профили экспрессии для каждой выбранной стадии цикла ангидробиоза. Результаты оказались достаточно неожиданными: детальный анализ экспрессии 132 генов, активность которых непосредственно в личинках связана с процессом ангидробиоза (LEA белки, белки теплового шока, ферменты синтеза трегалозы, антиоксиданты и др) показал, что сходная по динамике и интенсивности экспрессия этих генов в клетках Pv11 инициируется уже на стадии преинкубации с трегалозой (T48) еще до начала обезвоживания. На этапе непосредственно обезвоживания клеток (T48-Dess-Dry) повышают экспрессию всего несколько генов (преимущественно белков теплового шока Hsp70). Таким образом, можно сделать вывод, о том, что именно содержание трегалозы (либо какой-то из сопряженных с этим факторов) являются сигналом для транскрипционного этапа формирования “молекулярного щита” в клетках.

Анализ данных экспрессии генов расположенных в ARIds (участки генома содержащие кластеры генов-паралогов, активность которых определяет успешность ангидробиоза, см. Gusev et.al, 2014) показал что лишь часть из этих генов экспрессируется в клетках Pv11 в гидратированном состоянии и повышает экспрессию в ответ на обезвоживание. Мы сделали предварительный вывод что возможным объяснением ARIds и генов находящихся в них является ткане-специфичность. И, вероятно, активная паралогизация генов

связанных с ангидробиозом связана с их “специализацией” на определенном типе клеток или тканей.

2. Предварительный анализ культуры Pv11 с использованием метода CAGE.

После успешного секвенирования транскриптома клеток Pv11 критичным шагом для выполнения проекта является полногеномная реконструкция активности сайтов инициации транскрипции и промоторных областей генома – метод CAGE [11]. Процесс пробоподготовки библиотек включал стадии очистки мРНК, синтеза кДНК обратной транскриптазой с олиго-Т праймером. Далее получались мРНК-кДНК гибриды с последующим гидролизом одноцепочечной мРНК. На следующем этапе для каждого транскрипта синтезировался биотинилированный линкер с сайтами узнавания эндонуклеазы и рестриказы разрезающей нуклеиновые кислоты отступая около 20 нуклеотидов от сайта. Далее производилось лигирование 1-го линкера с одноцепочечной кДНК и синтез второй цепи кДНК и обработка эндонуклеазой с последующим синтезом второго линкера содержащего сайт узнавания рестриктазы XbaI. Далее производились лигирование коротких фрагментов со вторым линкером и ПЦР. На завершающей стадии образцы обрабатывались эндонуклеазой MmeI с последующим синтезом второго линкера. После обработки рестриктазами XmaI и XbaI (на этом шаге получали непосредственно CAGE-теги) производилась очистка стрептавидином. Далее лигированием “липких” GATC концов получали конкатемеры. После клонирования последних, библиотеки были подготовлены для секвенирования на платформе HiSeq2000. Для определения минимального необходимого изначального количества общей РНК, был опробован “градиент” количества стартового материала от 500ng до 5 мкг. Как и на стадии анализа mRNASeq, для образцов клеток Pv11 на стадиях цикла ангидробиоза (T0, T48, Des, Dry, R6 и R24) было получено по 30-45 миллионов SE прочтений в трех биологических повторностях. Полученные данные были картированы на обновленную геномную сборку Pv11 и интегрированы в геномный браузер Zenbu.

Проведенный анализ минимально необходимого материала для создания CAGE библиотек хирономид показал, что качественные библиотеки могут быть получены уже при использовании 1 мкг общей РНК из личинок и клеток. Таким образом можно успешно

анализировать полногеномный промотерный “ландшафт” различных тканей хирономиды, в соответствии с изначальным планом заявки. Таким образом была успешно произведена подготовка библиотек для CAGE анализа из общей РНК клеток Pv11 на разных этапах ангидробиоза в трех биологических повторностях. Данные (по 30-45 миллионов прочтений в каждой библиотеке) картированы на геном Pv11 и интегрированы в браузер ZENBU для выделения специфичных для цикла регуляторных элементов, включая энхансерные РНК и промотеры.

