

Публичная лекция
ИЦиГ, 20 ноября, 2019

Плоский червь *Macrostomum lignano* и секреты регенерации и долголетия

Евгений Березиков

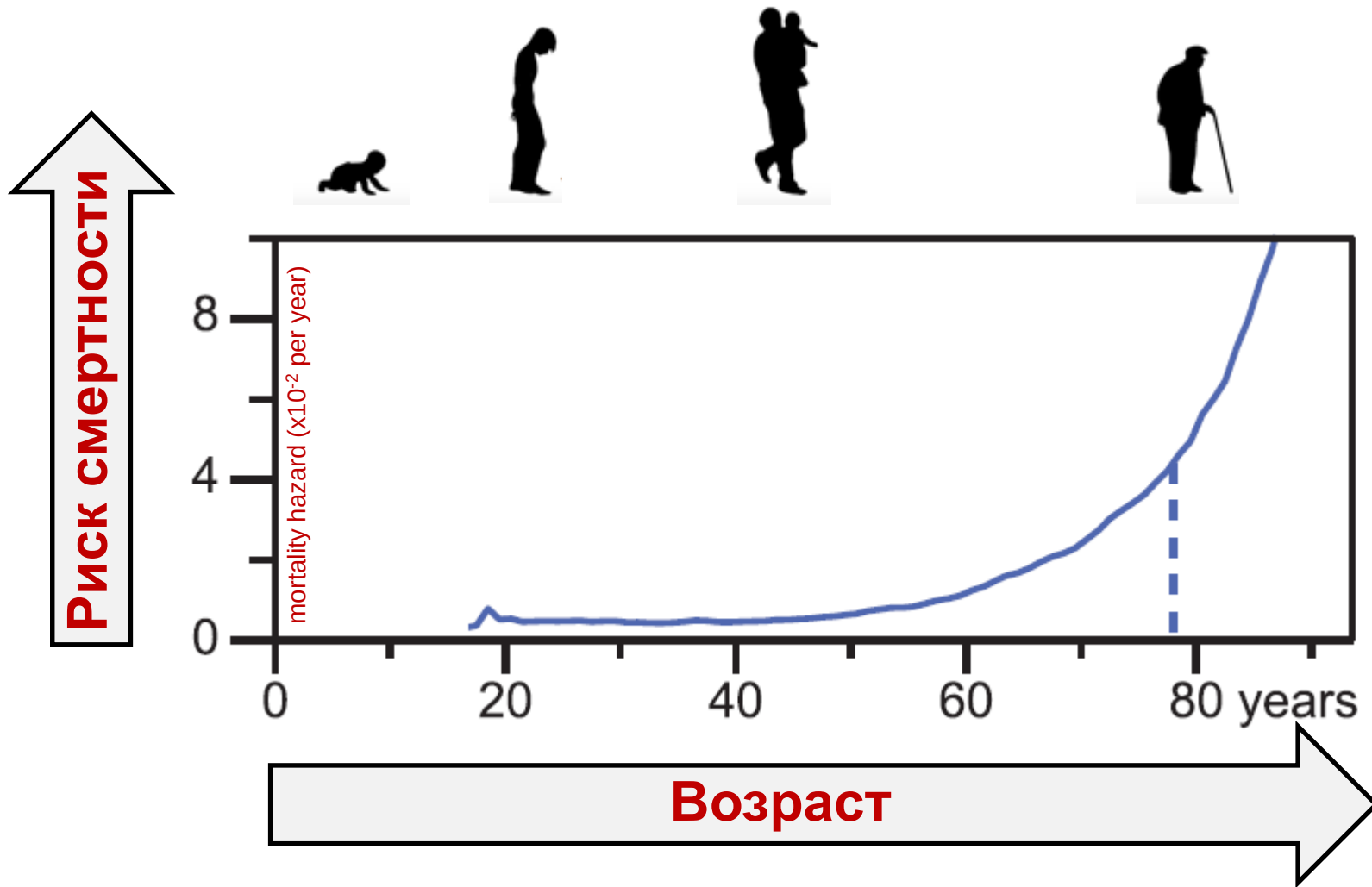
ERIBA

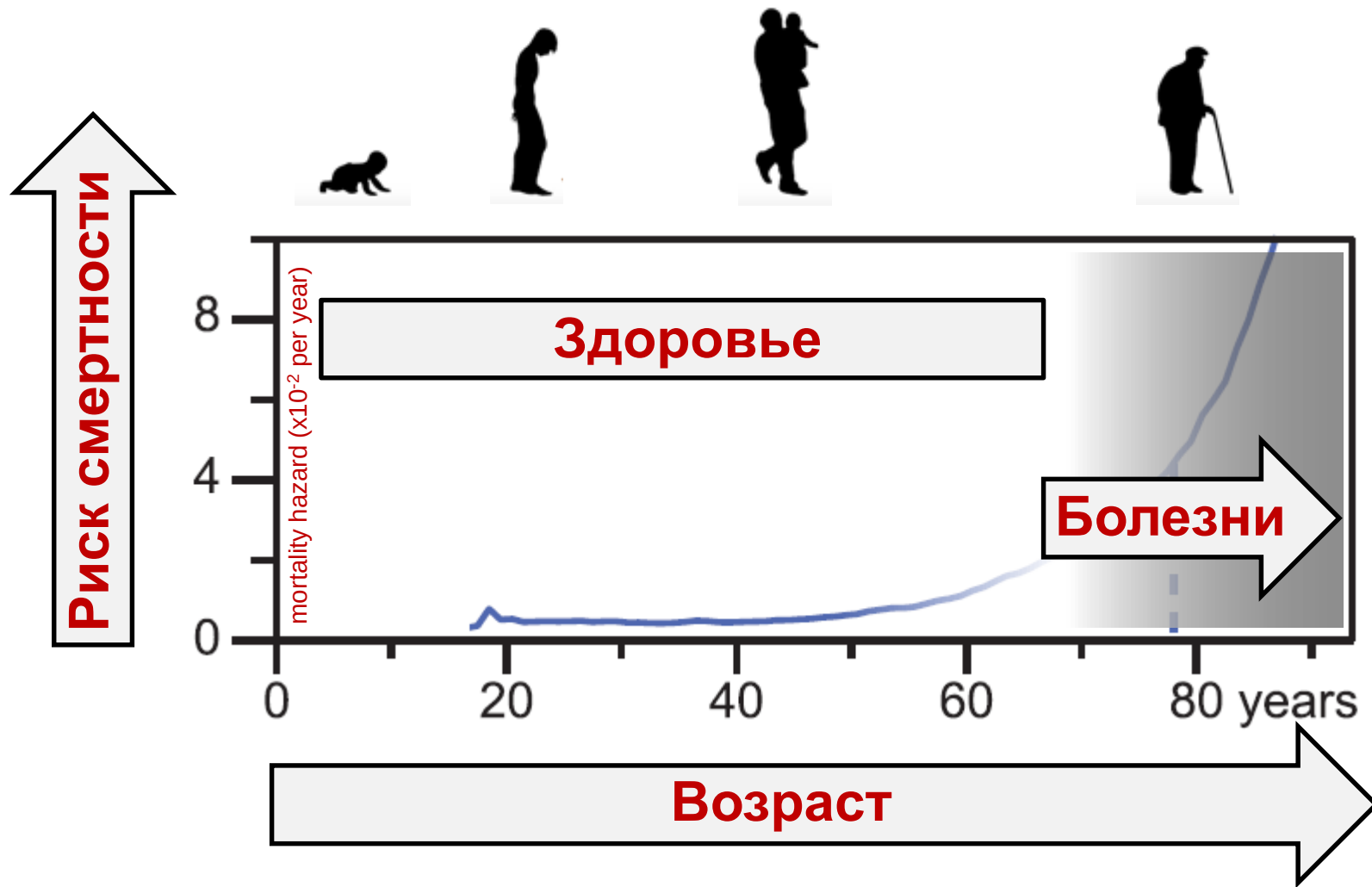
European Research Institute on the Biology of
Ageing, University Medical Center Groningen
The Netherlands

