



АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ДОРСАЛЬНОМ И ВЕНТРАЛЬНОМ ОТДЕЛАХ ГИППОКАМПА ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ МЕДИАЛЬНОЙ СЕПТАЛЬНОЙ ЗОНЫ.

Белецкий А.П.,
Тюленев И.А.,
Спивак Ю.С.,
Добрякова Ю.В

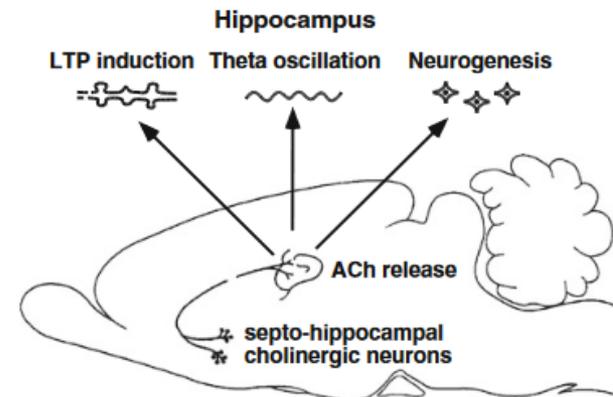
(ИВНД и НФ РАН)

Холинергическая система ЦНС

- Вовлечена в регуляцию процессов обучения и памяти (Naam et al, 2017; Hasselmo, 2006), иммунного ответа
- При фармакологической активации, способствует снижению нейродегенеративных проявлений при болезнях Альцгеймера (Vieira et al, 2017) , Паркинсона (Rizzi et al, 2017) , является мишенью для разработки новых препаратов
- Выступает частым объектом нейродегенеративных нарушений сама по себе.

Септо-гиппокампальная ХС:

- Активна во время обучения (Ragozzino et al.1996;
- Stancampiano et al.1999; Hironaka et al.2001)
- Связана с индукцией LTP (Human, 2004) на основе генерации тета-ритма (Lee et al, 1994)
- необходима для активного зрелого нейрогенеза (Mohapel et al.2005; Kotani et al.2006)



Актуальная задача:

- Исследование молекулярных механизмов холинорецепции гиппокампа на уровне транскриптома

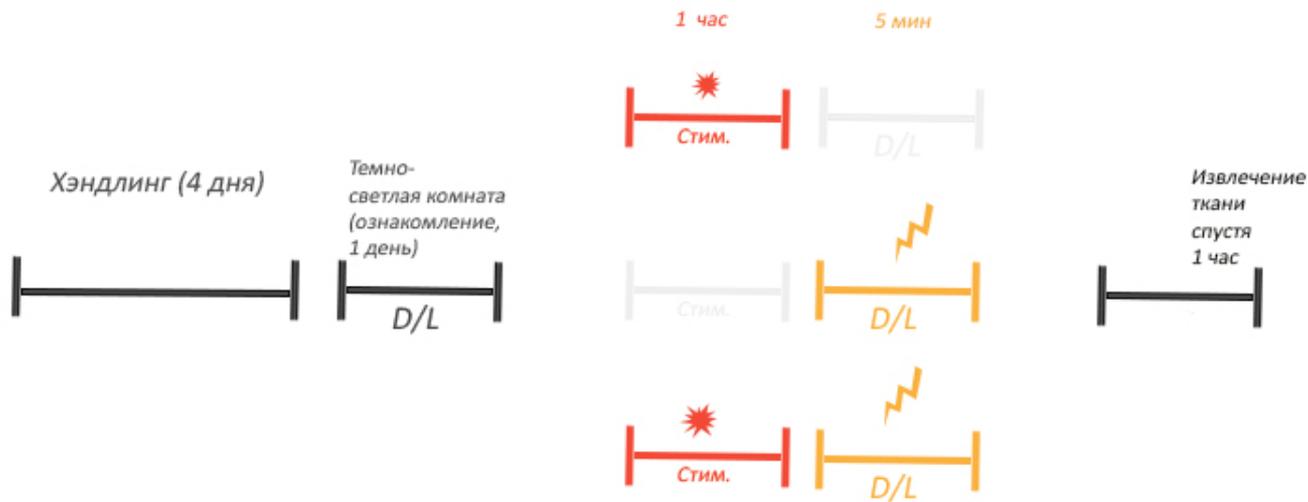
Дизайн эксперимента:

- 1) Объект: крысы Wistar после вживления стимулирующего электрода в область медиального септума
- 2) Время проведения эксперимента: две недели спустя после вживления электрода

3) Полная схема эксперимента:

- основная обсуждаемая группа– **стимуляция**

- другие группы: обучение, стимуляция + обучение:



4) Стимуляция медиального септума проводилась в тета-диапазоне (4 гц.) в течение одного часа

Молекулярные методы исследования

1) Извлечение тотальной РНК:

- Вентральная и дорсальная области гиппокампа
- 4 реплики для контрольной и экспериментальных (стимуляция, обучение, стимуляция + обучен) группы для каждой из областей. В совокупности, 32 образца.

2) Подготовка библиотек кДНК

Биоинформатические методы анализа:

3) Секвенирование на платформе BGISEQ (Китай)

4) Получение прочтений для каждого из образцов

- контроль качества
- выравнивание на геном крысы (версия rn6, UCSC)
- подсчет количества прочтений в пределах известной аннотации генов (версия ENSEMBL): **47%**

5) Использование прочтений для сборки собственной аннотации к генам (de novo)

- рост используемых прочтений до 56%
- 6700 новых интергенных локусов
- отсеивание неудачных образцов (два контроля: VH, DH)

6) Анализ дифференциальной экспрессии генов:

- между контрольными группами гиппокампов
- между контрольной и экспериментальной группой в каждом из них

7) Построение корреляционной сети ко-экспрессии генов (WGCNA), регрессионный анализ.

Отличия от базовой аннотации ENSEMBL:

Расположение сплайс-сайта (24 т. транскриптов)



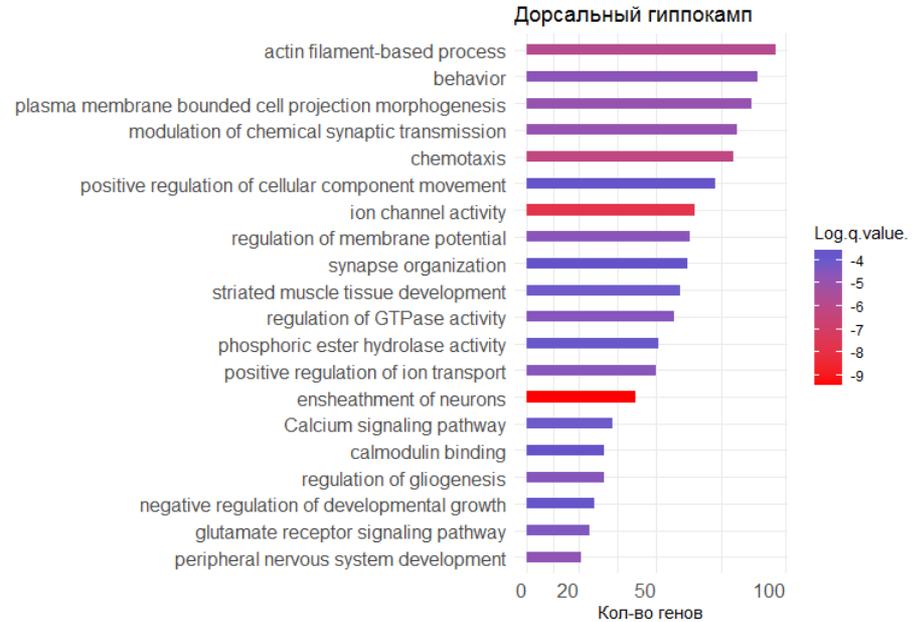
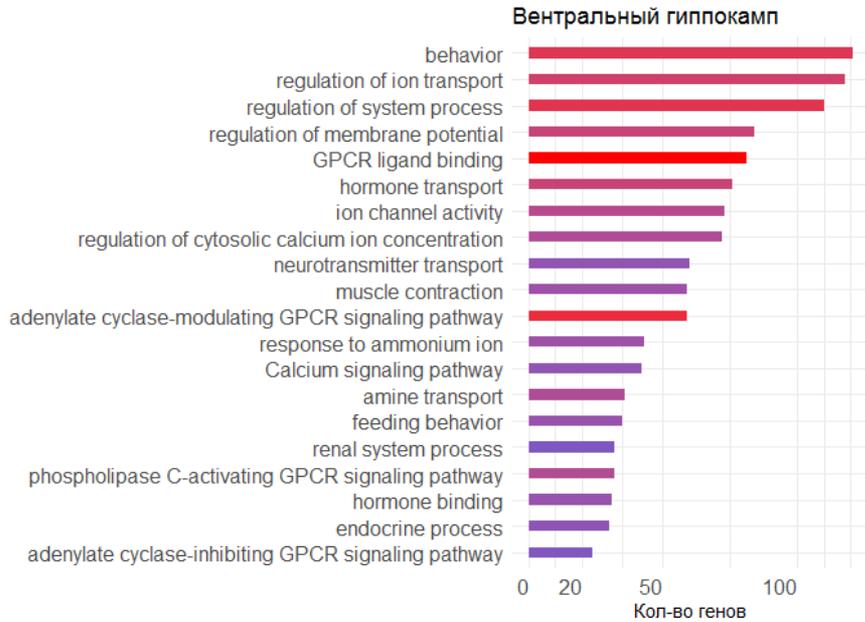
Новые фланкирующие экзоны



