

Казанский федеральный университет
Институт фундаментальной медицины и биологии
Лаборатория «Экстремальная биология»
При поддержке Российского научного фонда

СБОРНИК ТЕЗИСОВ
МЕЖДУНАРОДНОГО
СЕМИНАРА

LIFE OF GENOMES 2018

22-24 МАЯ 2018

КФУ, КАЗАНЬ

Казанский федеральный университет
Институт фундаментальной медицины и биологии
Совместная лаборатория КФУ-РИКЕН «Экстремальная биология»
При поддержке Российского научного фонда

СБОРНИК ТЕЗИСОВ
Международного семинара
«*Life of genomes -2018*»

22-24 мая 2018

Казань

Организаторы и спонсоры международного семинара «Life of genomes -2018»



EXTREME
BIOLOGY



Казанский федеральный
УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ
фундаментальной медицины
и биологии



Российский
научный
фонд



MERCK

QVADROS  *Bio*



Agilent

Trusted Answers

Life of Genomes — 2018 – это международный семинар, который традиционно проходит в Казанском федеральном университете с 2014 года.

Организаторы семинара:

Совместная лаборатория КФУ-РИКЕН «Экстремальная биология» Института фундаментальной медицины и биологии КФУ

В программе семинара:

- обзорные лекции ведущих зарубежных и российских ученых о современных исследованиях в области активности генома
- методологические семинары в доступной форме о применении методов геномного и геномного анализа в биологии и медицине
- сессия для молодых ученых, где они получают возможность рассказать о своих научных исследованиях.

Приглашенные лекторы:

- *Игорь Адамейко* (Каролинский институт)
- *Михаил Скоблов* (Медико-генетический научный центр)
- *Чунг-Чау Хон* (РИКЕН)
- *Ханнес Логи* (Хельсинский университет)
- *Петр Харченко* (Гарвардский университет)
- *Игорь Ефимов* (Университет Джорджа Вашингтона)
- *Марина Лизио* (РИКЕН)
- *Такахиро Кикавада* (Национальный институт агробиологических наук)
- *Сунагава Генширо* (РИКЕН)
- *Рейчал Тарлinton* (Ноттингемский университет)
- *Фёдор Колпаков* (Институт вычислительных технологий СО РАН)
- *Такахиро Ямада* (Университет Кейо, Япония)
- *Даниил Попов* (Институт медико-биологических проблем РАН)
- *Сергей Мошковский* (Научно-исследовательский институт биомедицинской химии)
- *Юлия Медведева* (Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, РФ)

Место проведения семинара:

Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, ул. Карла-Маркса, 74.

Дата проведения семинара:

22-24 мая 2018 года

СОДЕРЖАНИЕ

Bokov R.O., Kurochkina N.S., Lysenko E.A., Popov D.V.

TRANSCRIPTION REGULATION OF THE CONTENT OF THE MITOCHONDRIAL ENZYMES AND TRANSCRIPTION REGULATORS IN HUMAN SKELETAL MUSCLE.....7

Borovikov A.O., Sharkov A.A., Akimova I.A., Marakhonov A.V., Skoblov M.U.

NOVEL VARIANTS IN KCTD7 ASSOCIATED WITH PROGRESSIVE MYOCLONUS EPILEPSIES.....8

Gamirova R.R., Gamirova R.G.

INFORMATIVITY OF GENETIC RESEARCH FOR EPILEPSY DIAGNOSTICS.....9

Gazizova G.R., Tyapkina O.V., Kozlova O.S., Deviatiiarov R.M., Vikhlyantsev I.M., Penin A.A., Gusev O.A.

REGULATION OF HIBERNATION: DORMICE FUNCTIONAL GENOME ANNOTATION PROJECT.....11

Makhnovskii P.A., Popov D.V., Shagimardanova E.I., Gusev O.A., Kolpakov F.A., Vinogradova O.L.

REPRESSOR-RELATED REGULATION OF GENE EXPRESSION VIA ALTERNATIVE PROMOTER IN HUMAN SKELETAL MUSCLE.....12

Plotnikova O.M., Skoblov M.Y.

ESTABLISHING HUMAN HIGH-CONFIDENCE MICRORNA BINDING SITES IN AN APPLICATION FOR PATHOGENESIS ANALYSIS OF VARIANTS IN NGS DIAGNOSTIC.....14

Tyurin-Kuzmin P., Kalinina N., Fadeeva J., Sysoeva V.

HETEROLOGOUS SENSITIZATION OF ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTORS IN HUMAN ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS WHICH IS ASSOCIATED WITH THEIR ADIPOGENIC DIFFERENTIATION.....15

Pudova D.S., Shirshikova T.V., Kabanov D.A., Tikhonova A.O., Sharipova M.R., Bogomolnaya L.M.

THE ABC-TYPE MULTIDRUG EFFLUX PUMP MACAB GENES IN THE GENOME OF *SERRATIA MARCESCENS* SM6.....16

Бабынин Э.В., Дубровная С.А.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *FRAGARIA VESCA* L ЗАПОВЕДНИКА «БОЛЬШАЯ КОКШАГА» (РЕСПУБЛИКА

МАРИ ЭЛ).....	18
<i>Вяхирева Ю. В., Бессонова Л. А., Коновалов Ф. А., Скоблов М. Ю.</i>	
НОВЫЙ ПАТОГЕННЫЙ ВАРИАНТ СПЛАЙСИНГА В ГЕНЕ PALB2, ВЫЯВЛЕННЫЙ ПРИ ТРАНСКРИПЦИОННОМ АНАЛИЗЕ.....	19
<i>Иванова А. М., Чечехин В.И., Тюрин – Кузьмин П.А.</i>	
СЕРОТОНИН ВЫЗЫВАЕТ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКУЮ СЕНСИТИЗАЦИЮ АЛЬФА1А-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ.....	20
<i>Кривошеева И., Филатова А., Мошковский С., Скоблов М.</i>	
ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ UNC45A, RHPN2 И ZNFX1 КАК ПОДХОД ДЛЯ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ.....	22
<i>Пудова Д.С., Лутфуллин М.Т., Хадиева Г.Ф, Марданова А.М., Шарипова М.Р.</i>	
ОЦЕНКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММА LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS GM.....	23
<i>Серяпина А.А.</i>	
АНТИСМЫСЛОВОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СИНТЕЗА АТ1А РЕЦЕПТОРОВ: ПРИМЕНЕНИЕ В АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ТЕРАПИИ	
<i>Спарбер П.А., Марахонов А.В., Филатова А.Ю., Шаркова И.В., Скоблов М.Ю.</i>	
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТА САЙТА СПЛАЙСИНГА В ГЕНЕ C19ORF12 ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С НАКОПЛЕНИЕМ ЖЕЛЕЗА 4 ТИПА (NB1A4).....	25
<i>Чечехин В.И., Иванова А.М., Тюрин-Кузьмин П.А., Калинина Н.И., Нимирицкий П.П.</i>	
НОРАДРЕНАЛИН ПЕРЕКЛЮЧАЕТ МЕХЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ НА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП.....	28
<i>Якубова А.Ш., Давидюк Ю.Н., Ризванов А.А., Гиниатуллин Р.Г.</i>	
ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА TRPV1 У ПАЦИЕНТОВ С ЭПИЗОДИЧЕСКОЙ МИГРЕНЬЮ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ.....	30
ИНФОРМАЦИЯ О СПОНСОРАХ МЕЖДУНАРОДНОГО СЕМИНАРА «LIFE OF GENOMES – 2018».....	31

TRANSCRIPTION REGULATION OF THE CONTENT OF THE MITOCHONDRIAL ENZYMES AND TRANSCRIPTION REGULATORS IN HUMAN SKELETAL MUSCLE

Bokov R.¹, Kurochkina N.¹, Lysenko E.^{1,2}, Popov D.^{1,2}

¹*Institute of Biomedical Problems of the RAS;* ²*Lomonosov Moscow State University*

E-mail: bokov@mail.bio.msu.ru

Introduction

When stress factors (physical exercises) are regularly applied to the muscle cell, the adaptive changes in the content of specific proteins occur. We assume that the mechanisms responsible for these changes may differ for proteins with various functions.