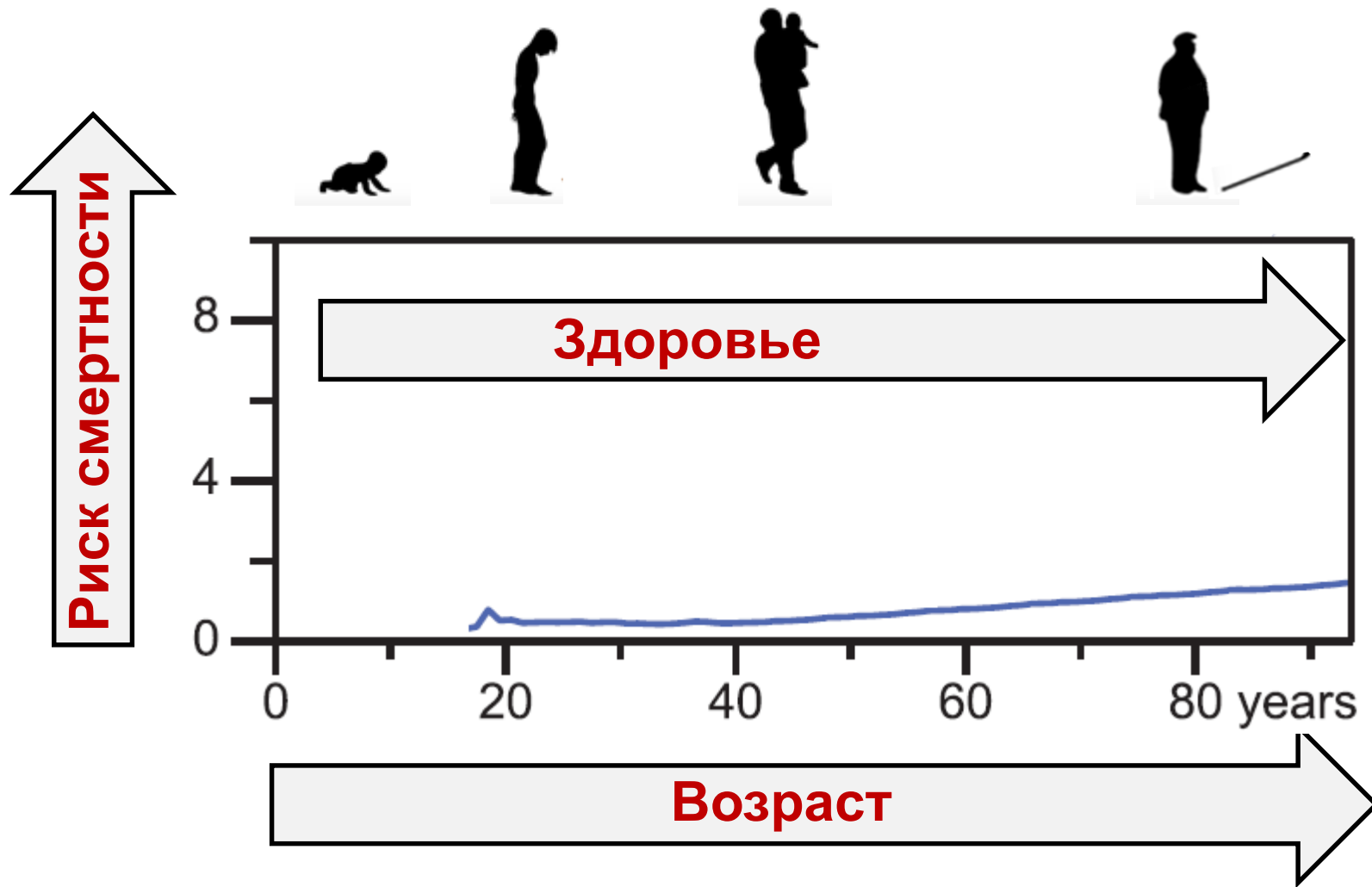


Международная исследовательская
лаборатория молекулярные механизмы
регенерации

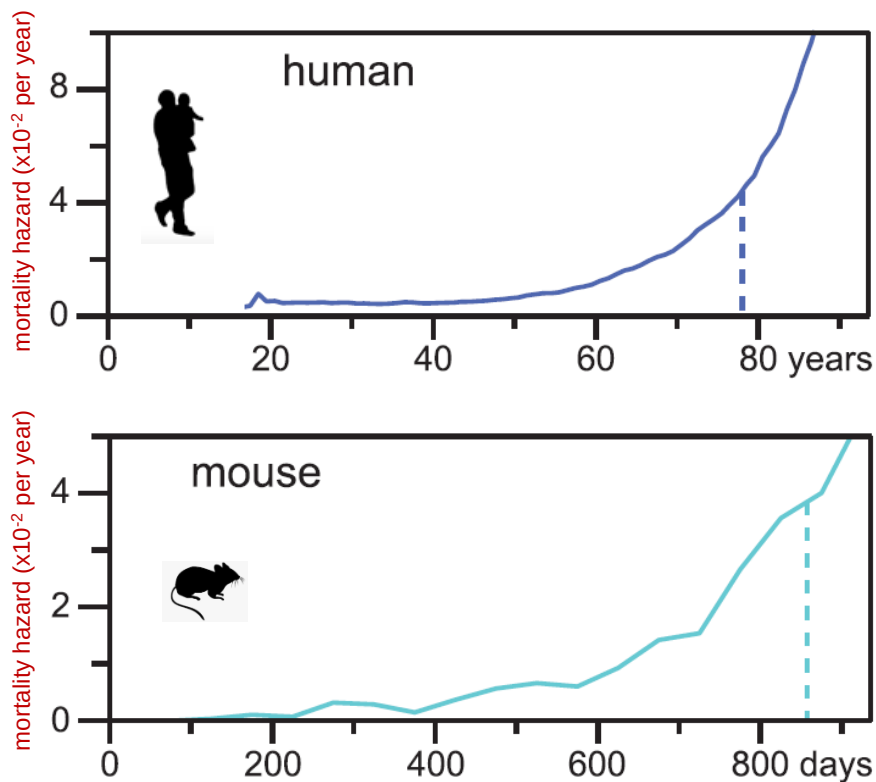
Как не стареть?







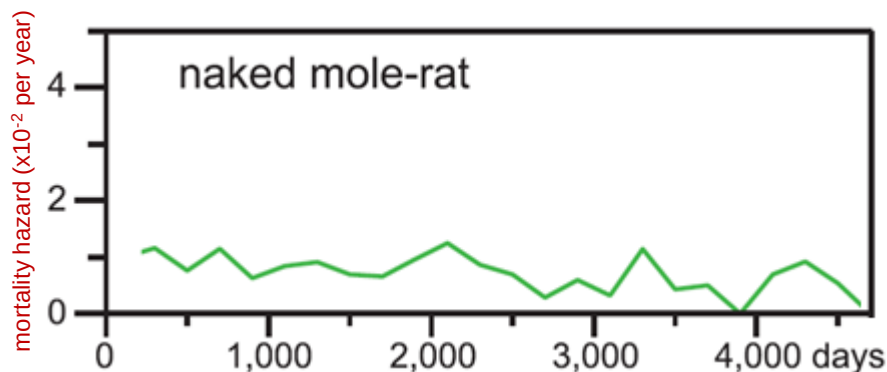
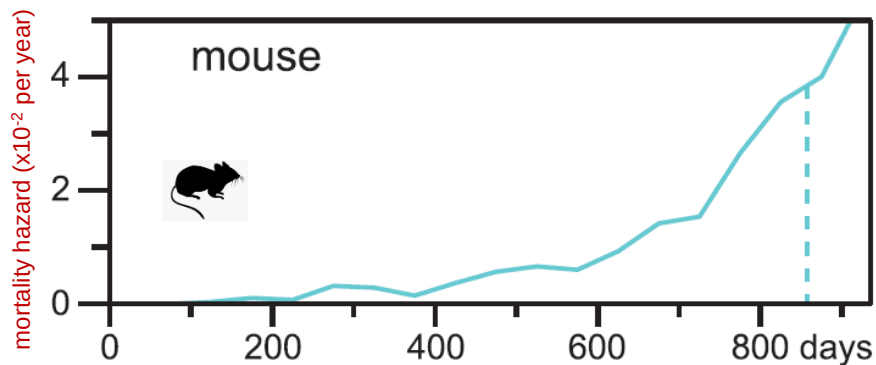
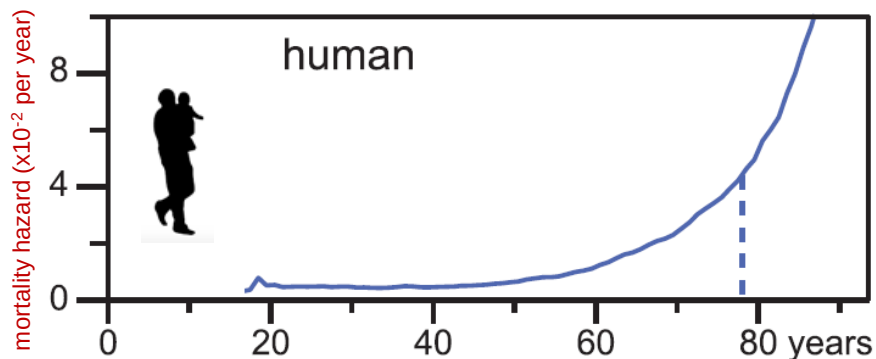
Старение неизбежно ...



Закон смертности Гомпертца:

“Риск смерти с возрастом увеличивается”

Старение неизбежно ... или нет?



Голые землекопы:

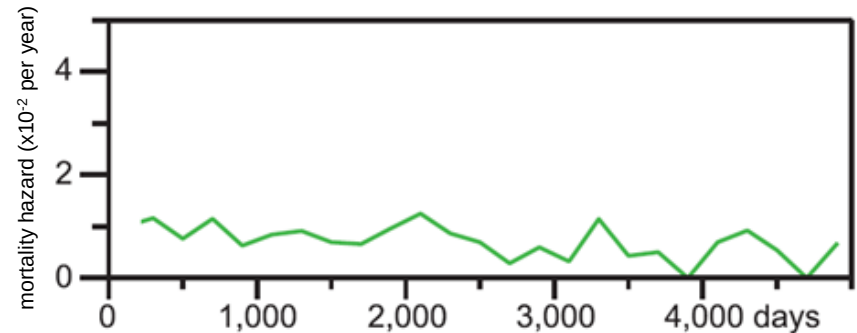
- живет больше 30 лет
- не возникает рака
- исключение из закона Гомперца: риск смерти с возрастом не увеличивается

Нарушители закона Гомперца

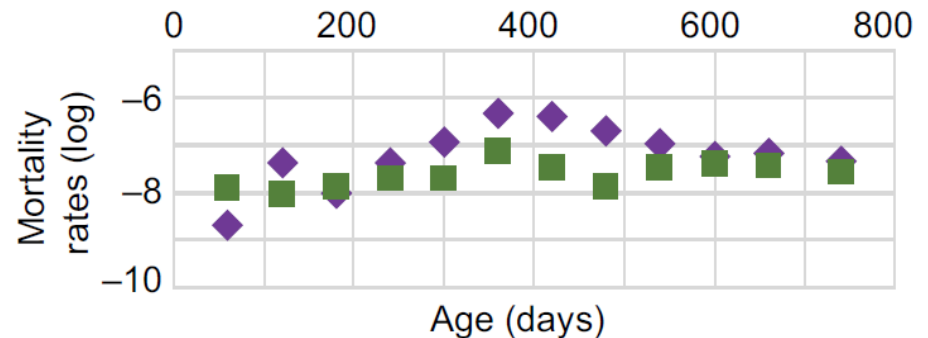


Сложная
модель
для изучения

Голый землекоп



Плоский червь *Macrostomum lignano*



Mouton et al. (2018). *Aging Cell* 17:e12739

Кто является чемпионом регенерации?

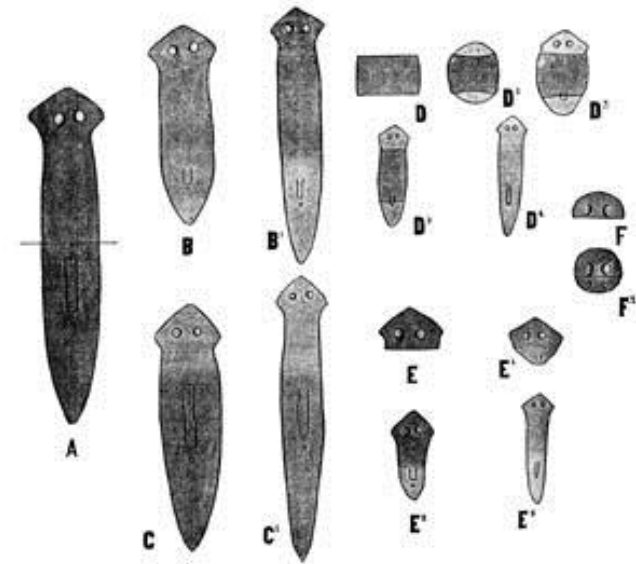


Росомаха?