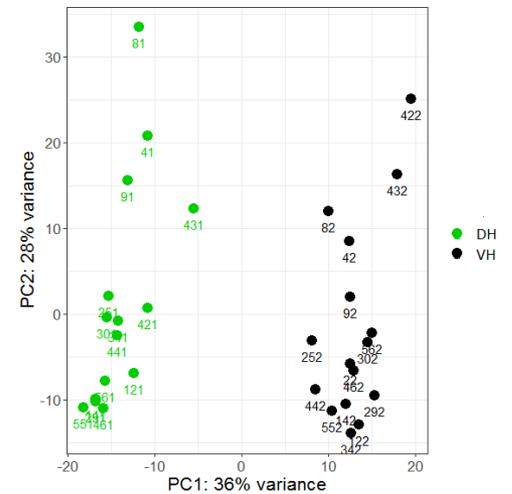
Использованные базы данных: энциклопедии “биологических путей” и сигнальных каскадов KEGG, Reactome, MsigDB
мета-анализ 5 исследований Single-cell нейронов мыши (McKenzie et al, 2018)

Базовые гиппокампальные отличия в экспрессии генов:

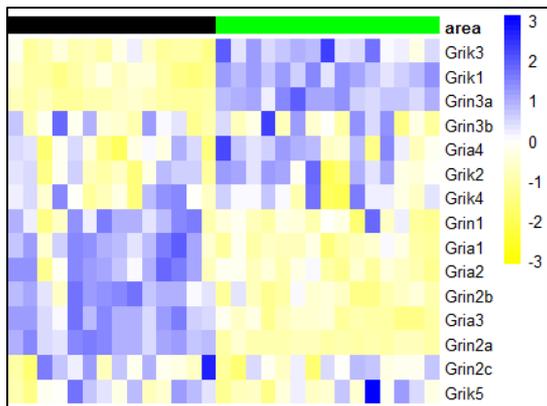
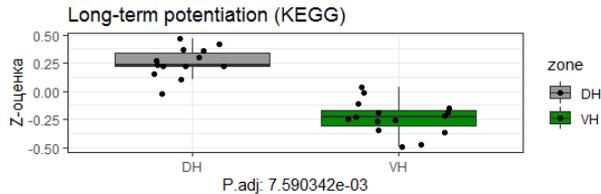
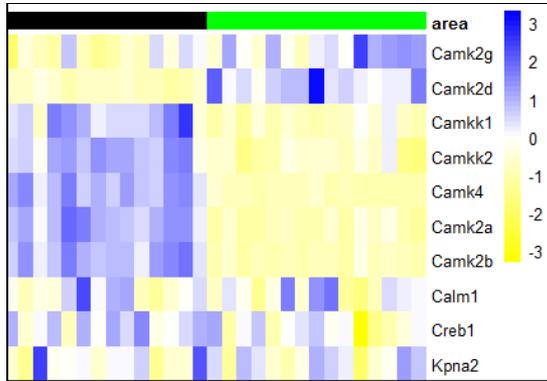
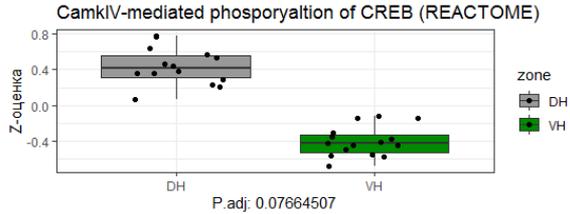
- Сравнения всех вентральных и дорсальных образцов, с поправкой на эффекты эксп. групп



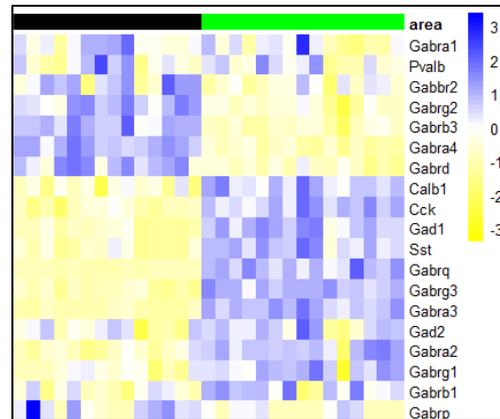
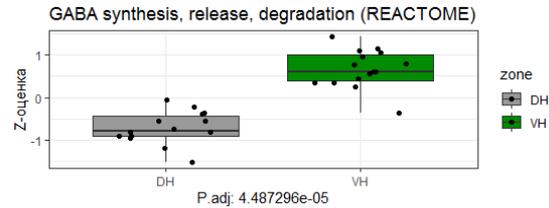
■ - Вентральный гиппокамп
■ - Дорсальный гиппокамп



Дорсальный гиппокамп



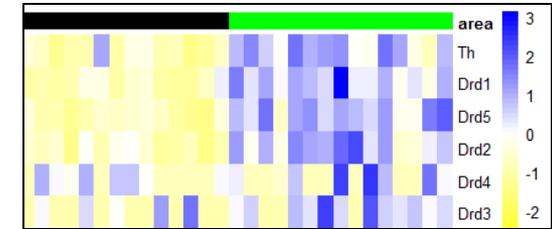
Сигнальные пути и рецепторы



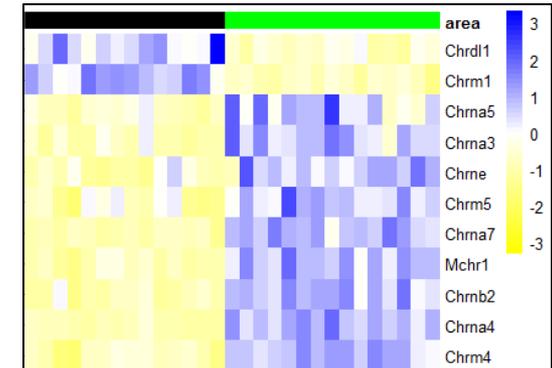
- Вентральный гиппокамп
 - Дорсальный гиппокамп

Вентральный гиппокамп

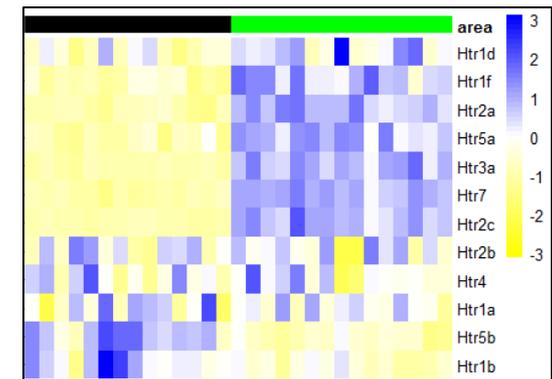
Дофаминовые рецепторы



Холинорецепторы

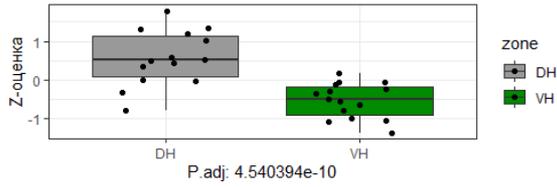


Серотониновые рецепторы

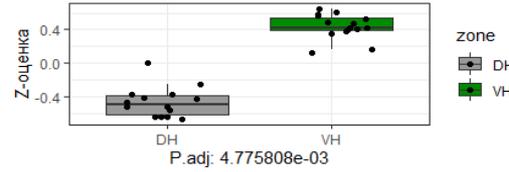


Глиальные маркеры и гены нейрогенеза

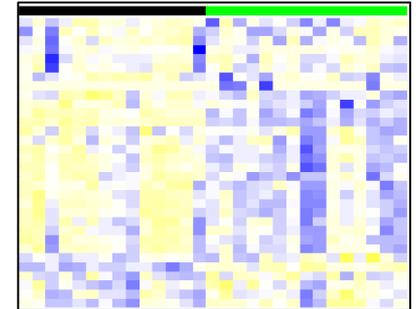
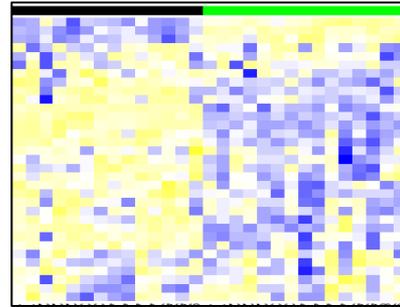
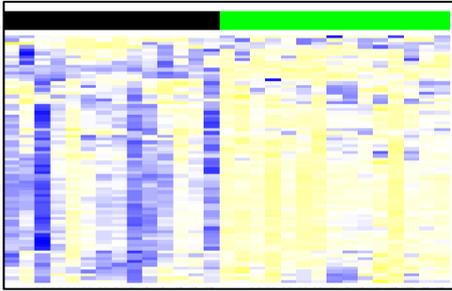
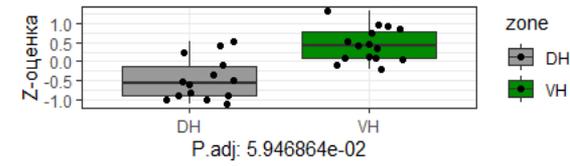
Oligodendrocyte Markers (Lein et al)



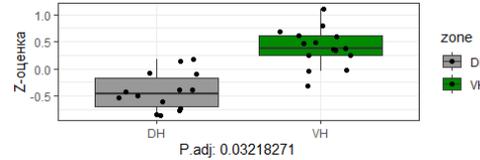
Hedgehog (SHH) signaling (Hallmark)



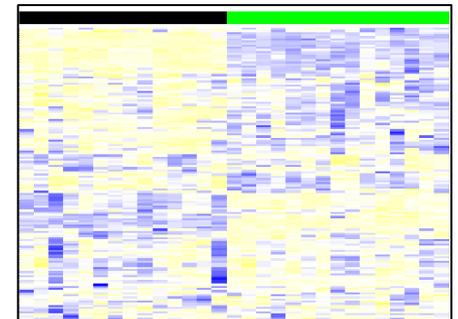
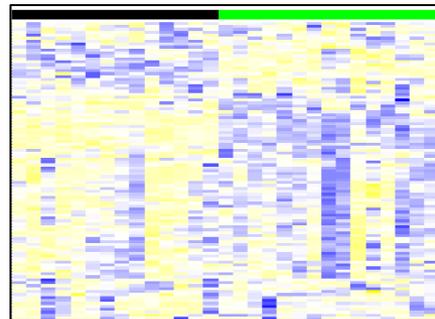
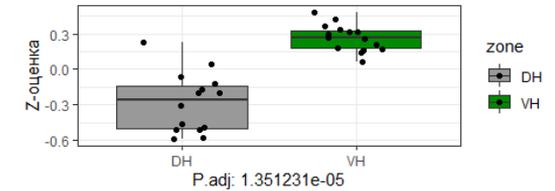
Hippocampus Neonatal (Mody et al.)