К моменту отчета выделено 17 типов (многокопийных, высоко-консервативных, 500-800 п.н.) некодирующих РНК активность которых сопряжена со стадиями ангидробиоза. Предварительный анализ промотерной активности генов в ARIDs участках генома свидетельствует о дифференциальных сайтах инициации транскрипции в зависимости от стадии цикла ангидробиоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ангидробиоз в высших организмах – одно из самых загадочных явлений в современной биологии. Расшифровка геномов ряда беспозвоночных организмов, включая коловраток, нематод и единственный вид насекомых способных к ангидробиозу создала платформу для дальнейшего развития биомиметики. В ближайшее время можно ожидать ряд прорывных открытий в этом направлении – переноса знаний о механизмах устойчивости к полному обезвоживанию в область прикладных био-медицинских задач. В этом плане получение и анализ модельных клеток, способных к индуцируемому ангидробиозу является одним из наиболее перспективных подходов. Знание о регуляторных участках генома, как промоторах так и возможных особых факторах транскрипции, избирательно активирующихся в ангидробиотических организмах на стадиях обезвоживания и обеспечивающих слаженную работу генов-участников формирования молекулярного щита в клетках, являются, без сомнения, первым приоритетом в этой области исследований. Многообещающая экспериментальная модель – клеточная культура с индуцируемым ангидробиозом – является одним из ключевых особенностей реализуемого проекта. На данном этапе проекта были охарактеризованы особенности работы генетического аппарата таких клеток при обезвоживании и создан задел для дальнейшего выделения ключевых регуляторных элементов в геноме для их дальнейшего применения в био-медицинских технологиях направленных на безводное хранение живых клеток и тканей человека.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Meryman, H.T.** Cryopreservation of living cells: principles and practice [Text] / H.T. Meryman. // Transfusion. – 2009. – V. 47. P. 935–945.
2. **Hand, S.C.** LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. [Text] / S.C. Hand, M.A. Menz, M. Toner, L. Boswell, D. Moore. // Annu. Rev. Physiol. 2011. – V. 73. – P. 115–134.
3. **Cornette, R.** The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. [Text] / R. Cornette, T. Kikawada. // IUBMB Life. 2011.- V. 63(6). – P.419– 429.
4. **Watanabe, M.** Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. [Text] / M. Watanabe, T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro, T. Okuda. // J. Exp. Biol. 2002. - V. 205. – P. 2799–2802
5. **Kikawada, T.** Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. [Text] / T. Kikawada, Y. Nakahara, Y. Kanamori, K. Iwata, M. Watanabe, B. McGee, A. Tunnacliffe, T. Okuda. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. - V. 348. – P. 56–61.
6. **Kikawada, T.** Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. [Text] / T. Kikawada, A. Saito, Y. Kanamori, Y. Nakahara, K. Iwata, D. Tanaka, M. Watanabe, T. Okuda. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. - V. 104, – P. 11585–11590
7. **Loi, P.** Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. [Text] / P. Loi, M. Clinton, B. Barboni, J. Jr. Fulka, P. Cappai, R. Feil, R.M. Moor, G. Ptak. // Biol. Reprod. 2002. – V. 67. - P. 126–132.
8. **Kikawada, T.** Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. [Text] / T. Kikawada, A. Saito, Y. Kanamori, M. Fujita, K. Snigorska, M. Watanabe, T. Okuda. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. - V. 1778, – P. 514–520.
9. **Gusev, O.** Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. [Text] / O. Gusev, Y. Nakahara, V. Vanyagina,

- L. Malutina, R. Cornette, T. Sakashita, N. Hamada, T. Kikawada, Y. Kobayashi, T. Okuda. // PLoS One. 2010. - V. 5(11).
10. **Gusev, O.** Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. [Text] / O. Gusev, Y. Suetsugu, R. Cornette, T. Kawashima, M. Logacheva, A. Kondrashov, A. Penin, R. Hatanaka, Sh. Kikuta, S. Shimura, Y. Katayose, T. Matsumoto, E. Shagimardanova, D. Alexeev, V. Govorun, J. Wisecaver, A. Mikheyev, R. Koyanagi, T. Nishiyama, Sh. Shigenobu, T. Shibata, V. Galygina, M. Hasebe, T. Okuda, N. Satoh, T. Kikawada. // Nature Communications. 2014. - V. 5.
 11. **Loi, P.** Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. [Text] / P. Loi, K. Matsukawa, G. Ptak, M. Clinton, J.Jr. Fulka, Y. Nathan, A. Arav. // PLoS ONE. 2008. – V. 3. - P. 2978.
 12. **Zhao X.** Systematic clustering of transcription start site landscapes. [Text] / Zhao X, Valen E, Parker BJ, Sandelin A. // PLoS ONE. 2011. – V. 6. - P. 23409.