Плоские черви: чемпионы регенерации

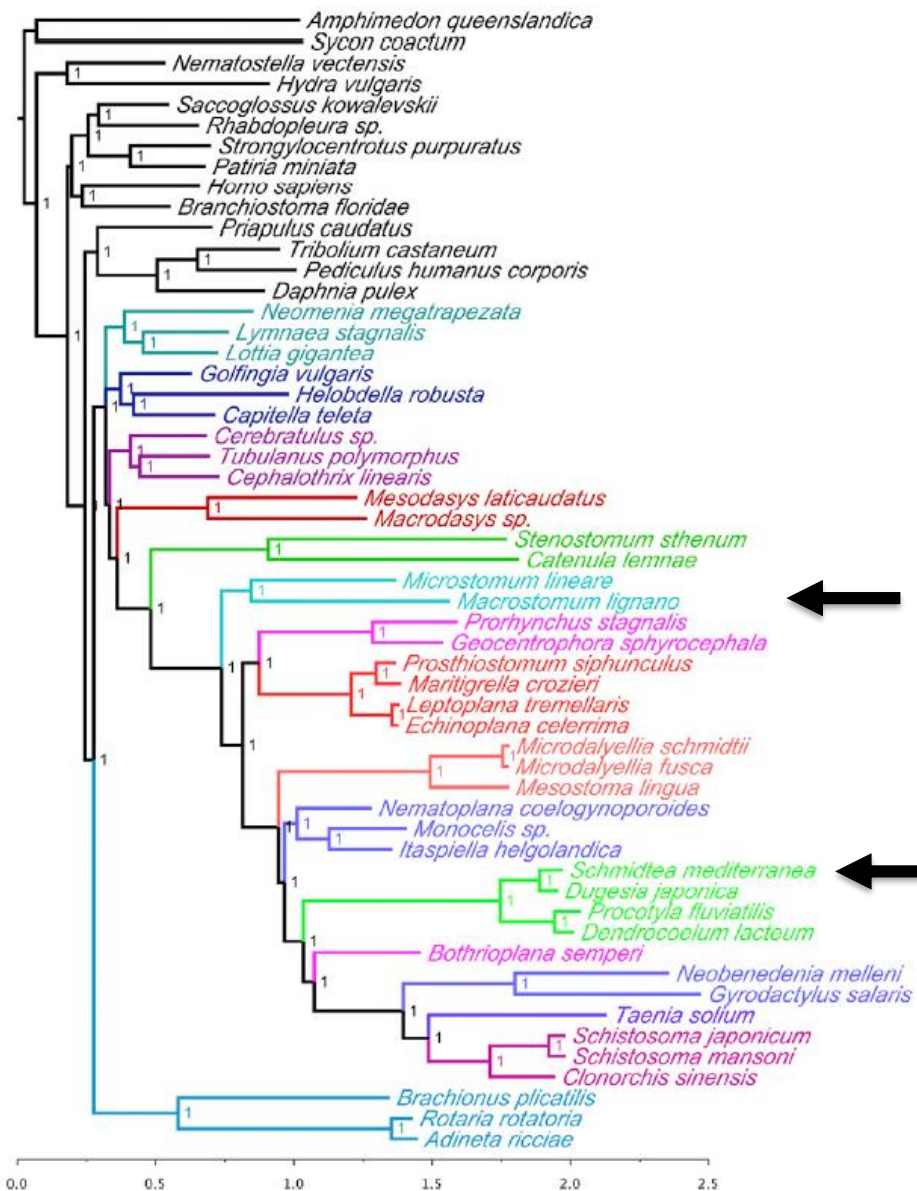


Agata, K., 2003. Curr. Opin. Genet Dev 13, 492-496.



Morgan, T. H. Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. Arch. Entwm. Org. 7, 364–397 (1898).

Разнообразие плоских червей



Egger et al. (2015) *Curr Biol.* 25:1347–1353

Porifera

Cnidaria

Deuterostomia

Ecdysozoa

Mollusca

Annelida

Nemertea

Gastrotricha

Catenulida

Macrostomorpha

Lecithoepitheliata

Polycladida

Rhabdocoela

Proseriata

Tricladida

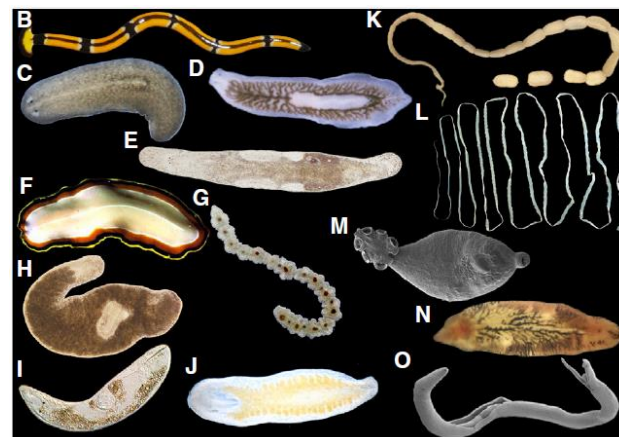
Bothrioplanida

Monogenea

Cestoda

Trematoda

Rotifera



Макростомиды



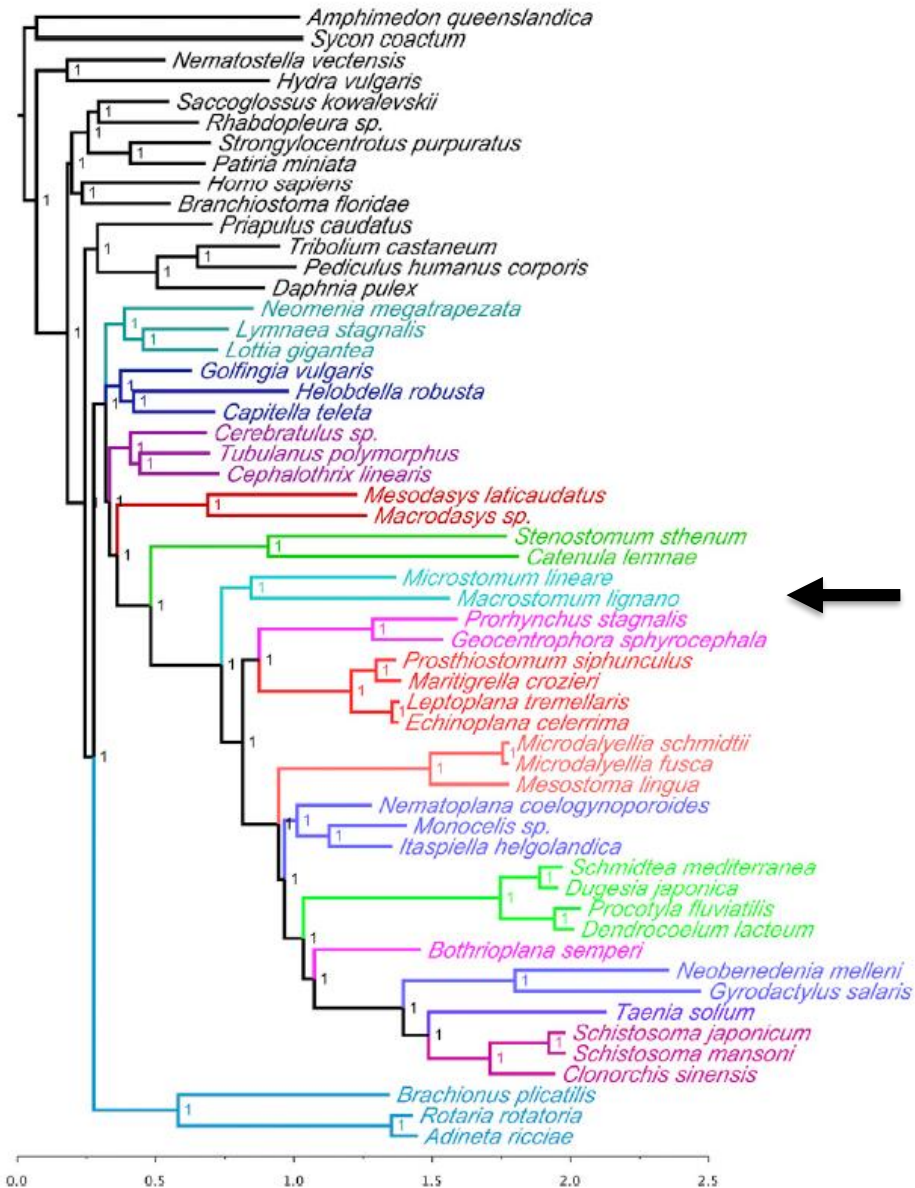
Планарии



Platyhelminthes

Collins JJ 3rd. (2017) *Curr Biol.* 27:R252-R256

Macrostomum lignano



Porifera

Cnidaria

Deuterostomia

Ecdysozoa

Mollusca

Annelida

Nemertea

Gastrotricha

Catenulida

Macrostomorpha

Lecithoepitheliata

Polycladida

Rhabdocoela

Proseriata

Tricladida

Bothrioplanida

Monogenea

Cestoda

Trematoda

Rotifera

Макростомиды



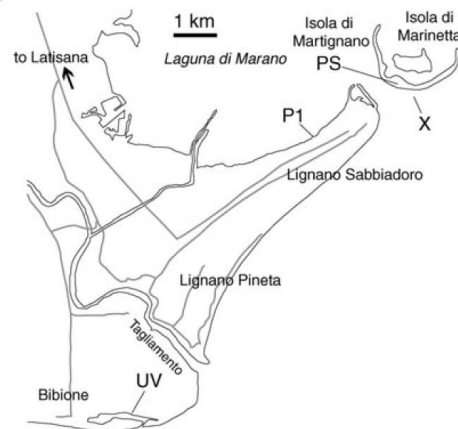
Ранняя ветвь
плоских червей

M. lignano:
1997 – открыт
2002 – описан

Platyhelminthes

Среда обитания *M. lignano*

Lignano Sabbiadoro



Чем интересен *Macrostomum lignano*?