Hedgehog OFF State (REACTOME)

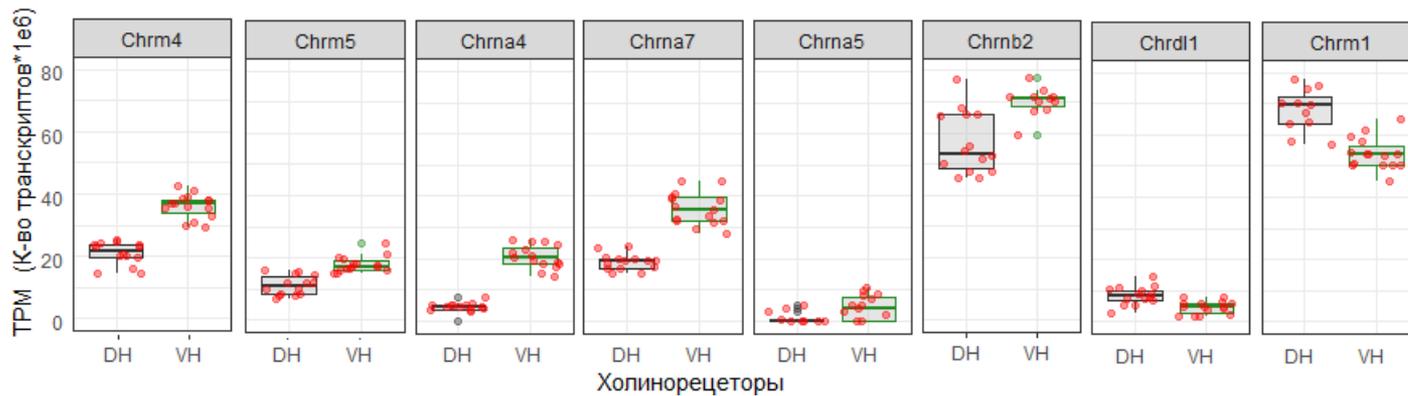
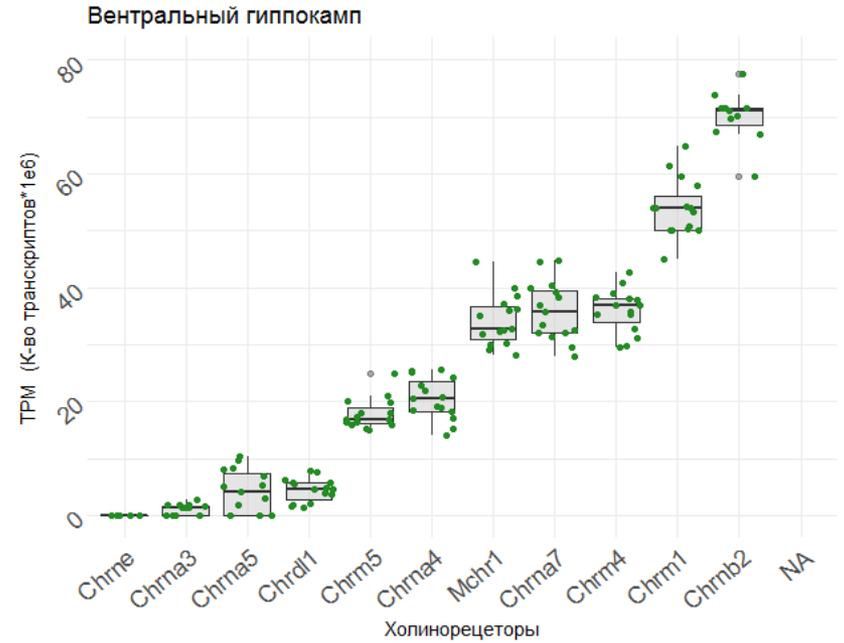
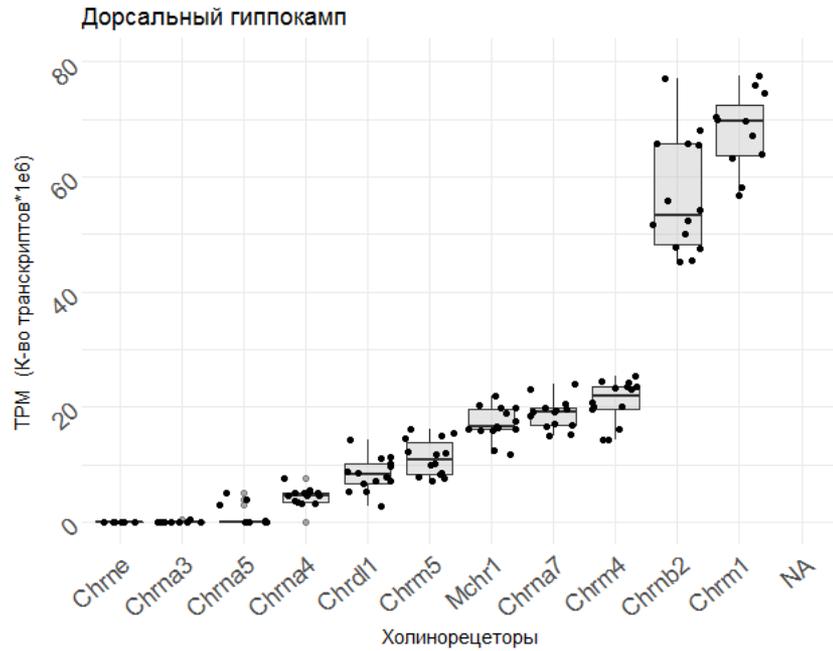


Neural Crest Stem Cell Up (Lee et al.)



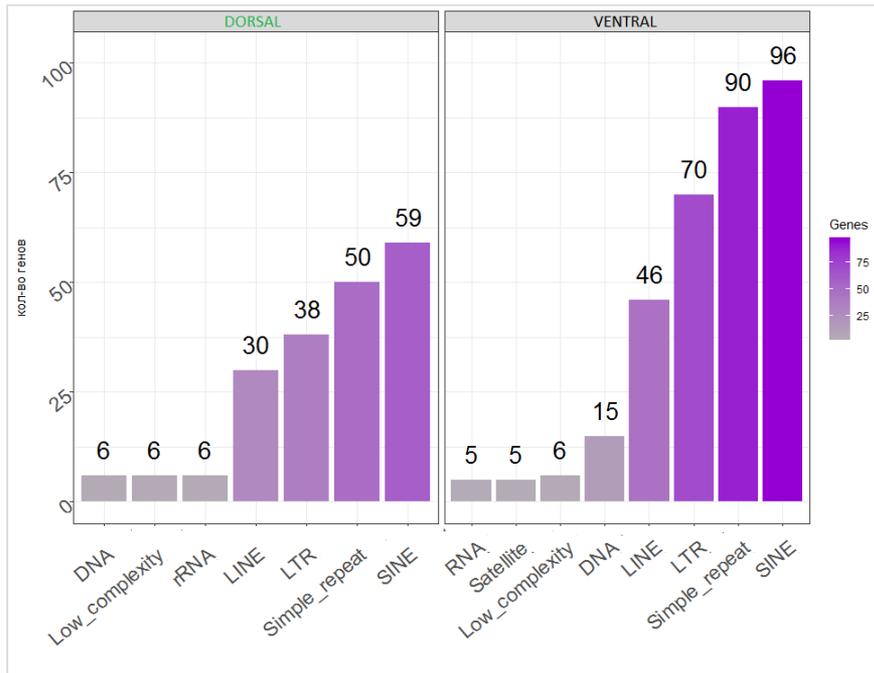
 - Вентральный гиппокамп
 - Дорсальный гиппокамп

Распределение Aсh-рецепторов в гиппокампах



Различия в экспрессии транспозонов различных семейств

Комбинированная аннотация (de novo + ENSEMBL)



> Brain Behav Immun. 2017 Aug;64:65-70. doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.018. Epub 2016 Dec 21.

L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation

Sara Bachiller¹, Yaiza Del-Pozo-Martín¹, Ángel Manuel Carrión²

> PLoS Genet. 2019 Apr 11;15(4):e1008043. doi: 10.1371/journal.pgen.1008043. eCollection 2019 Apr.