The aim of our work is to study at the transcription level the mechanisms regulating the training-induced increase of the mitochondrial enzymes and transcriptional regulators content in the human skeletal muscle. Multiple biopsy sampling from human skeletal muscles provides an unique opportunity to assess changes in proteins content and genes expression before and after acute stress (single exercise), as well as after regularly applied stress (exercise training).

Materials and methods

Ten young untrained males performed the one-legged moderate intensity knee-extension for 1 h. Biopsies from *m. vastus lateralis* were taken prior to, at 1 h, and 4 h after the exercise. This test was repeated after aerobic training on the cycling ergometer (5/week, 8 weeks). The changes in the content of the mitochondrial enzymes and transcriptional regulators after 8-wk training were evaluated by Western blot. To evaluate the changes in gene expression after training and after a single exercise qPCR was used.

Results

After 8-wk training, the content of the mitochondrial enzymes at rest (NDUFB8, SDHB, UQCRC2, MT-CO1, ATP5A1) increased (by 35-162%, $p < 0.05$). There were no changes in the expression of genes encoding these proteins at rest and after single exercise (both before and after 8-wk training). An increase in the content of transcriptional regulators was found after 8-wk training for NR4A3 (100%, $p < 0.05$) and TFAM (20%, $p < 0.05$). At the same time, the expression of the *NR4A3* and *TFAM* genes increased ($p < 0.05$) after single exercise, both before and after 8-wk training. An increase in the expression of genes in response to single exercise was also observed for other

transcriptional regulators (*ESRRG* and *PGC-1 α*), but there were no increase in the content of their proteins after 8-wk training, which may be due to the high proteolytic rate.

Conclusion

In conclusion, 8-wk training-induced increase in the content of the mitochondrial enzymes is not associated with changes in their gene expression at rest and after single exercise. On the contrary, the training-induced increase in the content of some transcriptional regulators is associated with the activation of their mRNA expression after single exercise.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 14-15-00768).

NOVEL VARIANTS IN KCTD7 ASSOCIATED WITH PROGRESSIVE MYOCLONUS EPILEPSIES

Borovikov A.¹, Sharkov A.^{3,4}, Akimova I.¹, Marakhonov A.^{1,2}, Skoblov M.^{1,2}

¹*Research Center for Medical Genetics*; ²*Moscow Institute of Physics and Technology*;

³*Research and Clinical Institute for Pediatrics at the Pirogov Russian National*

Research Medical University; ⁴*Genomed Ltd*

E-mail: borovikov33@gmail.com

Introduction

The progressive myoclonic epilepsies (PME) are the group of clinically and genetically heterogeneous disorders characterized by myoclonus, seizures, and neurological deterioration. PME type 3 is characterized by the autosomal recessive mode of inheritance and is associated with pathogenic variants in the gene encoded potassium channel tetramerization domain-containing protein 7 (KCTD7). The length of this protein is 289 amino acids and it shows a high degree of conservation between different species. Most of known likely pathogenic or pathogenic variants are located in BTB/POZ domain. Here we present 4 cases with 4 novel point mutation in the KCTD7 gene and 2 large deletions in this area.

Materials and methods

Patients were examined by clinical geneticists and epileptologists. We include only patients with validated single nucleotide variants (SNV) revealed by NGS and complete co-segregation analysis as well as a search for the deletions by chromosomal microarray analysis (CMA) in case of Mendelian violation in patient's families. Initial NGS analysis as well as subsequent CMA (if necessary) was performed in Genomed

laboratory, Moscow. Validation and segregation in families was performed by Sanger sequencing.

Results

The age of onset in case of all patients was between 1.5 and 2 y.o. The first symptoms started after episode of febrile fever: sudden falls without loss of consciousness, and with episodes of fading. EEG shows an epileptiform activity. All patients have normal MRI and have no any severe ophthalmic disorder. In case 1, a novel missense variant c.836G>A in homozygous state was found. The proband's parents were found to be healthy carriers of this variant in heterozygous state. In case 2, a previously described missense variant c.190A>G was found in a hemizygous state with a large chromosomal deletion of 121 kb (hg19::chr7:66059567_66181003del), which affects the entire KCTD7 gene locus, on the second allele. The proband's father has SNV in heterozygous state. Mother have a deletion in heterozygous state. In case 3, a novel missense variant c.383A>C was found in a hemizygous state with a large deletion of whole gene of 87 kb in length (hg19::chr7:66069155_66170175del). The patient's father is a healthy heterozygous carrier of the SNV. In case 4, two novel missense variants, c.296G>A and c.353C>T, were identified in a compound heterozygous state. c.296 G>A variant was found to have maternal origin while the second variant, c.353C>T, was found in the father of the proband in heterozygous state.

Conclusion

All patients in our investigation have similar symptoms and disease course. Most of variants affects BTB/Poz domain of KCTD7 protein, except variant from 1st case. The functional consequences of revealed SNV are not obvious due insufficient functional characterization of the KCTD7 protein. Next step of our work will be tested SNV to assess their effect on the function of the gene.

INFORMATIVITY OF GENETIC RESEARCH FOR EPILEPSY

DIAGNOSTICS

Gamirova R.¹, Gamirova R.^{1,2}

¹*Kazan Federal University*; ²*Kazan State Medical Academy*

E-mail: r-gamirov@mail.ru

Introduction

With the development of new molecular genetic methods, genetic studies help to clarify the diagnosis of specific forms and to discover new forms of epilepsy. In 70-80% of cases epilepsy has genetic basis. The increasing availability of molecular genetic

analysis led to its routine implementation. At the same time, the spectrum of genetic research methods is very wide, and it is difficult for the practical doctor to choose the most optimal one. The study of informativity and the creation of an algorithm for diagnostic search in case of suspected hereditary forms of epilepsy is an important task, especially since these studies are a laborious and costly process.

Materials and methods

The research included 14 children with confirmed epilepsy (suspected genetic etiology) who underwent a thorough analysis of complaints, anamnesis, and bloodline. Preliminary stage included the assessment of somatic status, neurologic examination, general clinical and biochemical blood tests, urinalysis, video-EEG-monitoring with sleep deprivation, computer and/or magnetic resonance imaging, electromyography, ultrasound examination of inner organs, tandem mass spectrometry, electrocardiography. Molecular genetic analyzes – chromosomal microarrays (CMAs), targeted DNA sequencing (epileptic panel) by the method of Next Generation Sequencing (NGS) – were conducted in private genetic laboratories.

Results

After a complex examination, the chromosomal nature of epilepsy was suspected in 2 children with mental retardation (various degrees of severity) combined with stigmata of the dysambriogenesis, congenital malformations, specific phenotypic symptoms. Based on the results of CMAs conducted as a starting genetic analysis, the authors revealed Angelman and Prader-Willi syndromes in these children. In 10 patients according to preliminary complex examination the authors assumed the genetic nature of epilepsy and carried out targeted DNA sequencing by the NGS method. Five patients in this group had a family burden of epilepsy. The genetic epileptic panel revealed mutations in genes associated with primary idiopathic genetic epilepsy: the Watanabe-Vigevano syndrome (mutation in the PRRT2 gene: 2 patients), with symptomatic genetic forms: GLUT1 deficiency syndrome (mutation in the SLC2A1 gene: 1 patient), biotinidase deficiency (BTD gene: 1 patient), tuberous sclerosis (TSC2 gene: 2 patients), familial hyperinsulinemic hypoglycaemia (ABCC8 gene: 1 patient), glycine encephalopathy (GLDC gene: 1 patient), Coffin-Siris syndrome (SMARCA4 gene: 1 patient). In two patients from the second group, targeted DNA sequencing did not reveal mutations associated with epilepsy.

Conclusion

1. In the presence of signs of mental retardation, small anomalies, congenital malformations, autism spectrum disorders in children with epilepsy, the most informative starting genetic method is the chromosomal microarrays analysis.
2. In the absence of these signs in patients with epileptic seizures, the most optimal

molecular genetic method is targeted sequencing by the NGS method (epileptic genetic panel).

3. If multigenic nature of epilepsy is suspected, and the results of CMAs and the genetic panel are negative, the choice method may be whole-exome or whole-genomic sequencing.

Acknowledgment

The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) according to the research project №17-29-09096.