- Маленький по размеру (~1 мм)
- Прозрачный, с выраженной морфологией
- Облигатный перекрестный гермафродит
- Короткое время генерации (20 дней)
- Прост в содержании

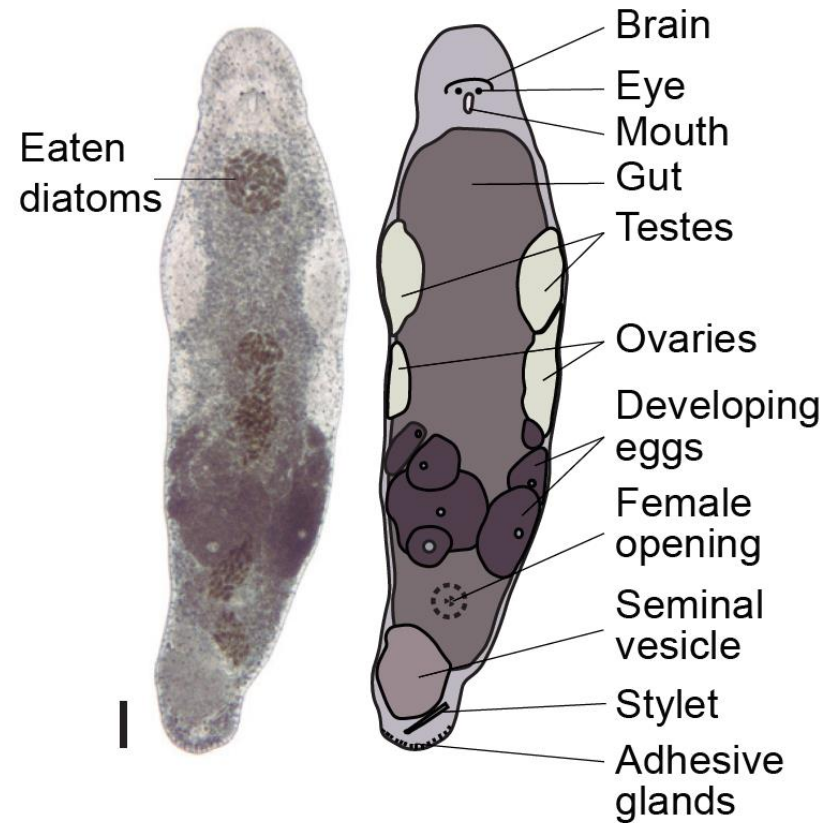
Высокая регенеративная способность



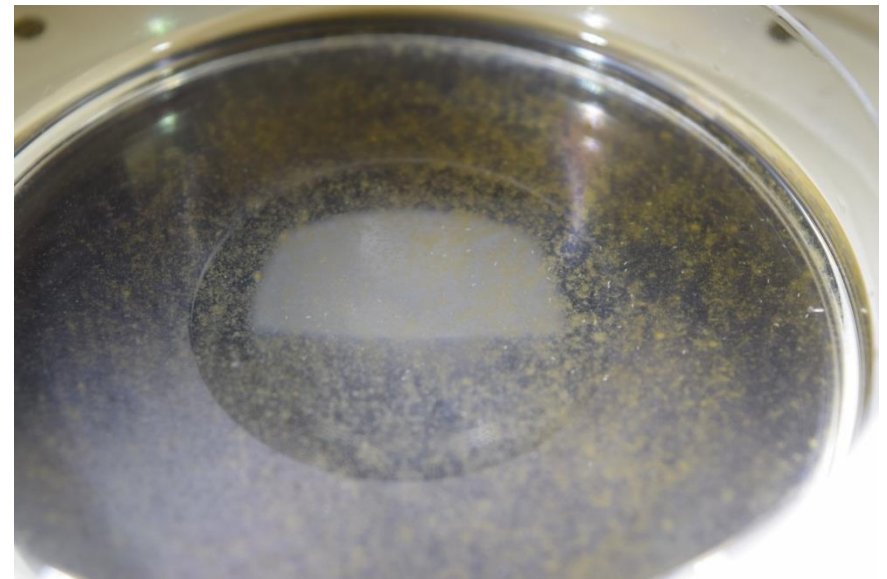
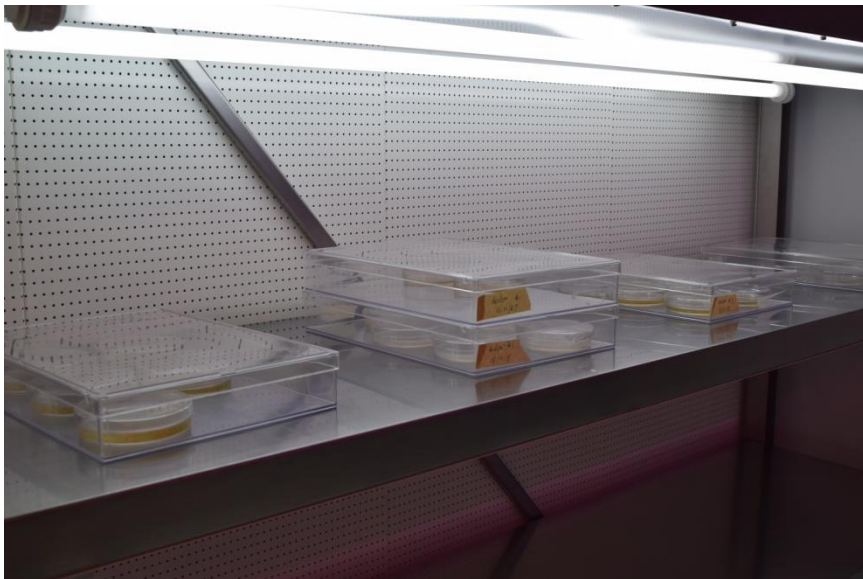
Стволовые клетки
(необласты)



Модель для изучения стволовых клеток

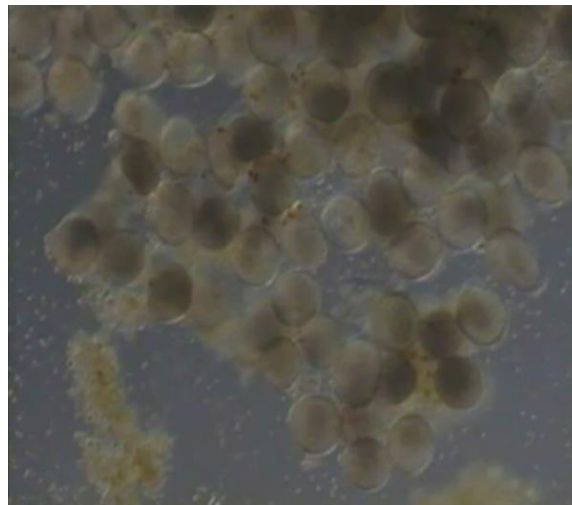
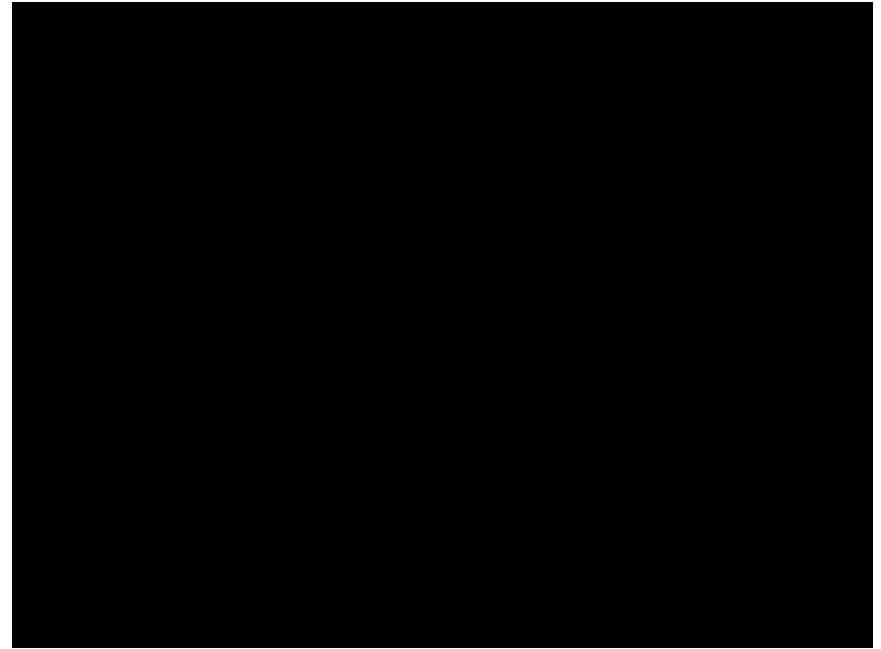