Somatic LINE-1 retrotransposition in cortical neurons and non-brain tissues of Rett patients and healthy individuals

Boxun Zhao^{1,2}, Qixi Wu³, Adam Yongxin Ye^{4,5,6}, Jing Guo^{1,7}, Xianing Zheng^{1,2}, Xiaoxu Yang⁵, Linlin Yan⁵, Qing-Rong Liu⁸, Thomas M Hyde^{9,10}, Liping Wei^{1,2,5}, August Yue Huang⁵

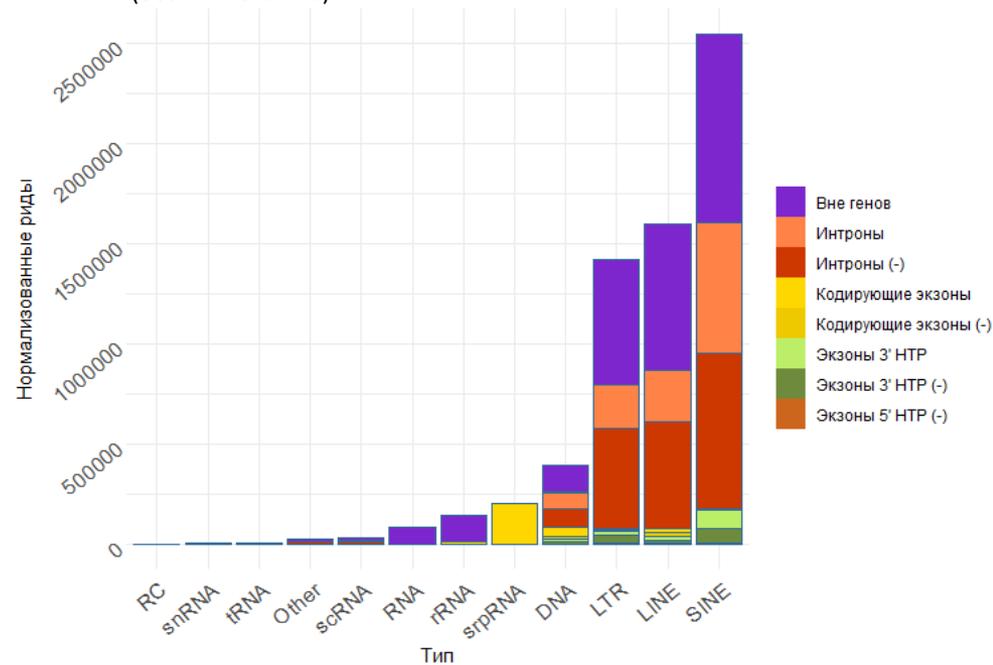
> Cell. 2015 Apr 9;161(2):228-39. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.026.

Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons

Kyle R Upton¹, Daniel J Gerhardt¹, J Samuel Jesuadian¹, Sandra R Richardson¹, Francisco J Sánchez-Luque¹, Gabriela O Bodea¹, Adam D Ewing¹, Carmen Salvador-Palomeque¹, Marjo S van der Knaap², Paul M Brennan³, Adeline Vanderver⁴, Geoffrey J Faulkner⁵

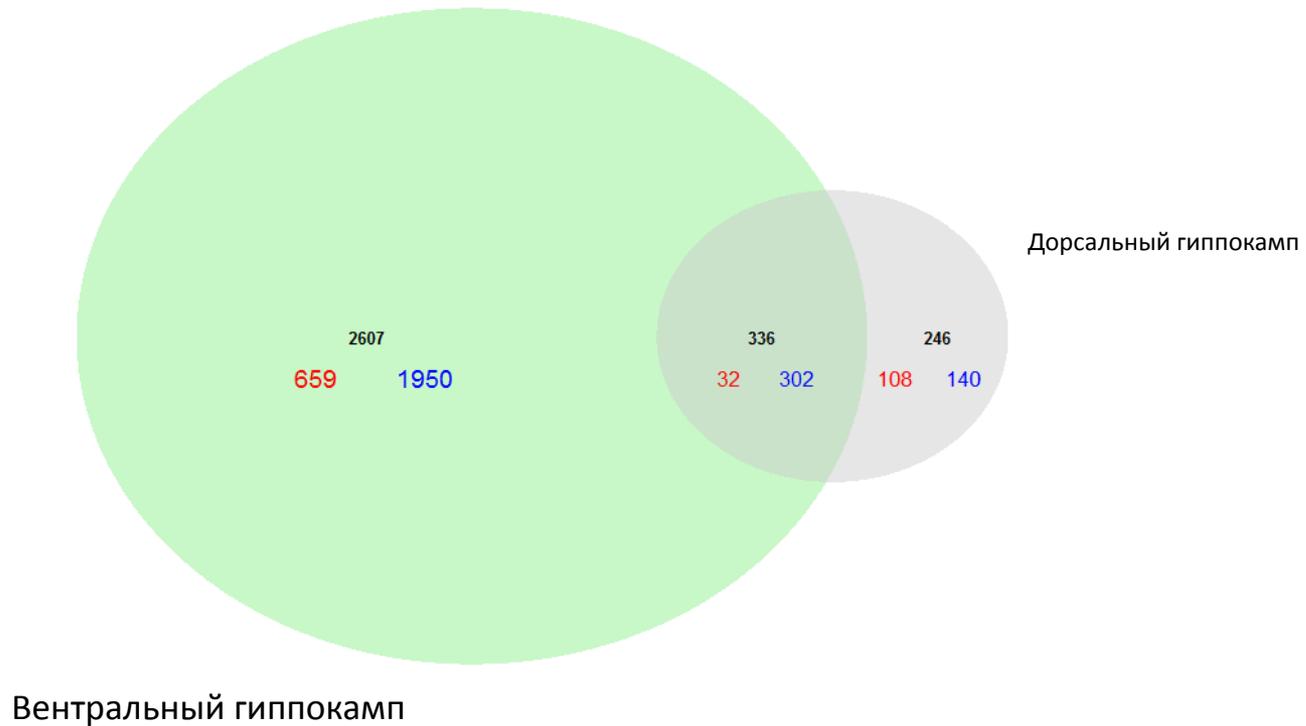
Локализация экспрессируемых транспозонов в геноме крысы.

Аннотация базы последовательностей RepeatMasker (оба гиппокампа)



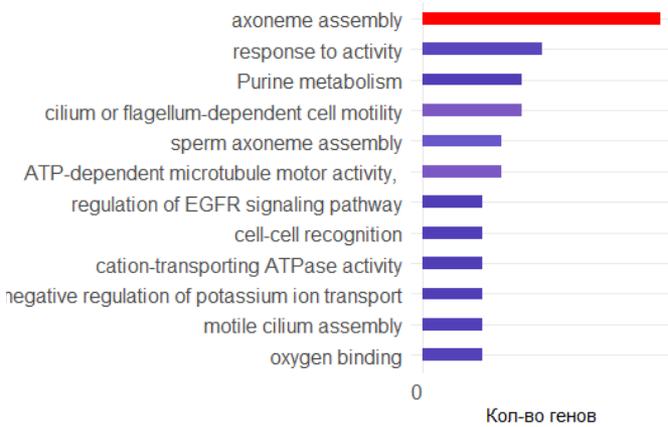
■ - Вентральный гиппокамп
■ - Дорсальный гиппокамп

Дифференциальная экспрессия генов: стимуляция vs. контроль



Рост экспрессии
Снижение экспрессии

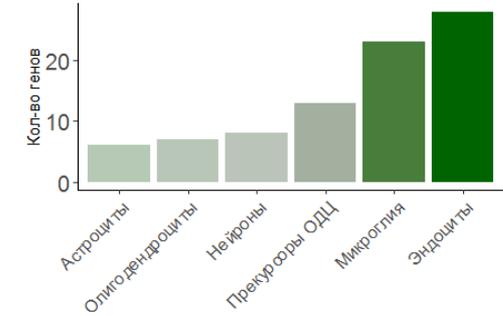
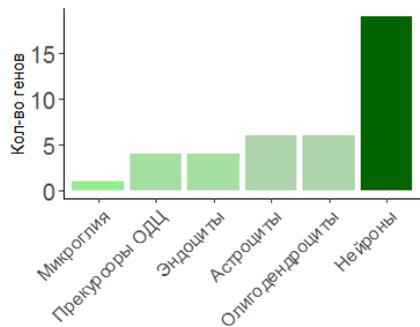
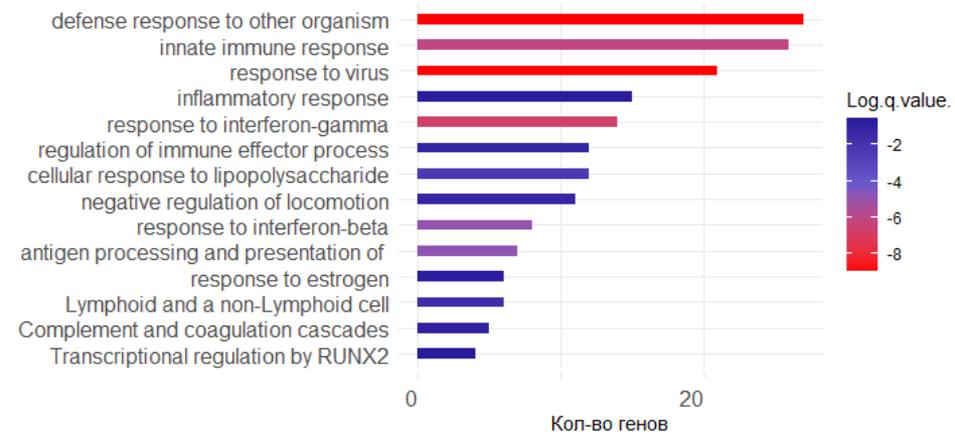
Возрастание экспрессии