REGULATION OF HIBERNATION: DORMICE FUNCTIONAL GENOME ANNOTATION PROJECT

Gazizova G.¹, Tyapkina O.², Kozlova O.¹, Deviatiiarov R.¹, Vikhlyantsev I.³, Penin A.⁴, Gusev O.^{1,5,6,7}

¹*Kazan Federal University, Kazan, Russia;* ²*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, KSC RAS, Kazan, Russia;* ³*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Russia;* ⁴*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;* ⁵*RIKEN Preventive Medicine & Diagnosis Innovation Program, Cluster for Science and Technology Hub, Yokohama, Japan;* ⁶*KFU-RIKEN Translational Genomics Unit, RIKEN Innovation Center, RIKEN, Yokohama, Kanagawa, Japan;* ⁷*Division of Genomic Technologies, Center for Life Science Technologies, RIKEN, Yokohama, Japan*

E-mail: rggazizova@gmail.com

Hibernation is a unique physiological state in some group of mammals allowing them to survive harsh environmental conditions. It is characterized by seasonal heterothermy and ability to enter deep torpor (i.e., reduced metabolic rate and body temperature) interrupted by short periods of rewarming. An important fundamental problem in investigation of this phenomenon is the elucidation of the molecular-genetic mechanisms controlling the alterations in the organism of hibernating animals, particularly, prevention of muscle atrophy during long periods of immobilization. Small arboreal rodent, edible dormouse (*Glis glis*) represents a convenient model for hibernation research, which is characterized by a long period of hibernation (up to 11 months of the year under unfavorable conditions) and a long average life span among other rodents (9 years).

To identify molecular mechanisms regulating hypometabolic shifts and protective musculoskeletal adaptation “Dormice functional genome annotation project” was launched. At the outset, sequencing and assembling genome of edible dormice were

undertaken. To determine transcriptomic profiles in different types of skeletal muscles and spinal cord in hibernating, artificially immobilized and active dormice whole-genome analysis of mRNA expression was conducted. To determine gene transcription start sites (TSS), reveal the basic promoter/enhancer structure and estimate their activity during hibernation cap-analysis of RNA expression (CAGE) was carried out. As a result these data elucidate the key molecular pathways and drivers involved in the regulation of hibernation and protective musculoskeletal adaptation in edible dormice.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00657.

REPRESSOR-RELATED REGULATION OF GENE EXPRESSION VIA ALTERNATIVE PROMOTER IN HUMAN SKELETAL MUSCLE

Makhnovskii P.¹, Popov D.¹, Shagimardanova E.², Gusev O.²,

Kolpakov F.³, Vinogradova O.¹

¹*Institute of Biomedical Problems of the RAS*; ²*Kazan Federal University*; ³*Institute of Computational Technologies of the SB RAS*

E-mail: maxpauel@gmail.com

Introduction

Alternative promoters have the potential to generate the complexity of human gene expressions, in particular, regulate gene expression via different promoters in a stimuli-specific manner. Over 7000 human genes have a putative alternative promoter and first alternative exon(s) (Carninci et al. 2006; Kimura et al. 2006). However, at the basal condition most of them demonstrate very low expression level (Yamashita et al., 2011). We assumed that 1) activation of alternative promoter is related with acute stress and 2) the stress-induced expression via alternative promoter is partially related with deactivation of transcriptional repressor(s). The goal of this work was to investigate the repressor-associated regulation of the *PPARGC1A* gene expression via the canonical and alternative promoters in human skeletal muscle.

Materials and methods

Seven untrained males performed a one-legged knee extension exercise (for 60 min), a model of acute stress. Samples from the *m. vastus lateralis* were taken prior to, 1 h and 4 h after exercise. Postexercise *PPARGC1A* gene expression via the alternative promoter increased by two orders of magnitude ($P < 0.01$) and actually did not change in the canonical promoter. The molecular mechanisms regulating *PPARGC1A*

expression in muscle are conserved; therefore the canonical promoters of human and mouse *PPARGCIA* were aligned, and conserved regulatory motifs were identified by HOCOMOCO. Then, unique to each promoter conserved regulatory motifs and corresponding transcription factors were chosen. Finally, RNA-seq (HiSeq 2500, Illumina) and geneXplain platform were used for identification of exercise-related transcriptional regulators.

Results

We identified several unique motifs associated with transcriptional activators and repressors in the alternative and canonical promoters of the *PPARGCIA* gene. Unique motifs associated with transcription repressors were found in the alternative promoter region only (Zinc finger protein SNAI1 and Hypermethylated in cancer 1 protein HIC1). GeneXplain revealed that after exercise SNAI1-associated motif was enriched in promoters of up-regulated genes.

Conclusion

The computational approach showed that acute stress-related activation of the alternative promoter of the *PPARGCIA* gene associates with the repressor SNAI1. Therefore repressor-associated regulation may play an important role in regulation of expression via the alternative promoter(s).

Literature

1. Carninci P., Sandelin A., Lenhard B., Katayama S., Shimokawa K., Ponjavic J., et al. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* 38:626–635.
2. Kimura K., Wakamatsu A., Suzuki Y., Ota T., Nishikawa T., Yamashita R., et al. 2006. Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 16:55–65.
3. Yamashita R, Sathira NP, Kanai A, Tanimoto K, Arauchi T, Tanaka Y et al. 2011. Genome-wide characterization of transcriptional start sites in humans by integrative transcriptome analysis. *Genome Res.* 21(5):775-89.

This work was supported by the RFBR grant (17-00-00242).

ESTABLISHING HUMAN HIGH-CONFIDENCE MICRORNA BINDING SITES IN AN APPLICATION FOR PATHOGENESIS ANALYSIS OF VARIANTS IN NGS DIAGNOSTIC

Plotnikova O.¹, Skoblov M.^{1,2}

¹*Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia;* ²*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

E-mail: plotnikova@phystech.edu

Introduction

MicroRNAs, which are short noncoding RNAs, play an important role in the regulation of gene expression through the inhibition of translation or degradation of the binding mRNA. While it is known more than 2500 human microRNAs, the understanding of the comprehensive microRNA-mRNA interactome is still incomplete.

It was shown that using prediction programs for representing microRNA-mRNA interactions had a small intersection of the results and are poorly consistent with known experimental data [1]. Therefore, applying experimentally obtained data of the microRNA binding regions should be the most promising approach in order to identify new molecular mechanisms for the etiopathogenesis of hereditary diseases.

Materials and methods

We collected results of 79 AGO2-CLIP-seq data from 9 different cell lines and also took data from two modified CLIP-seq studies (CLASH, CLEAR-CLIP) [2,3] that straightforwardly detect microRNA-mRNA interactions as chimeric reads. Expression levels for mRNAs and microRNAs were retrieved from FANTOM5 and GEO.

Results

We revealed 46,8 thousand of high confidence microRNA binding regions that were established in at least two different experiments. These regions are located in 15 thousand genes and cover interactions of 465 known microRNAs. 99% of the high confidence microRNA binding regions were smaller than 150nt, but some regions arranged into groups with a high density of supported experiments. The analysis of high-confidence microRNA binding sites revealed tissue-specific interactions for two predominate cells: HEK293 and Huh7.5. On the other hand, we obtained a group of “house-keeping” microRNA binding regions that were identified in predominant cells. Our comprehensive analysis of both expression level of microRNAs and mRNAs and their number of interactions allowed us to estimate the significance of miRNA-mRNA interactions and revealed groups with different activity. We revealed two interesting

group of microRNAs: specific that interacted with a few microRNAs while they have a high expression level and pretend to be a high-specific gene expression regulator and promiscuous microRNAs that have opposite characteristics. A half of the top of specific microRNAs is the same in the two cells.

Conclusion

The identified high-confidence microRNA binding regions have been organized as a tool for investigation variants in NGS diagnostic (VCF files). It is available online on <http://score.generesearch.ru/services/mirna/>. Hence, it will be a valuable resource that should provide additional insights into the identification new molecular mechanisms of hereditary diseases caused by breaking in the microRNA-mRNA interactions.