Лабораторная культура *M. lignano*



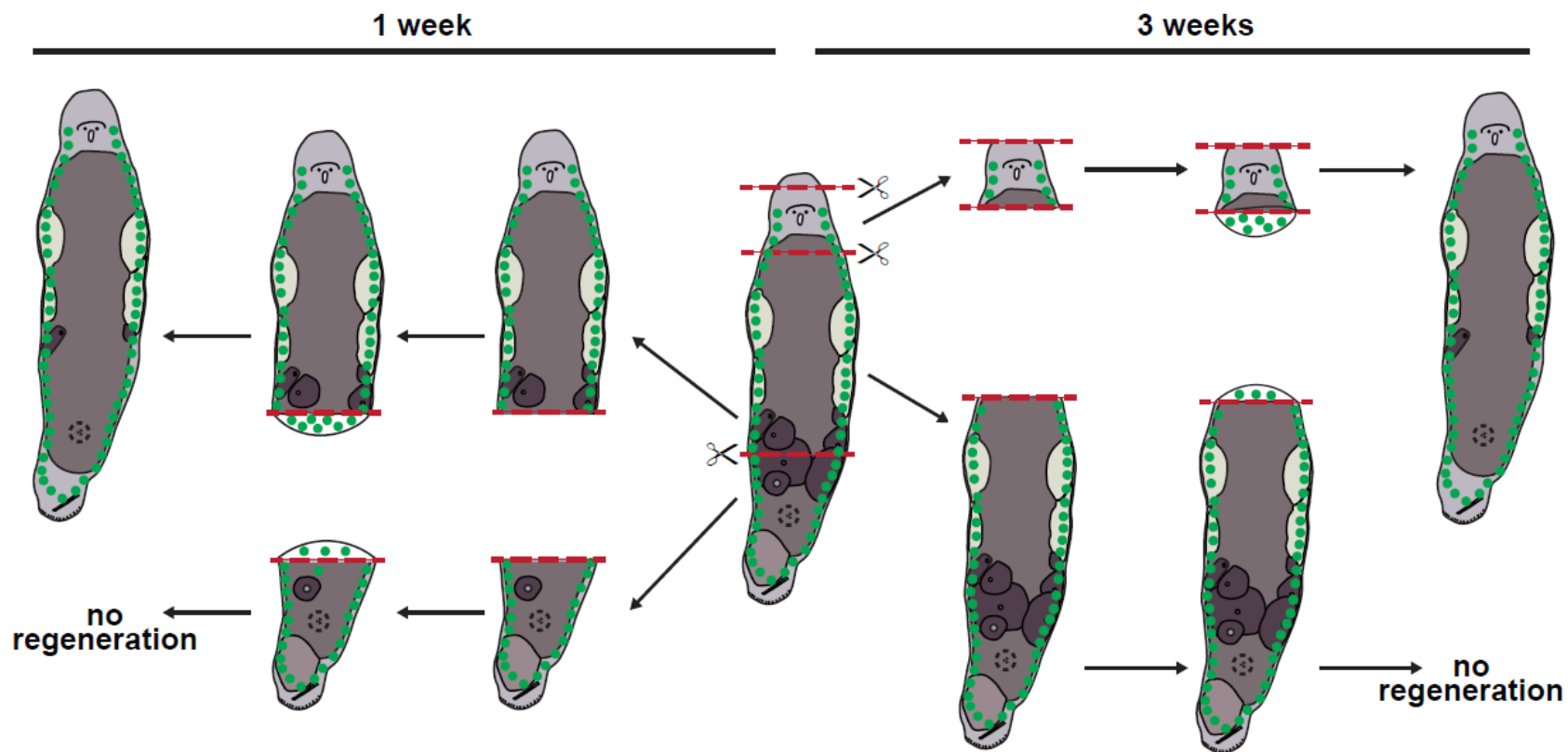
M. lignano

Негативный фототаксис

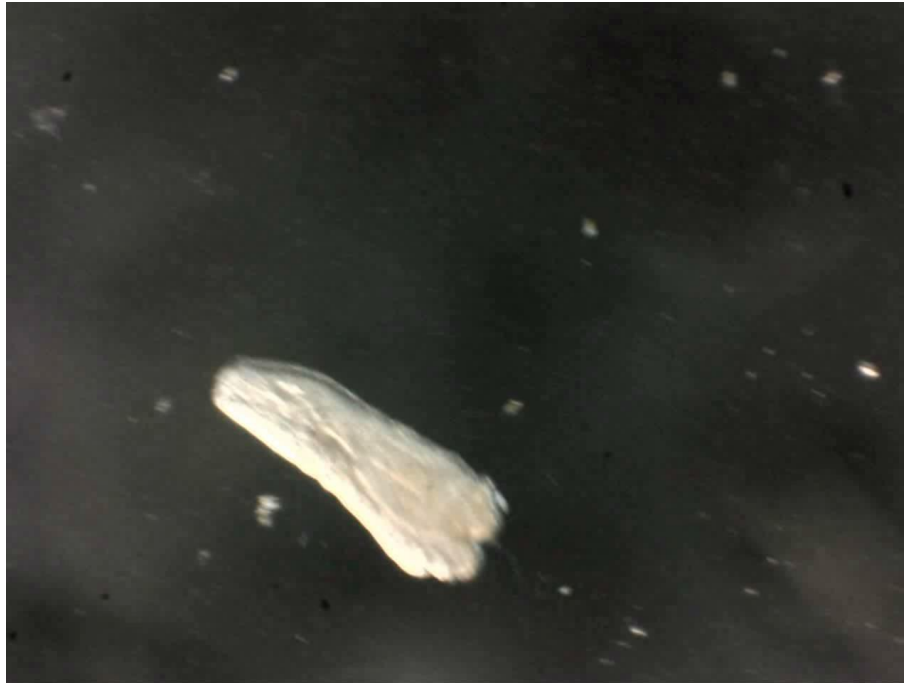


Кладка яиц

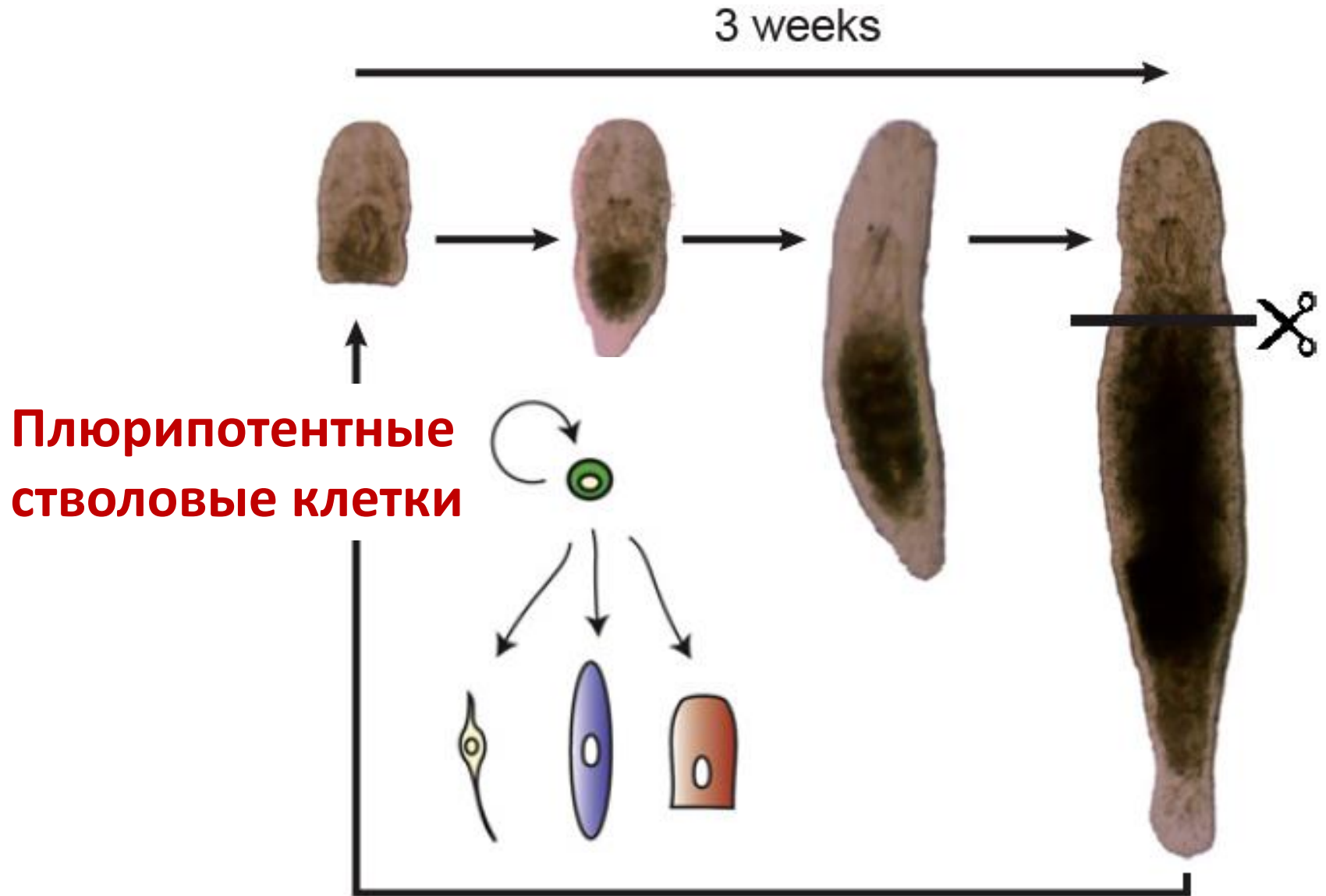
Регенерация у *M. lignano*



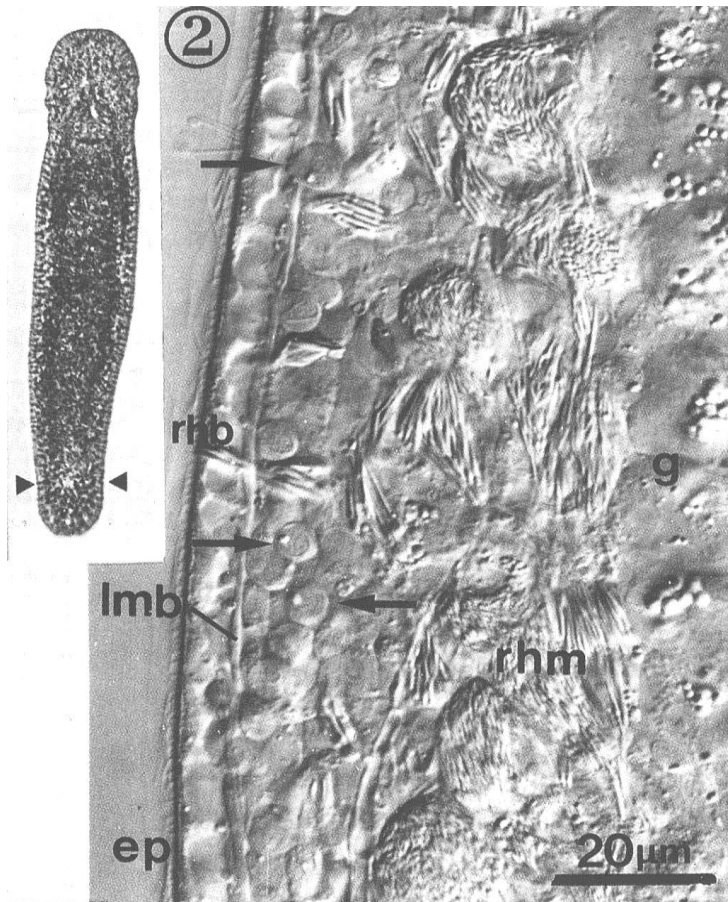
Регенерация у *M. lignano*



Регенерация у *M. lignano*

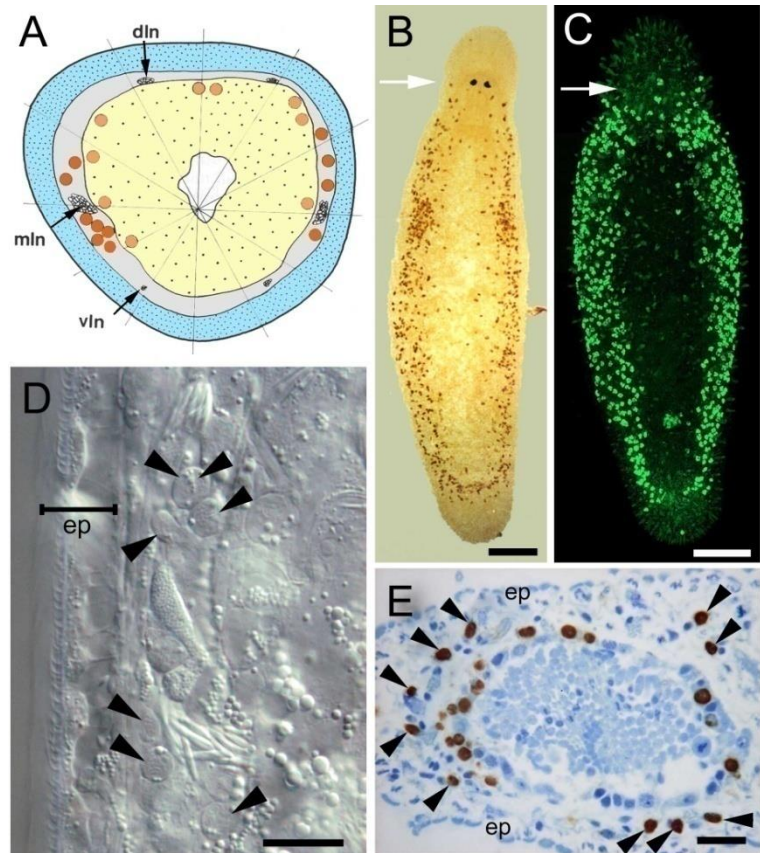


Стволовые клетки: необласты



from Rieger et al. 1999

~25.000 cells	100%
~1.600 neoblasts	6.4%
~400 in S-phase	1,6% (25%)
~25 in Mitosis	0,1%



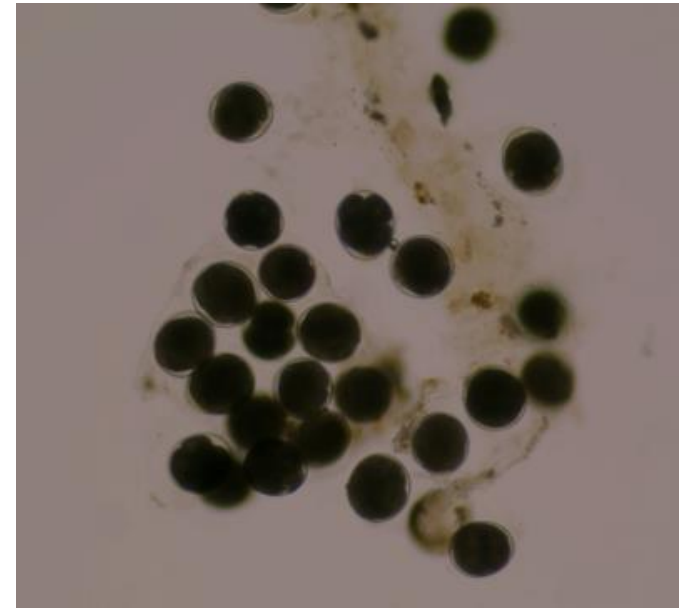
Rieger et al., Invertebr. Reprod. Dev., 1999 (A)