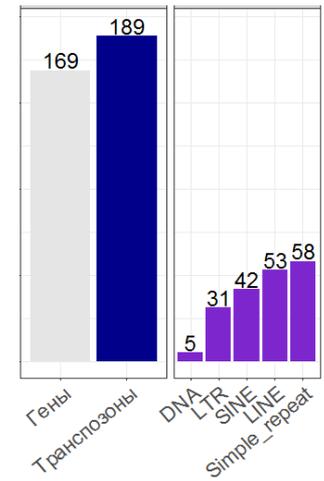
Дорсальный гиппокамп



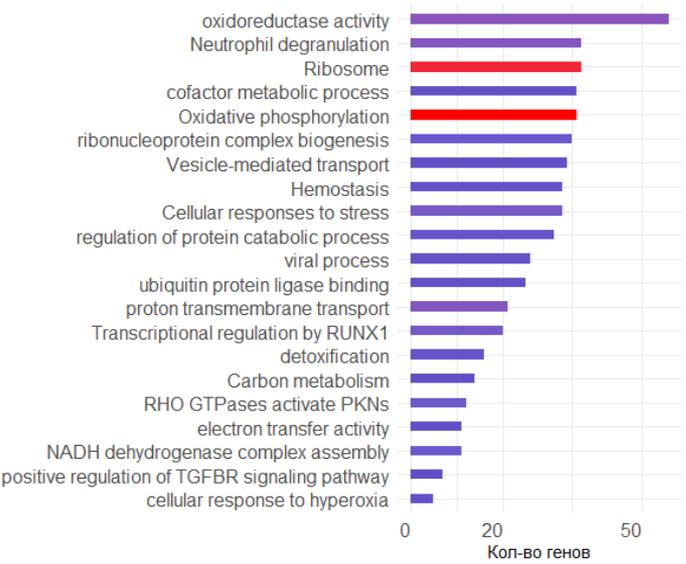
Снижение экспрессии



— - Стимуляция
— - Контроль



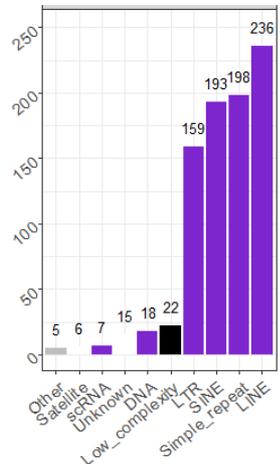
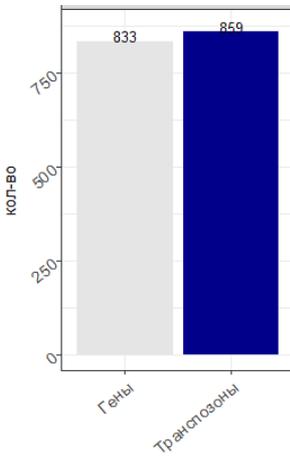
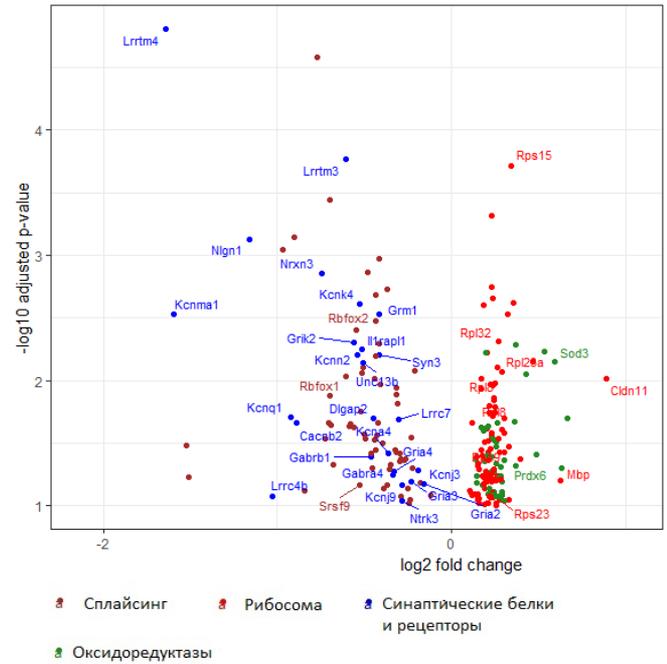
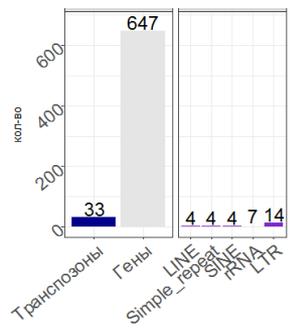
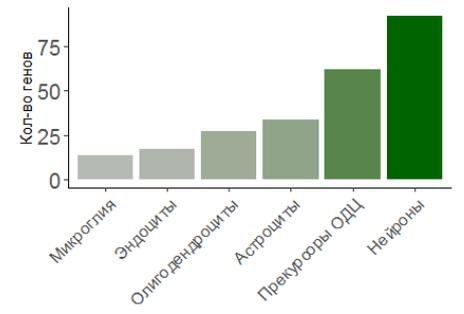
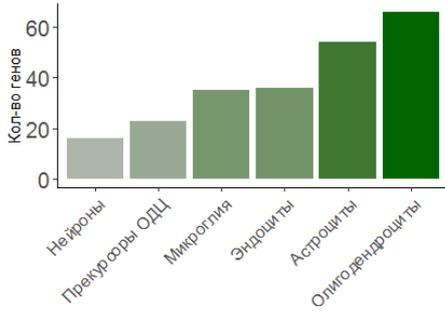
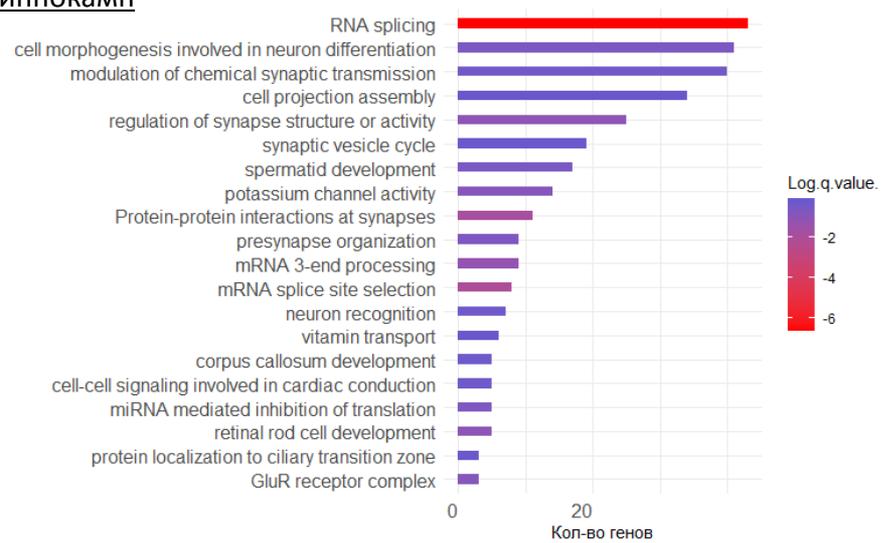
Возрастание экспрессии



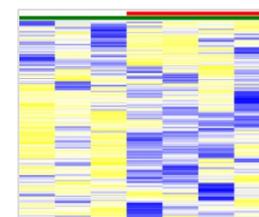
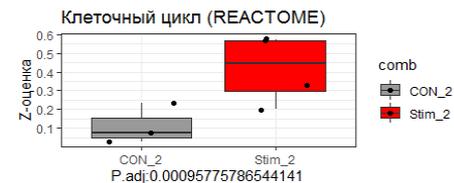
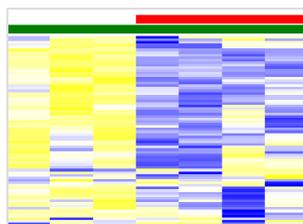
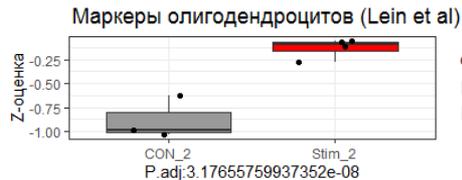
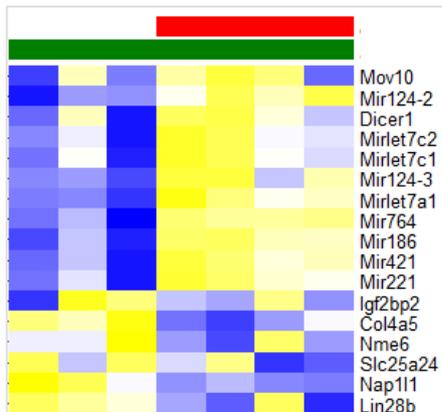
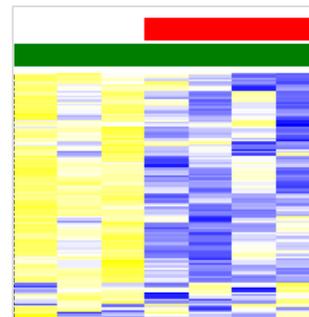
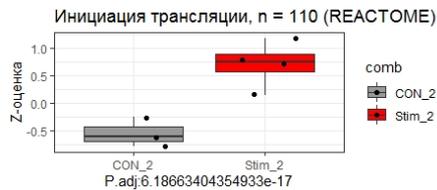
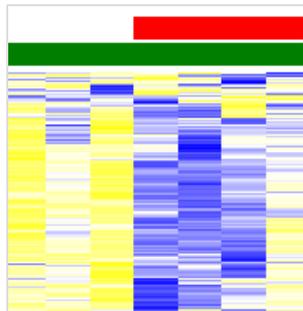
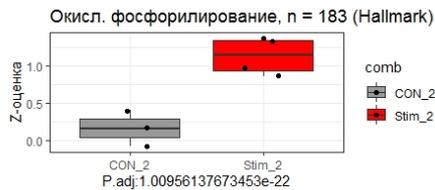
Вентральный гиппокамп