Literature

1. Plotnikova O., Skoblov M. (2018) Efficiency of the miRNA - mRNA interaction prediction programs. *Molecular Biology*. 52(2) (in press)
2. Helwak A. et al. (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*. 153(3):654-665
3. Moore M. J. et al. (2015) miRNA–target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nature communications*. 6:8864

HETEROLOGOUS SENSITIZATION OF ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTORS IN HUMAN ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS WHICH IS ASSOCIATED WITH THEIR ADIPOGENIC DIFFERENTIATION

Tyurin-Kuzmin P.¹, Kalinina N.¹, Fadeeva J.¹, Sysoeva V.¹

¹*Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine,*

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: tyurinkuzmin.p@gmail.com

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are identified in the stromal-vascular compartment within the most of adult tissues including bone marrow, adipose tissue and skeletal muscles. MSC mediate physiological renewal of connective tissues by differentiation into multiple (cell lineages) directions such as fat, bone and cartilage. Another important function of MSC, including adipose-derived MSCs, is paracrine regulation of tissue homeostasis, reparation and regeneration. MSC functions are under tight hormonal control, and noradrenaline is one of their most important regulators. The aim of this study was to define how sensitivity to noradrenaline of adipose derived MSC

is regulated and is linked to differentiation properties of these cells. At first, we examined the mechanisms of regulation of MSC sensitivity to noradrenaline. Using flow cytometry and calcium imaging in single cells, we demonstrated that more than 80% of MSC expressed alpha1-adrenoceptors at their surface. However only $6.9\pm 0.8\%$ of MSC responded to noradrenaline by intracellular calcium release, therefore in most cells, alpha1-adrenoceptors were not coupled with Ca^{2+} -dependent signaling. We showed that noradrenaline itself regulated MSC sensitivity to that hormone by inducing the down-regulation of beta-adrenoceptors and heterologic sensitization of alpha1A-adrenoceptors. Intracellular signaling pathways triggered by noradrenaline in MSC were switched from cAMP-mediated to Ca^{2+} -mediated ones. To evaluate how MSC responsiveness to noradrenaline is associated with differentiation properties of these cells we used live single cell imaging. First, we detected MSC responding to noradrenaline by calcium release. Then we induced adipogenic differentiation of these cells and used live single cell imaging to track the fate of noradrenaline responding cells. We showed that although the most of MSC were differentiated into adipocytes, the cells responding to noradrenaline by calcium release never did. Thus, noradrenaline itself regulated responsiveness of individual cells to that hormone and calcium response to noradrenaline was linked to adipogenic potential of individual cells. This work was supported by RSF grant 14-15-00439 and Russian President grant MK-3167.2017.7.

THE ABC-TYPE MULTIDRUG EFFLUX PUMP *MACAB* GENES IN THE GENOME OF *SERRATIA MARCESCENS* SM6

Pudova D.¹, Shirshikova T.¹, Kabanov D.¹, Tikhonova A.¹, Sharipova M.¹,
Bogomolnaya L.^{1,2}

¹*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia;* ²*Texas A&M University Health Science Center, Microbial Pathogenesis and Immunology USA*

E-mail: tatyana-shirshikova@yandex.ru

Introduction

The emergence of bacterial multi-drug resistance is a growing problem of public health worldwide. Bacterial drug efflux systems are membrane protein complexes that function to expulse drugs from the cell. They play a crucial role in the rising rates of antibiotic therapy failures. Bacterial drug efflux pumps are usually chromosomally encoded. Multiple efflux pumps could be present in the genome simultaneously. Moreover, many of them are involved in efflux of similar antibiotics.

Bioinformatics analysis of *Serratia marcescens* Db11 genome showed a high homology of several gene clusters to MacAB macrolide-specific efflux system genes of *E. coli* K-12 [Mardanov *et al.*, 2014]. The aim of this study was to identify *macAB*-like genes in the genome of laboratory strain *Serratia marcescens* SM6.

Materials and methods

Analysis of *macAB*-like genes was done in RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>).

Results

Analysis of *S. marcescens* SM6 genome showed three independent gene clusters encoding for MacAB-like efflux pumps. Furthermore, *macAB*-like genes in genome locus SM6_1728-1729 share approximately 70% of homology to similar genes in *E. coli* and *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67 and have a surrounding similar to that in those bacteria. Two more *macAB*-like genes of *S. marcescens* SM6 genome (SM6_875-876 and SM6_1583-1584) are absent from *E. coli* and *Salmonellae* genomes but found in other genomes of *Serratia sp.*

Despite similar gene cluster organization in a number of gram-negative bacteria, MacAB-like efflux pumps might have different substrate specificity. *E. coli* MacA-MacB-TolC efflux pump participates in a macrolide excretion and enterotoxin II release [Xu *et al.*, 2009]. MacAB efflux pump *E. coli* and *Salmonella typhimurium* is involved in iron homeostasis through facilitating of the protoporphyrin IX release [Turlin *et al.*, 2014]. *S. enterica* serovar Typhimurium MacAB efflux pump protects bacteria against the reactive oxygen species (ROS)-mediated killing [Bogomolnaya *et al.*, 2013]. However, functions of MacAB-like efflux pumps of *S. marcescens* are currently unknown.

Conclusion

Thus, bacterial efflux pumps play a significant role in natural physiology and in the protection of bacteria against antibiotics. However, our understanding of the impact of individual efflux pumps in these processes and the principles of their regulation is very limited. This information, nevertheless, is crucial for the development of an effective strategy for fighting multi-drug resistant infection.

Acknowledgment

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research project 18-34-00458 and performed in accordance with the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Literature

1. Mardanov A. *et al.* (2014) Efflux systems in *Serratia marcescens*. *Microbiology*.82(6):668-679.
2. Xu Y. *et al.* (2009) Crystal structure of the periplasmic region of MacB, a noncanonic

- ABC transporter. *Biochemistry*. 48(23):5218-25. doi: 10.1021/bi900415t.
3. Turlin E. *et al.* (2014) Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*. 3(6):849-59. doi: 10.1002/mbo3.203.
4. Bogomolnaya L.M. *et al.* (2013) The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar typhimurium from oxidative stress. 4(6):e00630-13. doi: 10.1128/mBio.00630-13.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *FRAGARIA VESCA* L ЗАПОВЕДНИКА «БОЛЬШАЯ КОКШАГА» (РЕСПУБЛИКА МАРИ ЭЛ)

Бабынин Э.¹, Дубровная С.¹

¹*Институт фундаментальной медицины (ИФМиБ)*

Казанского (Приволжского) Федерального университета

E-mail: edward.b67@mail.ru

Введение

Нарушение оборота поколения является одним из факторов критического состояния популяции, выпадению ее из растительного сообщества. В значительной степени это может быть связано с затруднениями процесса образования семян, в результате чего популяции лесных видов могут длительное время поддерживать численность за счет вегетативного размножения. Проведенные ранее исследования показали, что в ценопопуляциях земляники лесной (*Fragaria vesca* L.) на деструктивных участках возрастает интенсивность вегетативного расселения, что может вызывать снижение генетического полиморфизма [1]. Целью данного исследования явилось выявление генетического разнообразия природных ценопопуляций земляники лесной в условиях нарушенных местообитаний и климаксовых сообществ.

Материалы и методы

Сбор материала проводили в Республике Мари Эл на территории Государственного природного заповедника «Большая Кокшага» в 2017 г. Во всех местообитаниях через каждые 10 м. отбирались растения виргинильного онтогенетического состояния. Анализ генетического полиморфизма проводили методом случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ).

Результаты

Подбор RAPD праймеров, выявляющих внутривидовой полиморфизм генома

Fragaria vesca L, проводился с использованием 12 стандартных 10-нуклеотидных праймеров серии ОРА, ОРР, ОРВ (Operon Technologies, USA), ранее отобранных как эффективно выявляющие геномный полиморфизм представителей *Fragaria*. Часть праймеров не позволили идентифицировать генотипы всех образцов. Лишь 5 праймеров были способны выявить внутривидовой полиморфизм генома у анализируемых *Fragaria vesca* L. Подобранные праймеры ОРР11, ОРВ08, ОРА20, ОРА17, ОРА15, были использованы для оценки геномного полиморфизма отобранных образцов.

Заключение

Значения сходства, полученные в анализах матриц подобия RAPD-маркеров, подтвердили, что существует различие между генетическим полиморфизмом среди популяций с разной интенсивностью полового процесса и вегетативного расселения.

Литература

1. Дубровная С. А. Жизненный цикл и регенерационные ниши травянистых растений в лесных сообществах // Сибирский лесной журнал. 2016. № 3. С. 24-33.