 Bode et al., Cell Tissue Res, 2006 (B)
 Ladurner et al. Dev. Biol. 2000 (C)
 Willi Salvenmoser (E)

Чем интересен *Macrostomum lignano*?

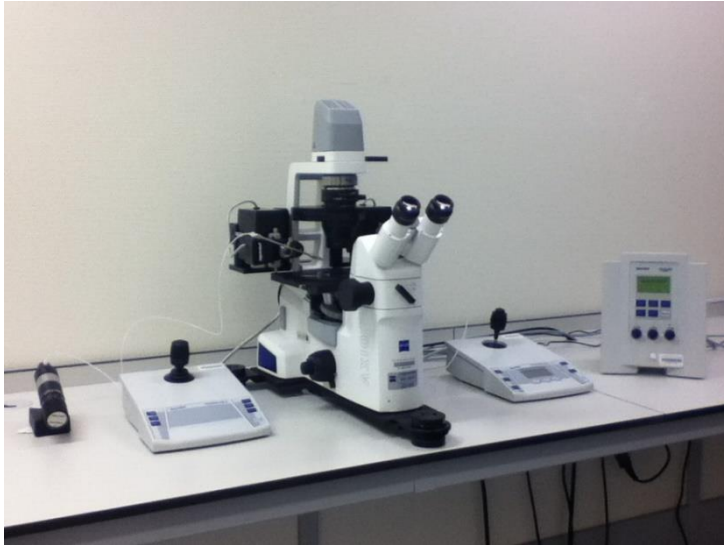
- Маленький по размеру (~1 мм)
- Прозрачный, с выраженной морфологией
- Облигатный перекрестный гермафродит
- Короткое время генерации (20 дней)
- Прост в содержании
- **Регулярно откладывает много яиц**



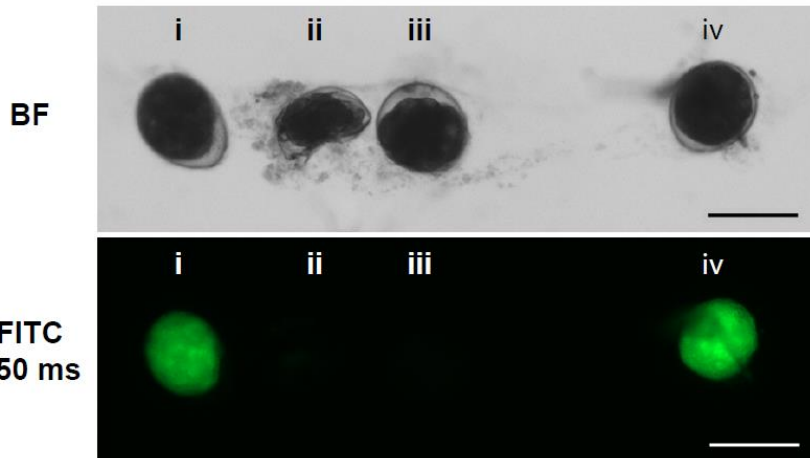
трансгенез



Микроинъекция эмбрионов *M. lignano*



микроинъекция мРНК GFP

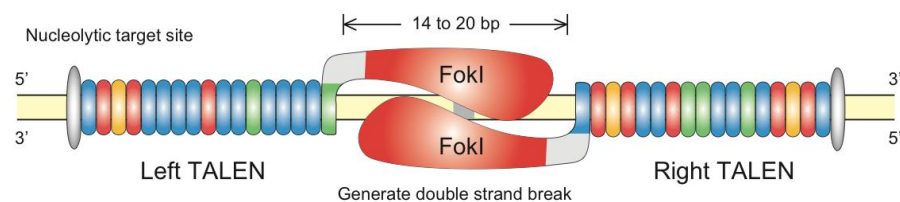
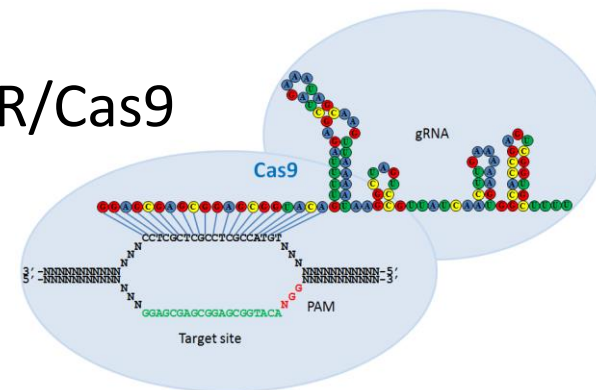