Снижение экспрессии



- Стимуляция
 - Контроль



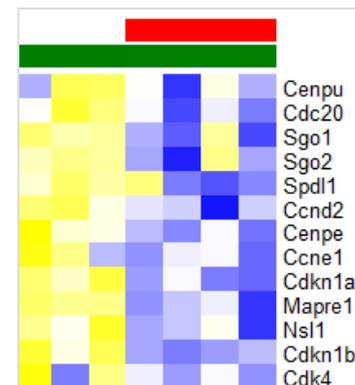
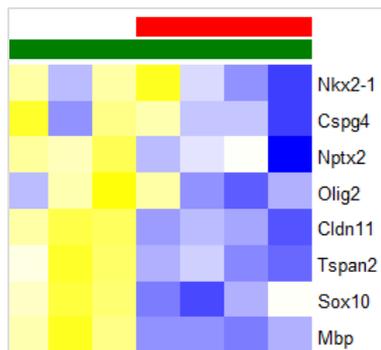
Метаболизм микро-РНК:

Нейрогенез, миграция клеток (+):
 -miR128 (Franzoni, 2015)

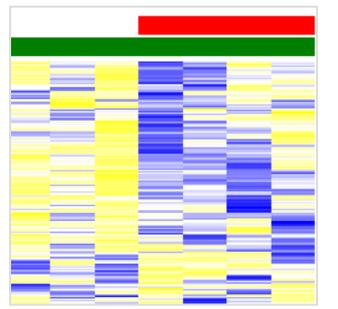
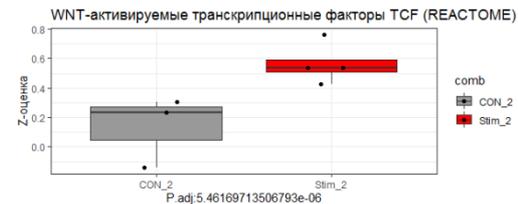
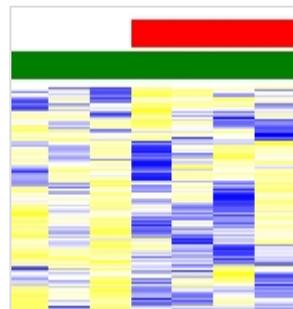
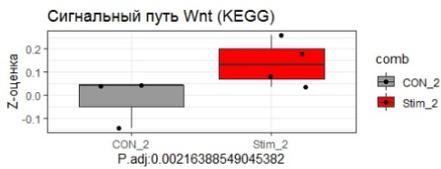
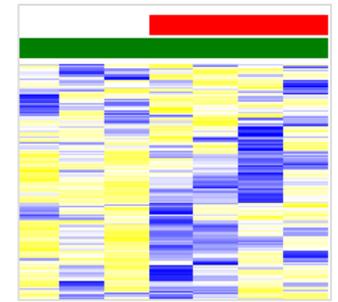
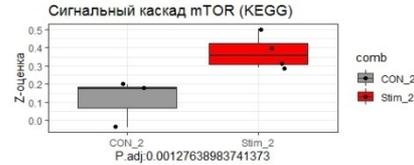
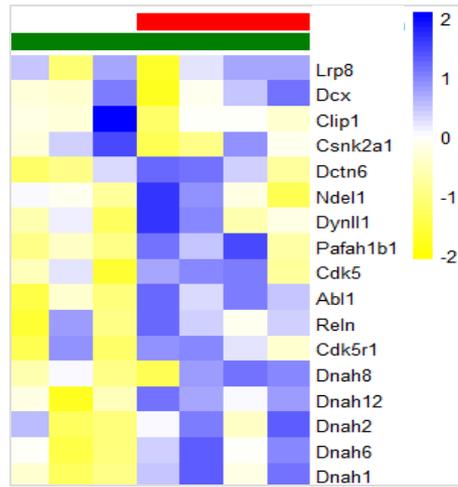
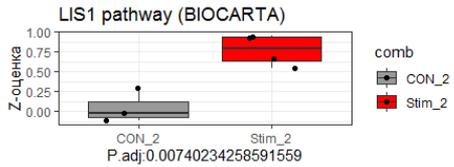
Глиогенез (+):
 -miR186 (Wang et al, 2017), miR-let7a (Li Y,2016)

Глиогенез (-):
 -miR221 (Sage et al, 2007)

Пролиферация клеток, онк.:
 -miR-421 (Chen et al., 2013)

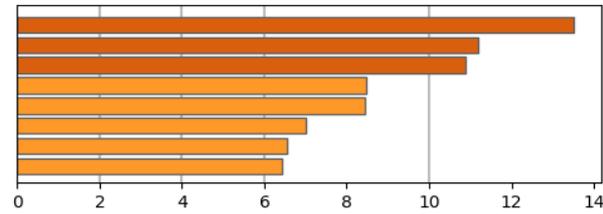
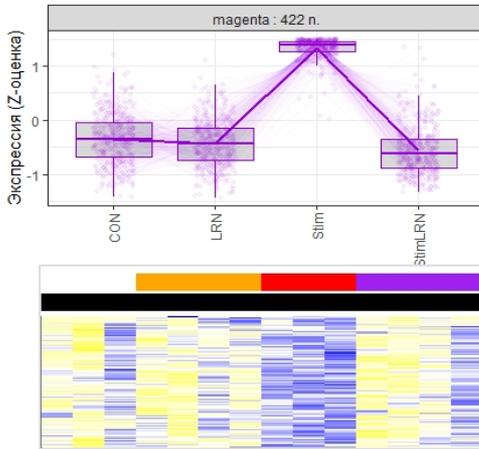


- Стимуляция
 - Контроль

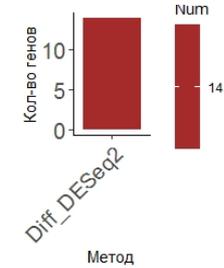
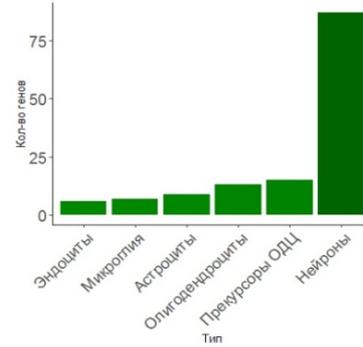


Корреляционная сеть генов: Дорсальный гиппокамп

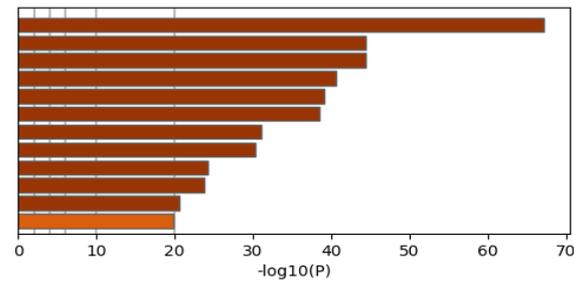
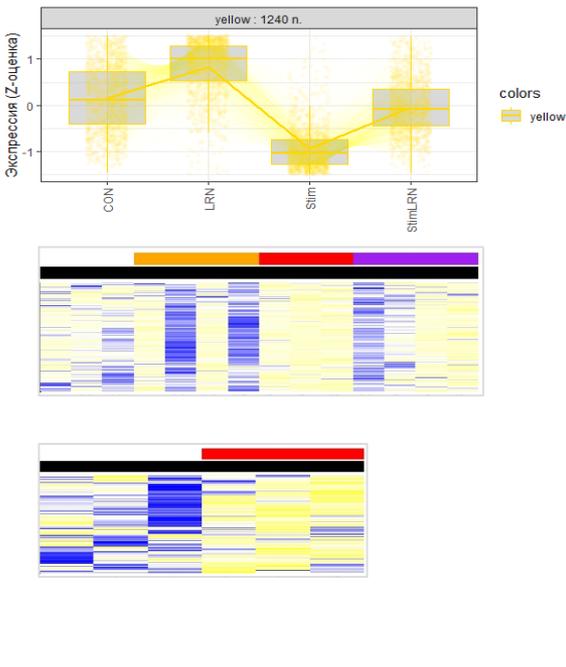
N генов = 422



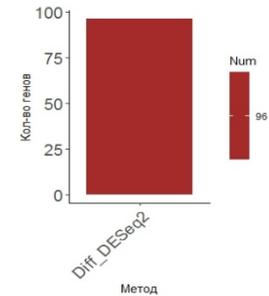
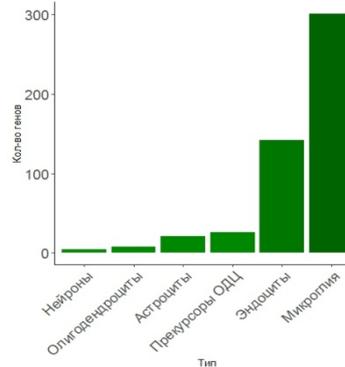
ko04721: Synaptic vesicle cycle
 GO:0099504: synaptic vesicle cycle
 R-MMU-112316: Neuronal System
 R-MMU-199991: Membrane Trafficking
 GO:0036465: synaptic vesicle recycling
 GO:0023061: signal release
 GO:0050808: synapse organization
 GO:0061615: glycolytic process through fructose-6-phosphate



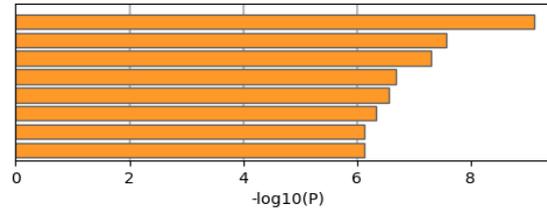
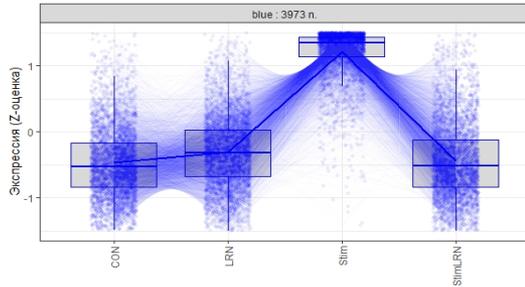
N генов = 1240