НОВЫЙ ПАТОГЕННЫЙ ВАРИАНТ СПЛАЙСИНГА В ГЕНЕ PALB2, ВЫЯВЛЕННЫЙ ПРИ ТРАНСКРИПЦИОННОМ АНАЛИЗЕ

Вяхирева Ю.¹, Бессонова Л.¹, Коновалов Ф.², Скоблов М.^{1,3}

¹ФГБНУ «МГНЦ», Москва; ²ООО «Геномед», Москва; ³Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва

E-mail: yuliya-vyakhireva@yandex.ru

Мы представляем клинический случай анемии Фанкони, осложнившейся медуллобластомой. Для поиска причины заболевания пробанду было проведено полноэкзомное секвенирование. Был обнаружен нуклеотидный вариант в гетерозиготном состоянии: chr16: 23649206GACAA>G (ген *PALB2*, с.172_175del). Вариант *PALB2* с.172_175del, ранее описанный как патогенный, был обнаружен у матери. MLPA-анализ для поиска делеций или дупликаций гена *PALB2* не выявил изменений числа копий экзонов. Из-за смерти ребенка дальнейшие исследования проводились отцу. Проведенные полноэкзомное секвенирование и MLPA-анализ гена *PALB2* не выявили патогенных нуклеотидных вариантов. Полученные результаты говорят в пользу наличия в геноме отца либо синонимичных вариантов, фильтруемых при анализе данных секвенирования,

либо интронных, которые не покрываются при секвенировании экзона.

Для поиска вариантов нами был проведен транскрипционный анализ структуры мРНК гена *PALB2* в крови отца с помощью ОТ-ПЦР. В ходе анализа была обнаружена изоформа с пропуском 11 экзона, отсутствовавшая в контрольном образце. При секвенировании 11 экзона и прилегающих к нему районов была обнаружена делеция 6 нуклеотидов (chr16:23625423_23625429del) в интроне 10, затрагивающая консенсусный сайт сплайсинга. Для верификации патогенности обнаруженного варианта был проведен анализ сплайсинга в системе *in vitro*, подтвердивший патогенный эффект. Биоинформатический анализ показал, что отсутствие 11 экзона приводит к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного на 142 аминокислоты белка (p.(Asn1039Glyfs*7)). Это укорочение изменяет структуру WD40-повторов на С-конце белка. По литературным данным укорочение домена WD-40 приводит к нефункциональному белку.

Таким образом, нами был найден новый интронный нуклеотидный вариант в гене *PALB2* p.(Asn1039Glyfs*7), приводящий к нарушению сплайсинга, что проявляется пропуском экзона со сдвигом рамки считывания, что изменяет нормальную функцию белка. При наличии другого патогенного варианта в компаунд-гетерозиготном состоянии развивается клиническая картина анемии Фанкони.

СЕРОТОНИН ВЫЗЫВАЕТ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКУЮ СЕНСИТИЗАЦИЮ АЛЬФА1А-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Иванова А.¹, Чечехин В.¹, Тюрин – Кузьмин А.¹

¹*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова*

E-mail: ivanovanastasia14@gmail.com

Введение

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль в процессах репарации, регенерации и поддержании их гомеостаза. МСК способны дифференцироваться в клетки соединительной ткани, такие как остеобласты, хондробласты и адипоциты. МСК также обладают секреторной функцией. МСК секретируют паракринные факторы, регулируя процессы репарации и регенерации тканей. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и нейромедиаторами, а одним из

ключевых регуляторов функций МСК является норадреналин. Ранее мы показали, что в МСК экспрессируются все основные изоформы адренорецепторов, но большинство из них не сопряжены с кальций-зависимой системой внутриклеточной сигнализации. Это сопряжение регулируется при участии бета-адренорецепторов. При стимуляции сигнального пути бета-адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ через 6 часов происходит транзиторное повышение уровня экспрессии альфа1А-адренорецепторов и, как следствие, повышение чувствительности МСК к этому гормону. В данной работе мы изучали, способны ли другие стимулирующие аденилатциклазу нейромедиаторы, кроме норадреналина, изменять чувствительность МСК к катехоламинам.

Материалы и методы

Мезенхимные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека; ПЦР; Вестерн-блоттинг; Преинкубация МСК за 6 часов до эксперимента в течение часа с различными нейромедиаторами, затем 5 часов в среде, за час до эксперимента обработка красителем Fluor8, чувствительному к кальцию. Во время эксперимента повторная стимуляция МСК норадреналином и регистрация кольцевого ответа.

Результаты

Путем анализа сигнальных путей, активируемых основными нейромедиаторами, мы выбрали следующие нейромедиаторы, рецепторы которых могут активировать аденилатциклазу: дофамин (DRD1, DRD5), гистамин (HRH2), серотонин (HTR4, HTR6, HTR7), аденозин (A2b, A2a). Методом ПЦР мы установили, что в МСК экспрессируются мРНК рецепторов A2a, A2b, DRD1, DRD5, HRH2, HTR6, HTR7. Для проверки влияния выбранных нейромедиаторов на функциональную активность МСК мы стимулировали ими клетки и через 6 часов анализировали их чувствительность к норадреналину. Мы установили, что серотонин, так же как и норадреналин, повышает число клеток, отвечающих на норадреналин кальций-зависимым путем. Гистамин, дофамин и аденозин - не изменяют. Для выяснения механизма обнаруженного феномена мы проверили, изменяется ли уровень белка альфа1А-адренорецепторов после стимуляции клеток серотонином. Путем вестерн-блоттинга мы установили, что через 6 часов после преинкубации с серотонином в МСК повышается уровень экспрессии альфа1А-адренорецепторов. Кроме того, мы выяснили сигнальные механизмы гетерологической сенситизации альфа1А-адренорецепторов под действием серотонина и норадреналина. Мы показали с помощью ингибиторного анализа и иммуноферментного анализа, что серотонин и норадреналин активируют аденилатциклазу, синтез цАМФ и протеинкиназу А. Нейромедиаторы, не

вызывающие гетерологической сенситизации, ингибируют аденилатциклазу, несмотря на то, что имеют изоформы рецепторов, сопряженные с Gs-белком.

Заключение

Мы обнаружили, что при стимуляции серотонином сигнального пути HTR/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ/протеинкиназа А происходит повышение уровня экспрессии альфа1а-адренорецепторов, что ведет к повышению чувствительности МСК к норадреналину. Таким образом, сопряжение адренергических рецепторов с кальциевой сигнализацией в мезенхимных стромальных клетках специфически регулируется нейромедиаторами норадреналином и серотонином.

Благодарности

Работа проводилась при поддержке Грантов Президента России МК-3167.2017.7 и РФФ 14-15-00439.

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ UNC45A, RHPN2 И ZNFX1 КАК ПОДХОД ДЛЯ ТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

Кривошеева И.¹, Филатова А.¹, Мошковский С.², Скоблов М.¹

¹ФБНГУ «МГНЦ», ²ФГБНУ «ИБМХ»

E-mail: kri5ira@yandex.ru

Как и любые другие раковые клетки, клетки меланомы человека имеют множество мутаций, которые влияют на их пролиферацию, дифференциацию, движение и другие жизненно важные процессы. Однако в 2015 г. в геноме меланомных клеток нашими коллегами (Pyatnitskiy *et al.*, 2015) был проведён поиск генов, которые не подвержены значимым мутациям. Биоинформатический анализ позволил выявить 91 такой «гипомутированный» ген. Мы предположили, что эти гены необходимы клеткам для выживания и деления, и, следовательно, являются зонами уязвимости для них. Клетки, имеющие мутации в таких генах, быстро погибают, поэтому эти гены могут быть подходящими мишенями для терапии меланомы.

После анализа литературы и экспрессионного анализа гипомутированных генов в клетках меланомных линий человека были выбраны три наиболее перспективных гена-кандидата: UNC45A, RHPN2 и ZNFX1.

Далее мы изучили влияние подавления экспрессии этих генов на пролиферацию и жизнеспособность клеток меланомы человека, а также на активность каспаз в них. Результаты этих исследований показали, что хотя каспазная активность в

клетках, обработанных siRNA к выбранным генам, повышается, скорость пролиферации и жизнеспособность клеток изменяются статистически незначимо. Это может означать наличие компенсирующих или дублирующих систем в клетке, взаимосвязь выбранных генов с иммунной системой организма человека, более продолжительное время жизни продуктов выбранных генов, и др.