Трансгенез в *M. lignans*



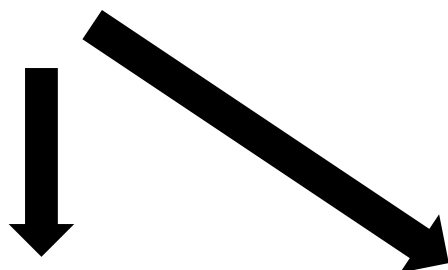
CRISPR/Cas9

Направленный



TALENs

Ненаправленный

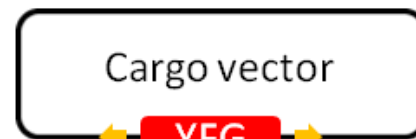


Произвольная интеграция

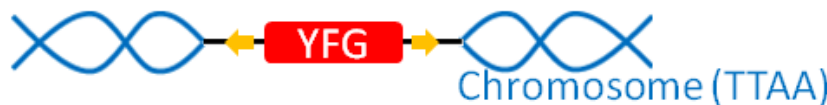
YFG



Транспозонная интеграция

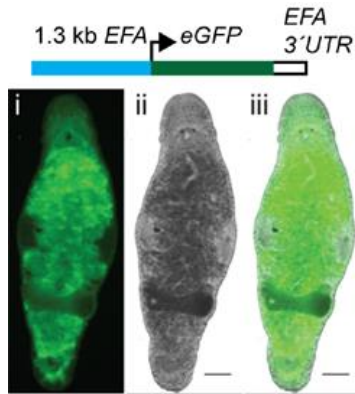


+ PiggyBac transposase

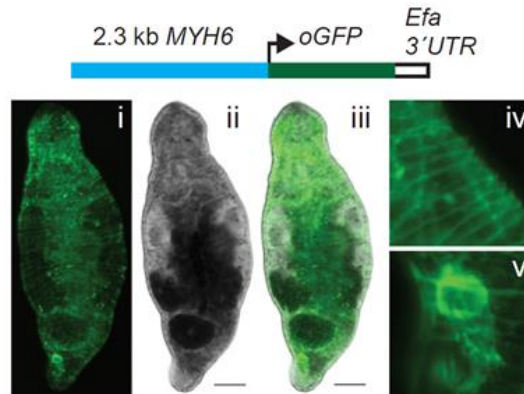


Трансгенные линии *M. lignano*

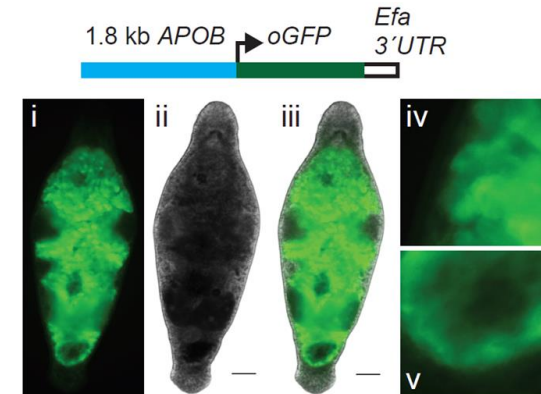
Ubiquitous



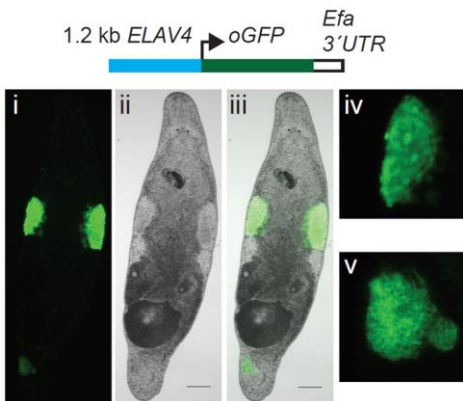
Muscle



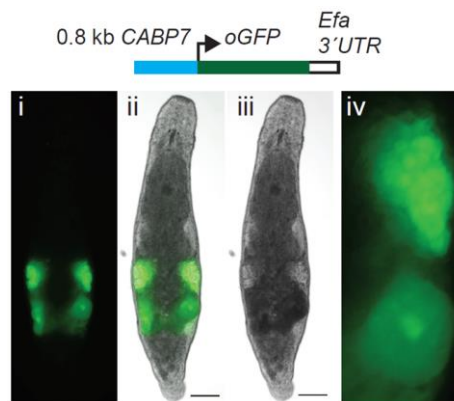
Gut



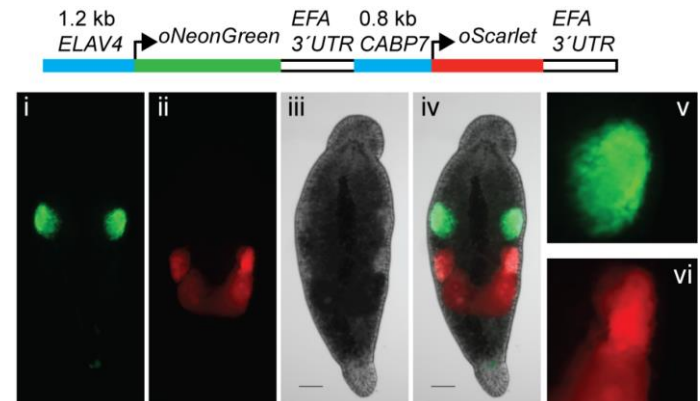
Testes



Ovaries



Testes + Ovaries

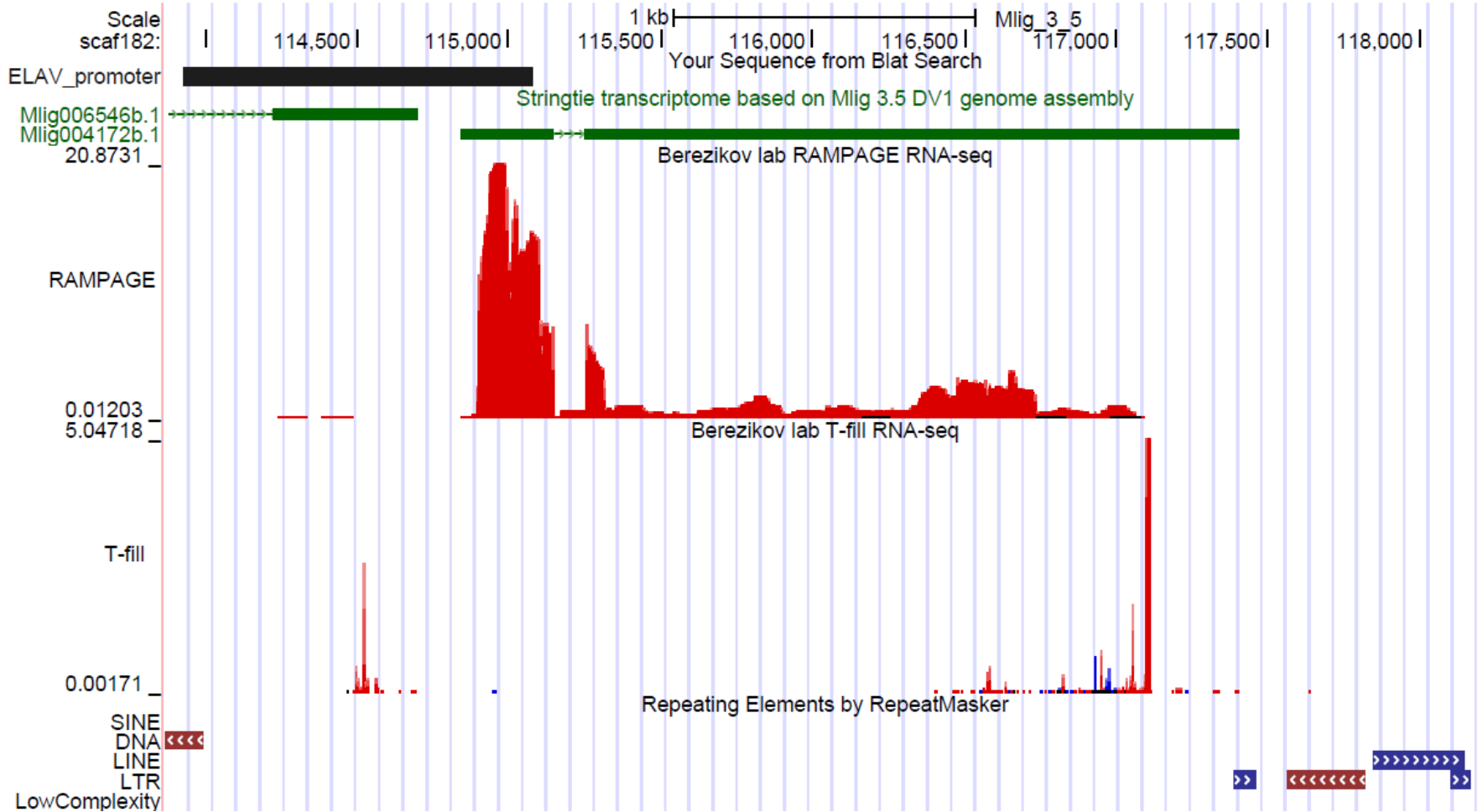


Секвенирование и сборка геном *M. lignano*

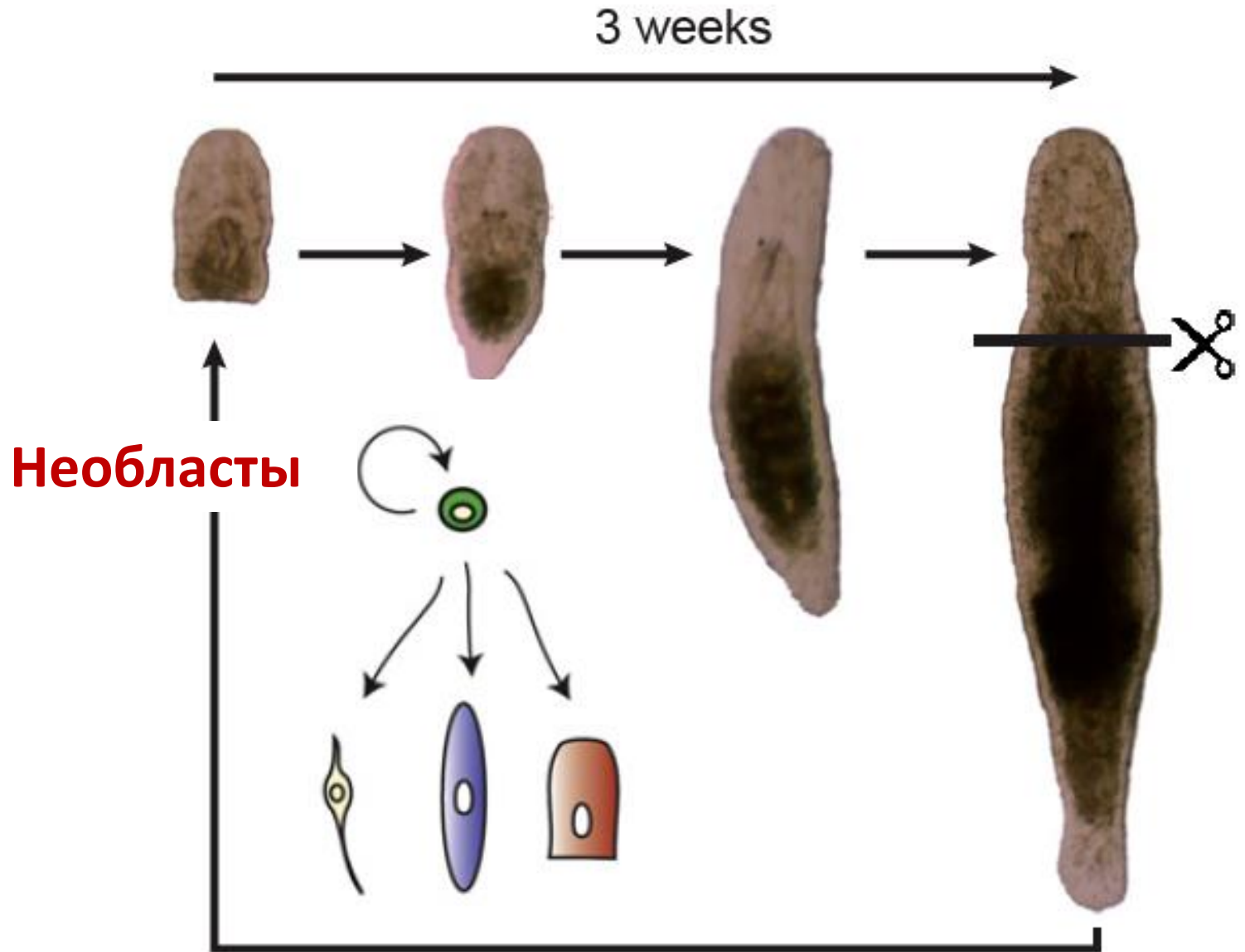
Источник: инбредная линия DV1 (Dita Vizoso & Lukas Schärer)