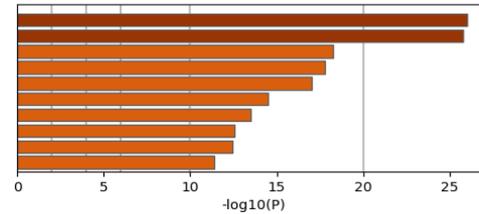
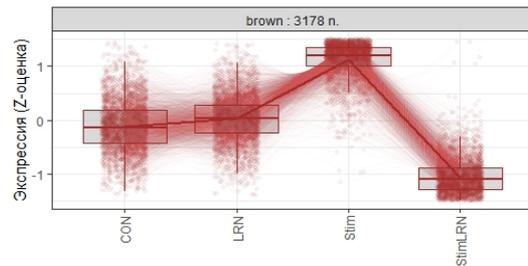
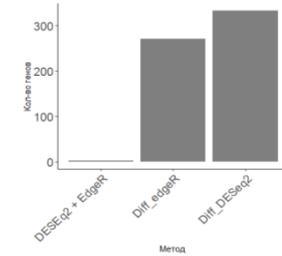
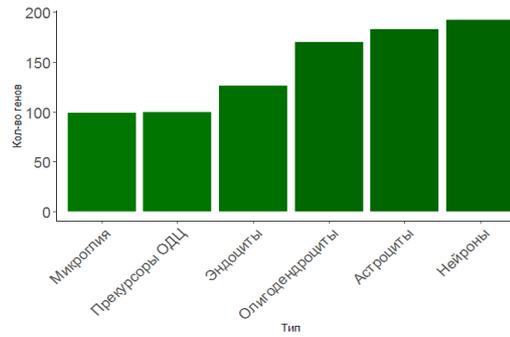
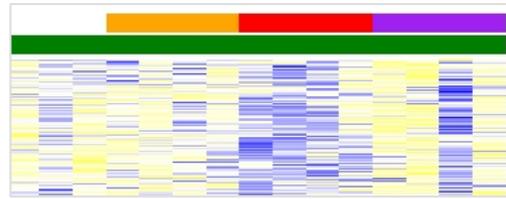
GO:0002252: immune effector process
 GO:0045087: innate immune response
 GO:0006954: inflammatory response
 GO:0001817: regulation of cytokine production
 GO:0046649: lymphocyte activation
 GO:0098542: defense response to other organism
 GO:0002274: myeloid leukocyte activation
 R-RNO-168249: Innate Immune System
 GO:0050900: leukocyte migration
 GO:0006909: phagocytosis
 GO:0002366: leukocyte activation involved in immune response
 GO:0019221: cytokine-mediated signaling pathway



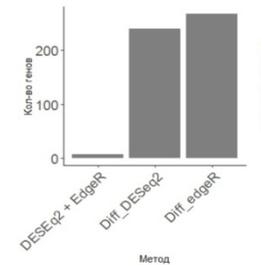
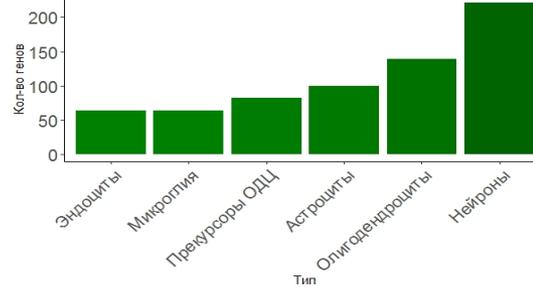
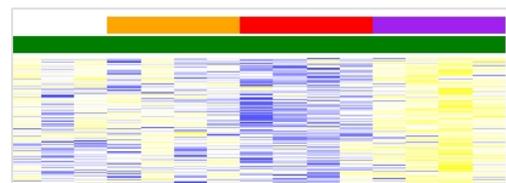
Вентральный гиппокамп

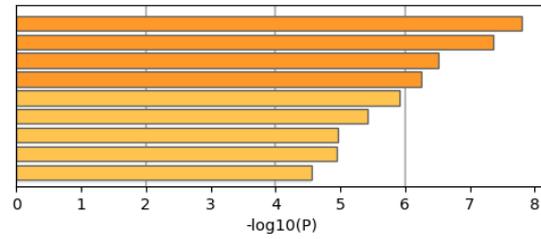
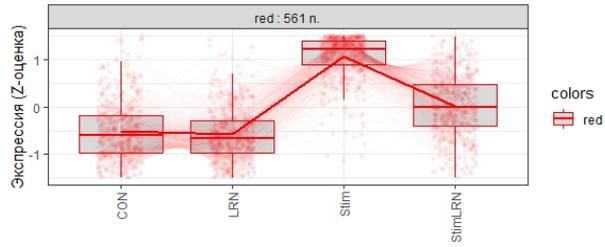


- GO:0051186: cofactor metabolic process
- R-RNO-72766: Translation
- GO:0007005: mitochondrion organization
- GO:0061024: membrane organization
- GO:0010498: proteasomal protein catabolic process
- GO:0019901: protein kinase binding
- GO:0006412: translation
- GO:0072657: protein localization to membrane

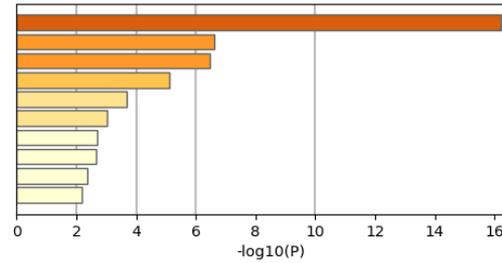
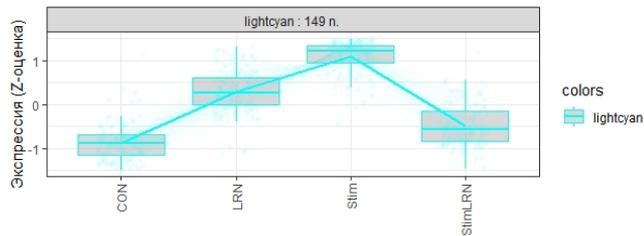
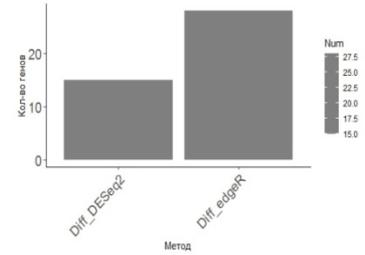
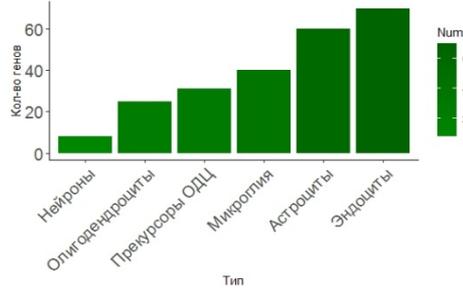
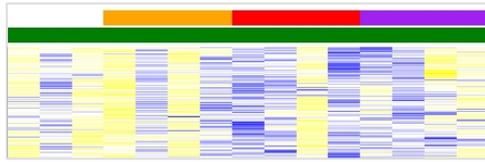


- GO:0043632: modification-dependent macromolecule catabolic process
- R-MMU-8953854: Metabolism of RNA
- R-MMU-199991: Membrane Trafficking
- R-MMU-2262752: Cellular responses to stress
- R-MMU-72766: Translation
- GO:0048193: Golgi vesicle transport
- R-MMU-1640170: Cell cycle
- GO:0032549: ribonucleoside binding
- R-MMU-1428517: The citric (TCA) cycle and respiratory electron tra
- GO:1903827: regulation of cellular protein localization

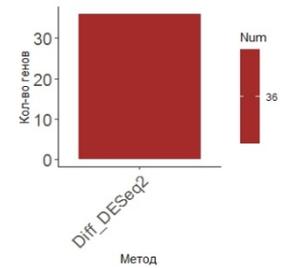
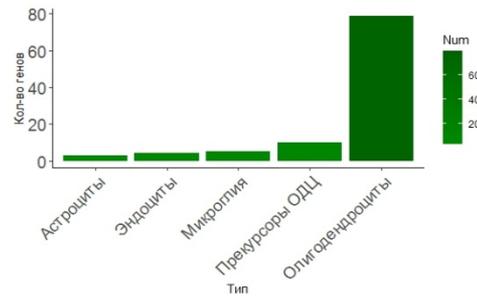
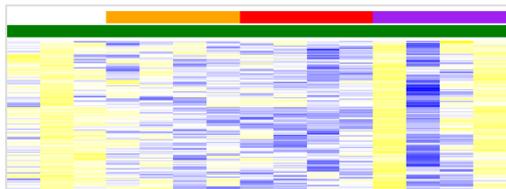




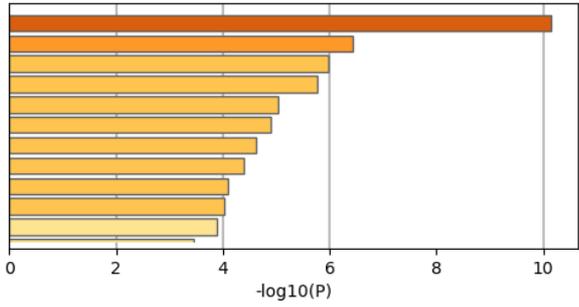
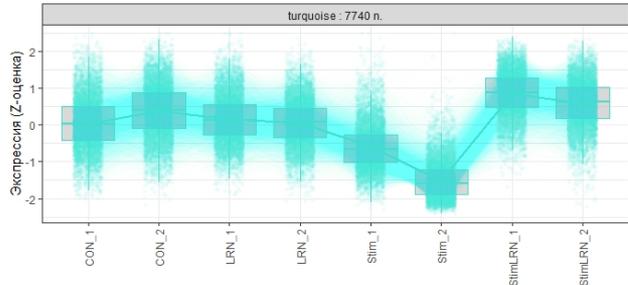
- GO:0030155: regulation of cell adhesion
- GO:0001525: angiogenesis
- GO:0042060: wound healing
- GO:0043062: extracellular structure organization
- GO:0030855: epithelial cell differentiation
- GO:0030036: actin cytoskeleton organization
- GO:1902396: protein localization to bicellular tight junction
- GO:2000147: positive regulation of cell motility
- GO:0010811: positive regulation of cell-substrate adhesion