Дальнейшая работа будет направлена на измерение скорости миграции клеток при подавлении экспрессии выбранных генов и на расширение списка исследуемых генов.

Литература

1. Pyatnitskiy M, Karpov D, Poverennaya E, Lisitsa A, Moshkovskii S. Bringing Down Cancer Aircraft: Searching for Essential Hypomutated Proteins in Skin Melanoma. Chammas R, ed. PLoS ONE. 2015;10(11):e0142819. doi: 10.1371/journal.pone.0142819.

ОЦЕНКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММА

LYSINIBACILLUS FUSIFORMIS GM

Пудова Д.¹, Лутфуллин М.¹, Хадиева Г.¹, Марданова А.¹, Шарипова М.¹

Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: dasha171711@gmail.com

Введение

Активное использование антибиотиков в птицеводстве вызывает обоснованную озабоченность в связи с широким распространением резистентных форм патогенных микроорганизмов, устойчивых к действию современных препаратов. Именно поэтому в настоящее время ведется поиск наиболее эффективных средств для конкурентного замещения патогенов представителями здоровой микробиоты. Среди большого разнообразия пробиотических препаратов особую популярность набирают пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus*. Такие препараты более стабильны, благодаря способности данных микроорганизмов образовывать эндоспоры. Нами был выделен штамм бактерий GM, который по морфологическим и физиологическим свойствам идентифицирован как представитель рода *Lysinibacillus*. Согласно литературе бактерии рода, *Lysinibacillus* широко представлены в кишечнике многих животных и птиц, в некоторых случаях даже превышая долю представителей рода *Bacillus*. Известно, что некоторые виды лизинебацилл (*L. fusiformis*) способны секретировать соединения с антимикробными и противогрибковыми свойствами, что имеет большое практическое значение для

промышленности и сельского хозяйства. В настоящей работе мы представляем морфологические и физиологические свойства штамма GM, сборку и аннотацию его генома, а также анализ возможности использования изолированного штамма в качестве пробиотика.

Материалы и методы

Морфологическая и физиологическая характеристика штамма включала световую и сканирующую электронную микроскопию, а также определение оптимальных параметров роста микроорганизма. Активность протеолитических и целлюлозолитических ферментов тестировали по деградации казеина и карбоксиметилцеллюлозы, соответственно. Устойчивость к антибиотикам тестировали стандартным диско-диффузионным методом. Филогенетическое положение штамма определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, анализа 16S рРНК в программе MEGA_v7.0.14 и вычисления значений ANI и GGDC с использованием веб-серверов JSpecies_v1.2.1 и GGDC_v2.1. Полногеномное секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq, качество секвенирования проверяли в программе FastQC_v0.11.3. *De novo* сборку и анализ контигов осуществляли с использованием ассемблера SPAdes_v3.8.1. Статистику сборки рассчитывали в программе QUAST_v2.3. Для аннотации и анализа генома использовали автоматический аннотатор NCBI PGAAP, систему IMG_v4.570, базу данных BAGEL3, а также веб-сервер RAST.

Результаты

Морфологический и физиологический анализы установили, что изолированный штамм принадлежит к филе *Firmicutes*, классу *Bacilli*. У штамма отсутствуют амилазная, пектиназная активности, но присутствуют протеазная и целлюлазная активности. Обнаружена устойчивость изолята к гентамицину, левомицетину, эритромицину, канамицину. Анализ масс-спектрометрии позволил идентифицировать выделенный штамм как представителя рода *Lysinibacillus*. Филогенетический анализ 16S рРНК и анализ ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (97% ANI и 77% GGDC со штаммами *L. fusiformis*) показали, что штамм относится к виду *L. fusiformis*. Геном длиной 4,678,122 п.н. состоит из 42 контигов (>200 п.о.), объединенных в 17 скаффолдов. Значение $N_{50} = 2,538,659$ п.о., GC-состав = 37.43%. Сборка генома депонирована в базу данных NCBI под номером NTMQ00000000. Аннотирование генома выявило наличие генов целлюлазы (pfam00150), протеазы (pfam00082), белков адгезии (pfam05833, pfam00395), стресс-ответа (pfam00512; pfam00012; pfam00226; pfam00582) и предполагаемых генов, ответственных за биосинтез антимикробных метаболитов (pfam04737; pfam14028).

Заключение

Для оценки пробиотического потенциала штамма *L. fusiformis* GM выполнено секвенирование, сборка и аннотация генома. Идентифицированы гены гидролитических ферментов, таких как целлюлаза и протеаза. Кроме того, обнаружены гены, ответственные за синтез антимикробных метаболитов, белков адгезии и стресс-ответа. Полученные теоретические и экспериментальные данные позволяют рассматривать штамм *L. fusiformis* GM как потенциальный пробиотик для сельскохозяйственных птиц и животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ [проект №. 16-16-04062].

АНТИСМЫСЛОВОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СИНТЕЗА AT1A РЕЦЕПТОРОВ: ПРИМЕНЕНИЕ В АНТИГИПЕРТЕНЗИВНОЙ ТЕРАПИИ

Серяпина А.А.¹

¹*Новосибирский государственный университет*

E-mail: seryapina@bionet.nsc.ru

Введение

Артериальная гипертензия является одной из самых распространённых патологий сердечно-сосудистой системы, сопровождается значительными осложнениями и заметно ухудшает качество жизни. Антигипертензивное лечение в настоящее время осуществляется с использованием различных ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы, блокаторов адренорецепторов в сочетании с диуретиками; однако, все распространённые препараты имеют ряд серьёзных побочных эффектов. Таким образом, вопрос разработки эффективной и безопасной терапии гипертонической болезни остаётся актуальным.

Важную роль в разработке новых подходов к антигипертензивной терапии играет контроль уровня экспрессии генов ключевых систем регуляции АД, участвующих в патогенезе гипертонической болезни. В качестве одного из таких методов рассматривается применение коротких антисмысловых последовательностей (олигодезоксинуклеотидов), направленных на подавление транскрипционной активности определённых генов: антисмысловая последовательность ДНК за счет комплементарного взаимодействия может связываться со специфической мРНК, ответственной за экспрессию соответствующего гена, и таким образом ингибировать синтез белка.

Цель данного исследования – изучить влияние внутрибрюшинного введения антисмысловой последовательности к гену, кодирующему синтез рецепторов

ангиотензина-II первого типа (AT1A), участвующих в регуляции артериального давления и в патогенезе гипертонической болезни.

Материалы и методы

Объектом исследования были 5-месячные самцы крыс линии НИСАГ с наследственной стресс-индуцированной артериальной гипертензией. Артериальное давление крыс измеряли непрямым методом на хвосте (tail-cuff method), используя аппаратуру фирмы BioPac (США). АД измеряли несколько раз в течение недели до начала эксперимента, затем на следующий день и в последующие дни после инъекции препарата (до 2-3 недель). Крысы были разделены на две группы по 5 животных в каждой.

Препарат на основе антисмысловой олигонуклеотидной последовательности к гену рецептора AT1A представлял собой нанокompозит из оксида титана (TiO₂) или оксида кремния (SiO₂), полилизина (PL) и собственно олигодезоксинуклеотида (ODN). В качестве контрольного препарата использовали аналогичный нанокompозит, несущий случайную олигонуклеотидную последовательность.

Нанокompозиты, несущие ODN-I, адресованные мРНК гена *AT1A*, и контрольные ODN-I-R, вводили крысам внутрибрюшинно, т.к. главной мишенью являются целевые рецепторы AT1A почки. Содержание мРНК гена *AT1A* и плотность соответствующих рецепторов измеряли в ткани почки. Для измерения количества AT1A рецепторов в ткани почки использовали иммуноферментный анализ и наборы реактивов ELISA.

Результаты

Внутрибрюшинное однократное введение крысам линии НИСАГ нанокompозита TiO₂~PL-ODN-I с антисмысловой последовательностью к гену рецептора AT1A привело к плавному снижению АД (максимальный уровень снижения ~30 мм рт. ст.), которое сохраняется на протяжении двух недель. При внутрибрюшинном однократном введении нанокompозита SiO₂~PL-ODN-I с тем же олигодезоксинуклеотидом наблюдалось понижение АД на ~27 мм рт. ст.. Аналогичное введение крысам нанокompозитов TiO₂~PL-ODN-I-R или SiO₂~PL-ODN-I-R, несущих олигодезоксинуклеотиды со случайными последовательностями, не приводило к понижению артериального давления.

Заключение

В настоящей работе показана эффективность внутрибрюшинного введения антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей к мРНК гена *AT1A* рецептора ангиотензина-II в коррекции уровня АД у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Кроме того, олигодезоксинуклеотиды, введенные в организм животного

в составе предложенных нанокмполитов, приводят к более длительному понижению АД по сравнению с традиционными фармакологическими препаратами.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда №16-15-10073.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВАРИАНТА САЙТА СПЛАЙСИНГА В ГЕНЕ C19ORF12 ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ С НАКОПЛЕНИЕМ ЖЕЛЕЗА 4 ТИПА (NBIA4)

Спарбер П.¹, Марахонов А.^{1,2}, Филатова А.¹, Шаркова И.¹, Скоблов М.^{1,2,3}

¹Медико-генетический научный центр, Москва; ²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва;

³Московский физико-технический институт, Московская область,

Долгопрудный

E-mail: psparber93@gmail.com

Введение

NBIA4 это аутосомно-рецессивное наследственное заболевание причиной которого являются гомозиготные или компаунд-гетерозиготные патогенные варианты в гене c19orf12 и характеризующееся нарушением походки, Паркинсонизмом, поведенческими и психиатрическими симптомами, атрофией зрительных нервов. Нами описан клинический случай 11-летнего пациента с признаками нейродегенерации и типичной МРТ картиной, характерной для накопления железа.

Материалы и методы

Полноэкзомное секвенирование было проведено в лаборатории «геномед», Москва. Выявленные варианты нуклеотидной последовательности были верифицированы секвенированием по Сенгеру. ДНК была выделена из периферической крови с помощью фенол-хлороформной экстракции. Клетки НЕК293Т были трансфицированы плазмидным миниген вектором, содержащим исследуемый вариант сайта сплайсинга. Анализ изменения сплайсинга был проведен с помощью ОТ-ПЦР анализа с последующим секвенированием по Сенгеру.

Результаты

Полноэкзомное секвенирование выявило два варианта в гене C19orf12, частую, ранее описанную патогенную делецию с.204_214del11 [1] и ранее неописанный вариант сайта сплайсинга с.193+5G>A во втором интроне. Функциональный анализ в клетках HEK293T, трансфицированных плазмидным миниген вектором показал, что вариант с.193+5G>A приводит к пропуску второго экзона. Вариант с.193+5G>A разрушает донорный сайт сплайсинга второго интрона, что приводит к пропуску второго экзона гена C19orf12. Отсутствие второго экзона сбивает открытую рамку считывания, в результате чего образуется преждевременный стоп-кодон. Наличие преждевременного стоп-кодона приводит к укорочению белка более чем на 75% в результате чего в нем отсутствуют все функционально значимые домены и его функция утрачивается.

Заключение

Таким образом вариант с.193+5G является патогенным и причиной заболевания у нашего пациента. Это первый описанный патогенный вариант сайта сплайсинга при NBIA4.

Литература

1. Hartig M. B. et al. Absence of an orphan mitochondrial protein, c19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation //The American Journal of Human Genetics. – 2011. – Т. 89. – №. 4. – С. 543-550.

НОРАДРЕНАЛИН ПЕРЕКЛЮЧАЕТ МЕХЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ НА ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП

Чечехин В.¹, Иванова А.¹, Тюрин-Кузьмин П.¹, Калинина Н.¹, Нибирицкий П.¹

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

E-mail: v-chech@mail.ru

Введение

Воспаление – патологический процесс, развивающийся в ответ на местное действие патогенного фактора, направленный на уничтожение агента и регенерацию ткани. Важными участниками воспаления и регенерации являются мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые входят в состав большинства тканей организма. МСК способны дифференцироваться в несколько типов клеток, принимая участие в репарации и регенерации повреждения. Второй важной функцией МСК регуляции воспаления. МСК влияют на активность клеток иммунной системы путем секреции цитокинов, оказывая противовоспалительное действие. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и

нейромедиаторами. Одним из ключевых регуляторов этих клеток является норадреналин, который влияет на секреторную активность и дифференцировку МСК. Ранее мы показали уникальный феномен переключения внутриклеточной сигнализации, активируемой адренорецепторами: норадреналин, стимулируя бета-адренорецепторы в МСК, вызывает гетерологическую сенситизацию альфа1А-адренорецепторов. При стимуляции МСК норадреналином активируется преимущественно сигнальный путь бета-адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ, что соответствует литературным данным. Помимо непосредственных клеточных ответов это приводит также к транзиторному повышению уровня экспрессии альфа1А-адренергических рецепторов и их сопряжению с кальций-зависимыми путями передачи внутриклеточного сигнала. В результате, через 6 часов после первичной стимуляции МСК норадреналином наблюдается повышение чувствительности клеток к этому гормону и перевод клеток с цАМФ-зависимых на кальций-зависимые клеточные ответы. В данной работе мы изучали влияние норадреналина на секреторную активность МСК, связанную с регуляцией воспаления.

Материалы и методы

Линейные мезенхимные стромальные клетки; методика NanoString, PanCancer Immune Profiling Panel; прибор BioRad BioPlex.

Результаты

С помощью методики NanoString мы проанализировали, как изменяется профиль экспрессии более чем 700 цитокинов и других белков, ассоциированных с регуляцией иммунных клеток. Используя PanCancer Immune Profiling Panel, мы показали, что при стимуляции МСК норадреналином происходит увеличение уровня экспрессии РНК целого ряда провоспалительных цитокинов, их рецепторов и участников сигнальных каскадов, активируемых этими рецепторами, и снижение уровня экспрессии противовоспалительных молекул. Изменение уровня экспрессии 17 провоспалительных цитокинов было дополнительно проверено на уровне белка при помощи прибора BioRad BioPlex. Мы показали, что при действии норадреналина повышается секреция провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, G-CSF, IFN-G и MCP-1. При повторном воздействии норадреналина, когда стимулируются, преимущественно, альфа1А-адренорецепторы, существенного изменения экспрессии цитокинов по сравнению с однократной стимуляцией клеток не происходило. Это может свидетельствовать о том, что провоспалительный фенотип МСК приобретают вследствие активации бета-, а не альфа1-адренорецепторов.

Заключение

Таким образом, мы установили, что воздействие норадреналина на МСК приводит к повышению секреции провоспалительных цитокинов, в то же время клетки сами становятся более восприимчивы к действию этих молекул. МСК переключаются с противовоспалительного на провоспалительный фенотип.

Благодарности

Работа проводилась при поддержке Грантов Президента России МК-3167.2017.7 и РНФ 14-15-00439.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА TRPV1 У ПАЦИЕНТОВ С ЭПИЗОДИЧЕСКОЙ МИГРЕНЬЮ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Якубова А.¹, Давидюк Ю.¹, Ризванов А.¹, Гиниатуллин Р.^{1,2}

¹ Казанский федеральный университет; ² Университет Восточной Финляндии

E-mail: alionesity@gmail.com

Введение

Мембранные TRPV1 рецепторы являются неселективными катионными каналами, активируемыми теплом (>43°C), протонами, алкалоидом жгучего перца капсаицином, и экспрессируются в нейронах тригеминальной системы, также участвуют в восприятии периферической боли (1,2). По современным данным, TRPV1 рецепторы вовлечены в патогенез мигрени, одной из наиболее частых неврологических патологий. Активация данных рецепторов приводит к высвобождению генетически родственного кальцитонину пепетида (ГРКП), основного медиатора боли при мигрени, и развитию нейрогенного воспаления (3,4).

Существует предположение, что полиморфизм гена TRPV1, локализованного в 17p13 хромосоме, rs8065080 (1911A>G) играет важную роль в наследуемых изменениях восприимчивости боли.

Целью данного исследования было оценить варианты однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) гена TRPV1 у больных мигренью и здоровых лиц, и выявить ассоциации ОНП гена TRPV1 с клиническим проявлением мигрени.