- GO:0048709: oligodendrocyte differentiation
- GO:0019911: structural constituent of myelin sheath
- GO:0014013: regulation of gliogenesis
- GO:0007422: peripheral nervous system development
- GO:0048708: astrocyte differentiation
- GO:0015293: symporter activity
- GO:0006633: fatty acid biosynthetic process
- R-RNO-382551: Transport of small molecules
- ko00230: Purine metabolism
- GO:0060443: mammary gland morphogenesis



Ко-экспрессия Line-1 (аннотация l1base) и кодирующих генов по двум гиппокампам

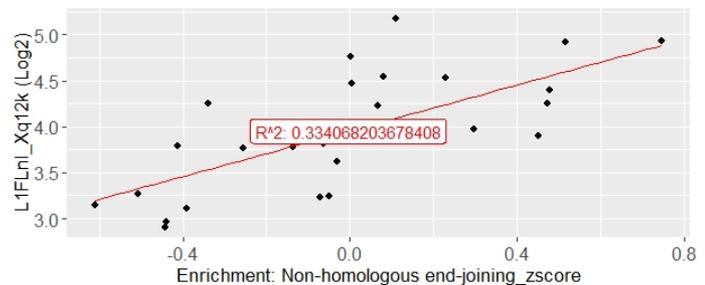
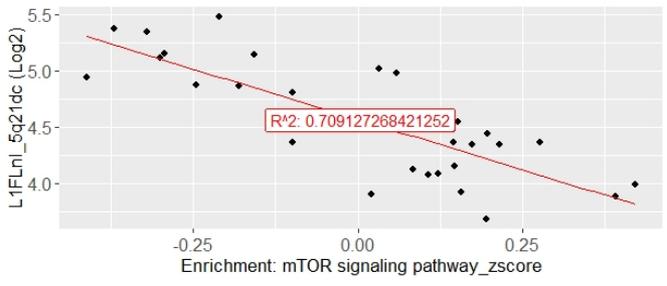
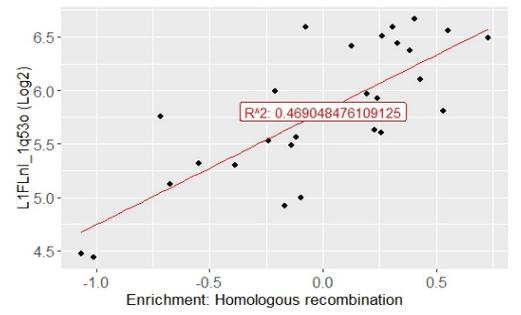
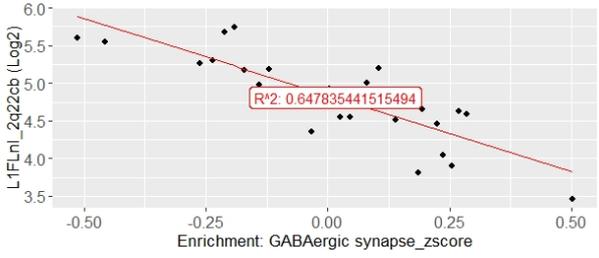
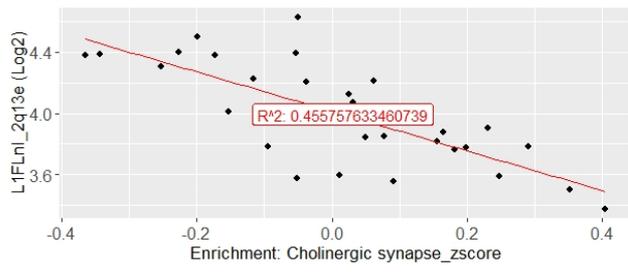


- GO:0008380: RNA splicing
- GO:0044782: cilium organization
- GO:0006400: tRNA modification
- GO:0006376: mRNA splice site selection
- GO:0070633: transepithelial transport
- GO:0061512: protein localization to cilium
- R-MMU-72187: mRNA 3'-end processing
- GO:0007283: spermatogenesis
- GO:0030317: flagellated sperm motility
- GO:2001253: **regulation of histone H3-K36 trimethylation**
- mmu03440: **Homologous recombination**

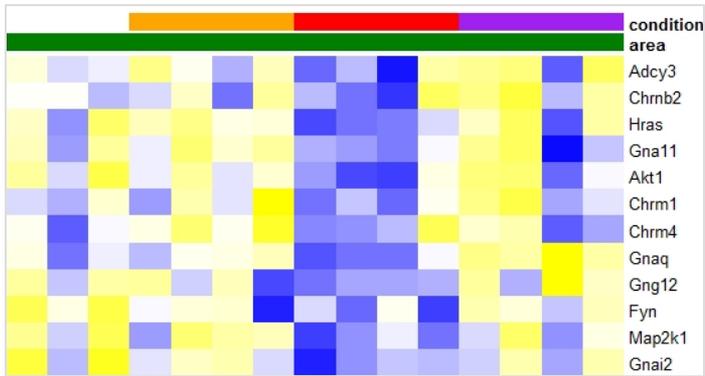


Гребневая регрессия:

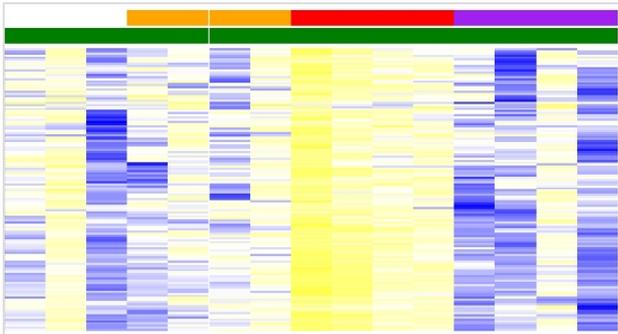
- Транспозоны семейства Line-1 (n = 2300) vs. значения "биологических путей" генов по каждому образцу



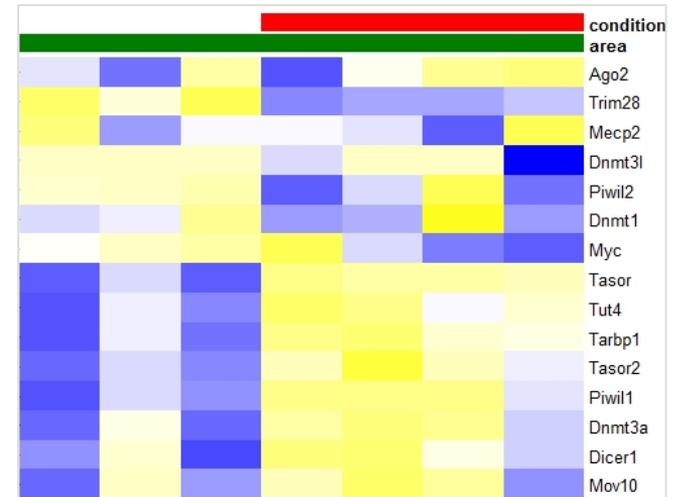
Холинорецепторы и их мишени



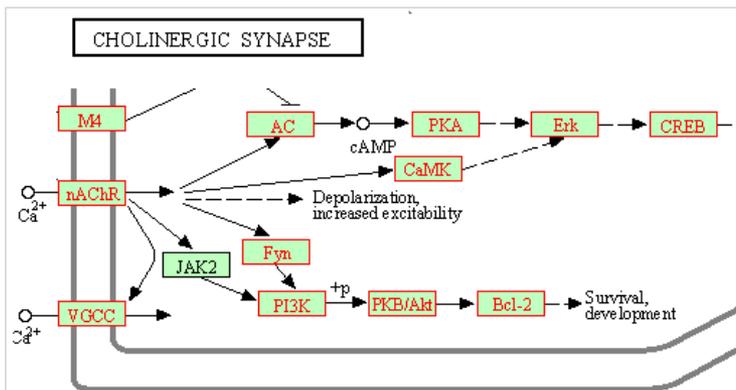
LINE-1 (n ~ 100)



Известные репрессоры транскрипции LINE-1



Холинергический сигнальный путь (KEGG, фрагмент)



Выводы:

Согласно полученным данным:

- Гиппокампы гетерогенны по своему рецепторному составу с преобладанием моноаминергической и холинергической рецепции в вентральной части
- Эффекты холинергической стимуляции (ХС) имеют большую выраженность в вентральном гиппокампе и положительно связаны с регуляцией пролиферации, дифференцировки клеток (сигнальные пути Wnt, mTOR), экспрессией олигодендроцитарных маркеров
- Эффекты ХС в дорсальном гиппокампе выражены слабее и ассоциированы с усилением экспрессии генов синаптической активности
- Негативное влияние ХС на экспрессию генов в обоих гиппокампах затрагивает, прежде всего, некодирующие локусы и транспозоны различных семейств (в ч. нейронально-активное семейство LINE-1).
- Эффекты ХС в дорсальном гиппокампе, предположительно, имеют противовоспалительные эффекты за счет снижения экспрессии генов иммунного ответа.

Спасибо за внимание!