Материалы и методы

В исследование были включены 9 пациентов с установленным диагнозом эпизодическая мигрень согласно диагностическим критериям мигрени по

Международной классификации головной боли III пересмотра (2013), и 45 здоровых лиц как контрольная группа. Для уточнения диагноза эпизодической мигрени у пациентов проводился сбор анамнеза, включая подробную характеристику приступов: наличие/отсутствие ауры, частоту, интенсивность болевого синдрома, для объективизации оцениваемого по визуально-аналоговой шкале (ВАШ). ДНК из крови выделяли фенол-хлороформным методом с помощью набора реактивов производства «Литех» (Россия) согласно методике производителя.

Определение ОНП гена TRPV1 1911A>G проводили методом аллель-специфичной ПЦР с использованием двухпраймерной тест-системы собственной разработки. Продукты амплификации детектировали методом геле-электрофореза в 1% агарозном геле. Генотипы определяли по наличию аллель-специфичных ПЦР-продуктов.

Результаты

По результатам проведённой аллель-специфичной ПЦР установлено, что частоты генотипов в контрольной группе распределились следующим образом: гомозиготы AA – 35.6%, гетерозиготы AG – 40.0%, гомозиготы GG – 24.4%. Среди пациентов с эпизодической мигренью частоты генотипов составили: гомозиготы AA – 33,3%, гетерозиготы AG – 33,3%, гомозиготы GG – 33,3%. Таким образом, предварительные данные свидетельствуют о преобладании AG и AA генотипов в контрольной группе по сравнению с группой пациентов с мигренью. Однако малая численность данной группы не позволяет сделать однозначный вывод. Для получения более достоверных результатов планируется продолжить исследования на большей выборке пациентов с установленным диагнозом эпизодической мигрени.

Заключение

По результатам предварительных исследований полиморфизма 1911A>G в гене TRPV1 в группе больных мигренью наблюдается более высокая частота генотипа GG и более низкая частота генотипов AG и AA по сравнению с контрольной группой. Необходимо проведение дополнительных исследований для проверки этой гипотезы.

Литература

1. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 351–369.
2. Summ O1, Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. TRPV1 receptor blockade is ineffective in different in vivo models of migraine. *Cephalalgia*. 2011 Jan; 31(2):172-180.

3. Meng J, Ovsepian SV, Wang J, et al. Activation of TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J Neurosci* 2009; 29: 4981–4992.
4. Гиниатуллин Р.А. Нейрофизиологические механизмы мигрени и новые принципы патогенетического лечения // *Казанский медицинский журнал* 2011, 92(5): 728-735.



Компания ДИАМ является крупнейшим поставщиком современного лабораторного оборудования на российском рынке. Каталог компании насчитывает более 500 000 наименований приборов, реагентов и расходных материалов для медицинских и научно-исследовательских лабораторий.

В каталоге компании представлена продукция ведущих мировых производителей: Abcam, Applied Biosystems, Binder, Bio-Rad, Corning, Eppendorf, Illumina, Ion Torrent, Lexogen, **Oxford Nanopore**, Panasonic (Sanyo), Sage Sciences, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, Qiagen.

- Наборы для подготовки библиотек, для высокопроизводительного секвенирования NGS, для исследовательских работ в онкологии, репродуктивной медицине, в изучении наследственных заболеваний, реагенты и наборы для капиллярного секвенирования.
- Секвенаторы капиллярные и высокопроизводительные NGS, оборудование для анализа качества НК для NGS, роботизированные станции для подготовки библиотек и секвенирования.
- Все для ПЦР, реагенты, наборы, пластик, амплификаторы
- Нанопоровые секвенаторы **Oxford Nanopore**, наборы для секвенирования ДНК и РНК.

000 «Диаэм»

www.dia-m.ru

Москва
ул. Магаданская, 7/3
тел./факс:
(495) 747-0508
sales@dia-m.ru

Новосибирск
пр. Акад.
Лаврентьева, 6/1
тел./факс:
(383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Казань
ул. Парижской
Коммуны, д. 6
тел./факс:
(843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Санкт-Петербург
ул. Профессора
Попова, 23
тел./факс:
(812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
пер. Семашко, 114
тел./факс:
(863) 250-0006
rnd@dia-m.ru

Пермь
Представитель
в УФО
тел./факс:
(342) 202-2239
perm@dia-m.ru

Воронеж
тел./факс:
(473) 232-4412
voronezh@dia-m.ru



Life Science подразделение компании Merck объединило в себе продукты и услуги мирового класса, инновационные возможности и исключительный талант компаний Merck Millipore и Sigma-Aldrich, став одним из глобальных лидеров в направлении Life Science. Объединение основано на взаимном дополнении сильных сторон обеих компаний и позволяет нам отвечать Вашим потребностям еще лучше. Теперь в нашем портфеле более 300,000 продуктов. Среди которых оборудование и материалы для клеточного анализа, стерилизующей фильтрации, клеточные линии ECACC и сопутствующие буферы, реагенты, питательные среды и посуда для подготовки и подсчёта клеток, культивирования и детекции, анализа белков, первичные и вторичные антитела, приборы и наборы инструментов для мультиплексного анализа, а также широкий спектр других продуктовых решений в области экспрессии, экстракции и количественного анализа, очистки и концентрирования белков, белкового электрофореза и детекции, а также системы получения сверхчистой воды.

Наша широкая линейка инновационных продуктов и технологических решений, сбалансированная география и значительные производственные и исследовательские возможности, позволяют нам предвосхищать и удовлетворять потребности клиентов, так как все, что мы делаем, начинается с нашей общей цели – решать самые серьезные проблемы в жизни и науке в сотрудничестве с глобальным научным сообществом.

	Merck 115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35
	+7(495) 937-33-04, 8-800-100-7425
	
E-mail	mm.russia@merckgroup.com / ruorder@sial.com
WEB	merckmillipore.com / sigmaaldrich.com



Компания **Аламед** занимается реализацией проектов в области **Life Sciences**, обеспечивает сервисную и аппликационную поддержку своего оборудования, а также методическую и любую другую поддержку — своим клиентам.

В каждом из перечисленных направлений мы представляем современное высокотехнологичное оборудование, которое может быть идейной основой лаборатории и широкий перечень необходимых для полноценной работы расходных материалов и реагентов.

E
M
B
E
D

QVADROS



Bio

W
C
r
a
.
D
o
c
u
m
e

Компания Quadros-Bio предлагает современные комплексные решения:

- оборудование для организации биобанков любого масштаба – от ручных систем хранения, сканеров и принтеров штрих-кодов для небольших лабораторий до надежных автоматизированных систем хранения LiCONiC;
- оборудование для организации криобанков - криохранилища, криорезервуары и криогенные трубопроводы CryoTherm, система хранения образцов C+CRYO, криозамораживатели и 2D криопробирки;

Геномика



- реал-тайм ПЦР
- таргетное обогащение
- выделение НК

Протеомика



- хроматография
- гель-документирование
- системы межмолекулярного взаимодействия

Life of genomes. 22-24 мая 2018, Казань

- многозадачные роботизированные платформы для автоматизации различных лабораторных операций: выделение ДНК, постановка ПЦР, пробоподготовка для NGS, масс-спектрометрии и хроматографии, проведение ИФА и аликвотирование;
- современное оборудование для наблюдения за клеточными процессами от пролиферации до ангио- и нейrogenеза, формирования 3D культур;
- оборудование, реактивы и расходные материалы для молекулярной и клеточной биологии, позволяющие осуществить любые рабочие процессы современных биологических исследований, – от культивирования клеток и тканей и клеточного анализа до выделения и изучения белков и нуклеиновых кислот, ПЦР, клонирования и секвенирования.



Agilent

Trusted Answers

About Agilent Technologies

Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) is a global leader in life sciences, diagnostics, and applied chemical markets. With more than 50 years of insight and innovation, Agilent instruments, software, services, solutions, and people provide trusted answers to its customers' most challenging questions. The company generated revenues of \$4.47 billion in fiscal 2017 and employs 14,200 people worldwide. Information about Agilent is available at www.agilent.com.

О компании Agilent Technologies

Компания Agilent Technologies — мировой лидер на рынке медико-биологических исследований, диагностики и прикладной химии. На протяжении уже более 50 лет открытий и инноваций, приборы, программное обеспечение, сервис, а также команда профессионалов Agilent предоставляют ответы на самые сложные вопросы клиентов. За 2017 финансовый год компания получила чистую прибыль 4,47 миллиарда долларов США, ее общий штат в филиалах по всему миру составляет 14 200 человек. Информация о компании Agilent доступна по адресу: www.agilent.com.