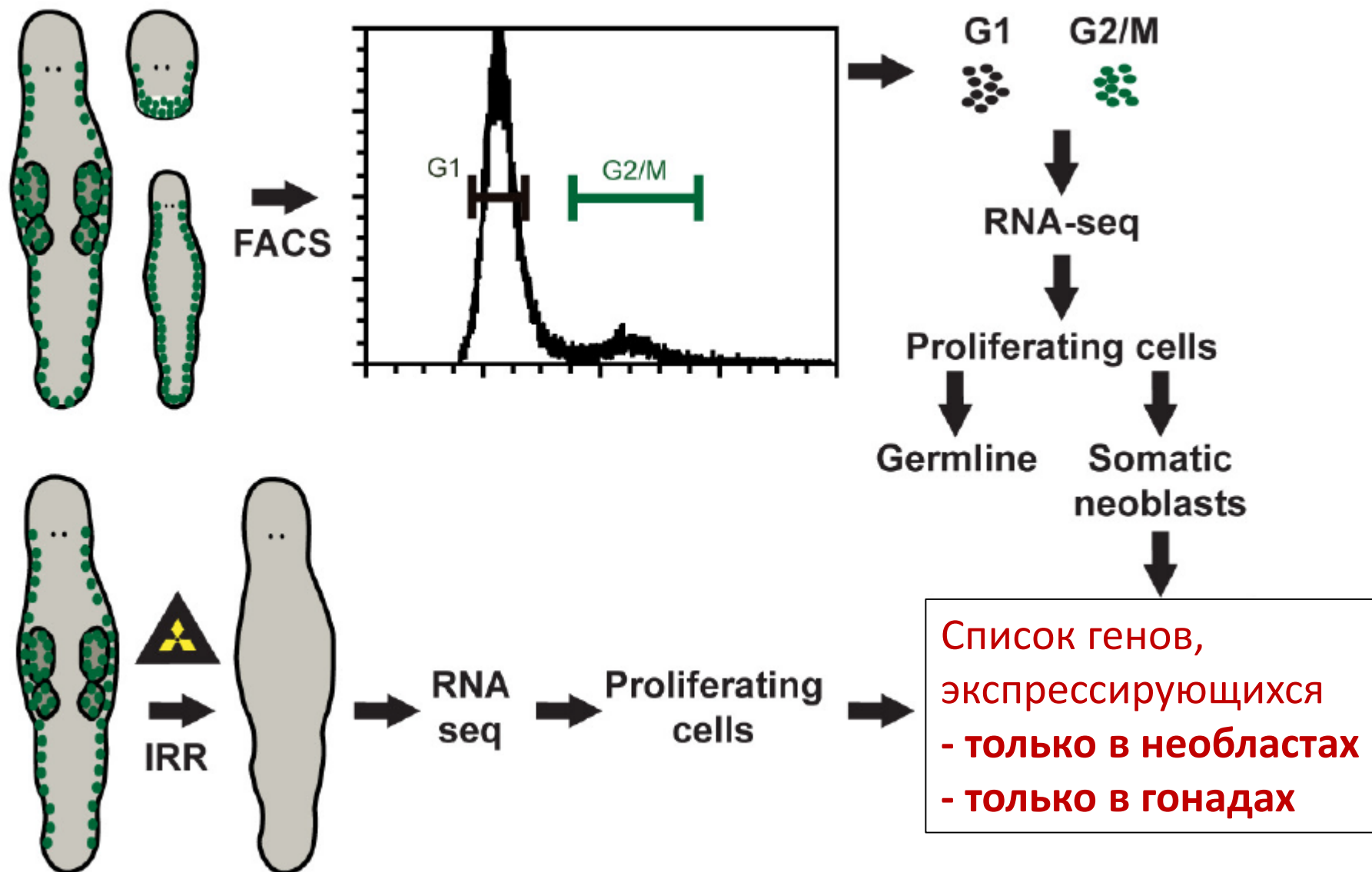
REAPR parameter	ML2	Mlig_3_7
Total length	1,040,124,789	764,424,962
Number of sequences	49,174	5,270
N50	36,723	245,921
Number of gaps	0	710
Total gap length	0	1,581,471
Error free bases	31.92%	63.95%
FCD errors within a contig	1,871	872
FCD errors over a gap	0	159
Low fragment coverage within a contig	323	136
Low fragment coverage over a gap	0	171

Геном *M. lignano*

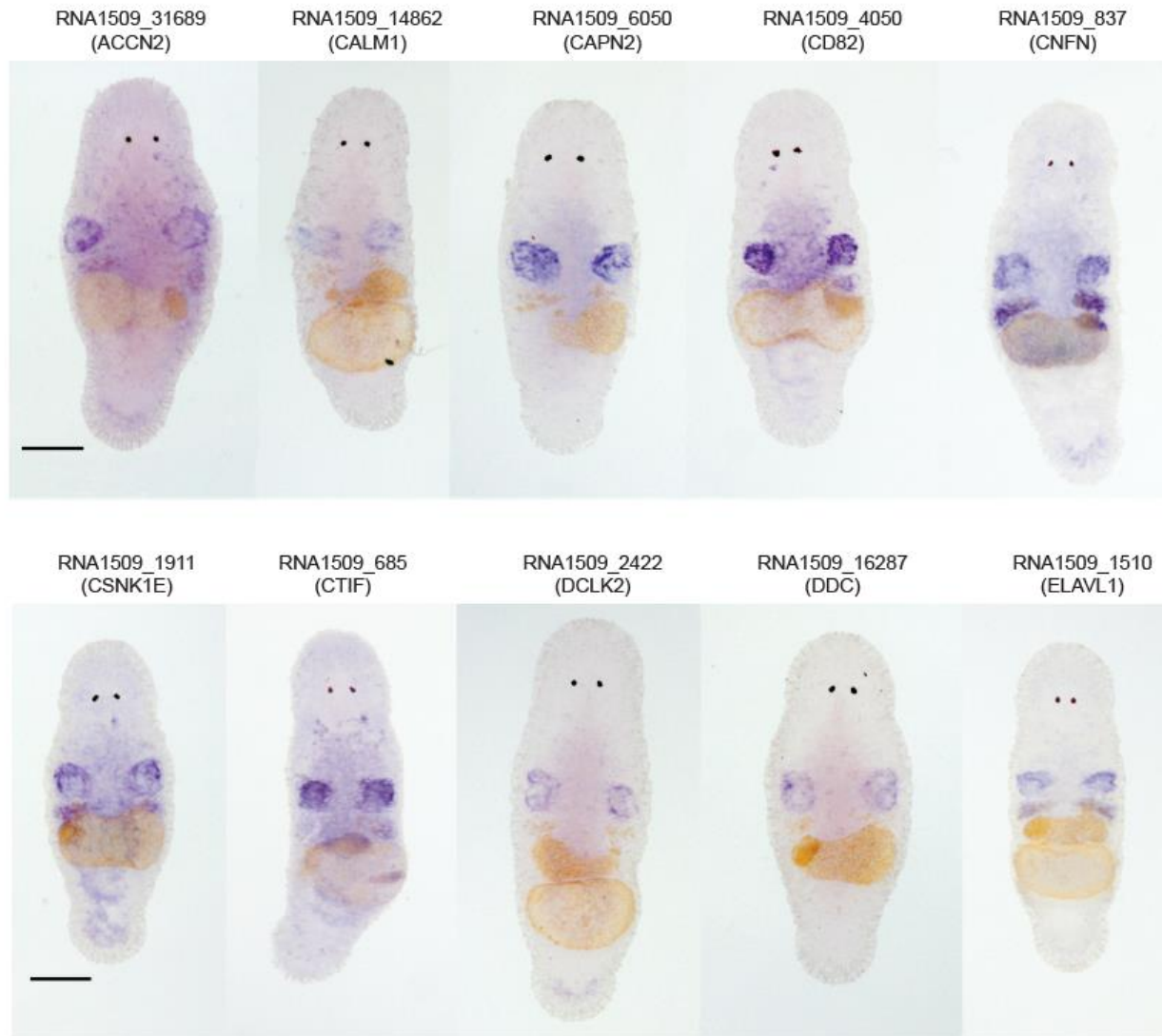


Необходимость изучения необластов





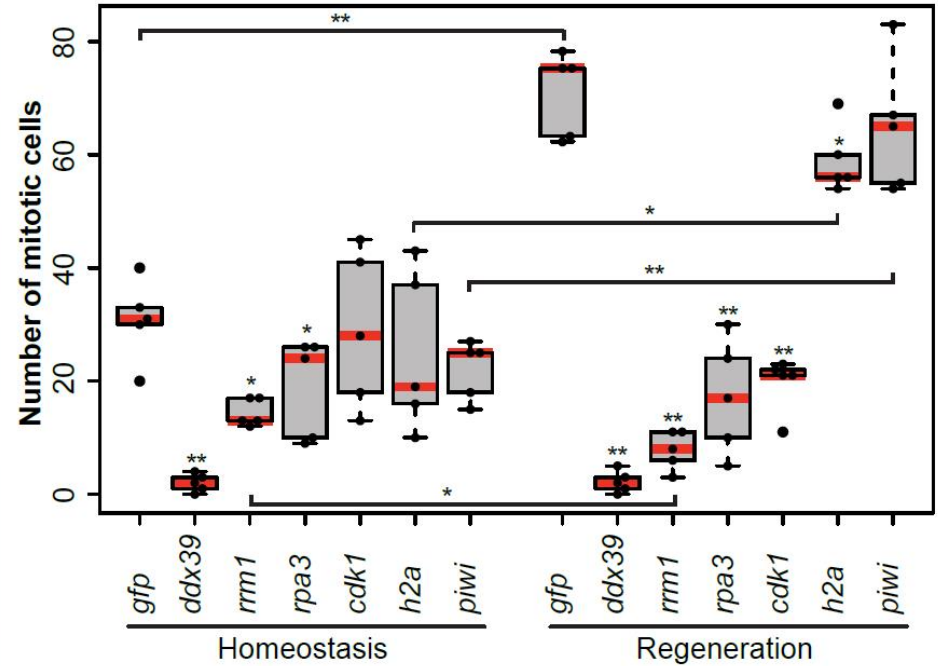
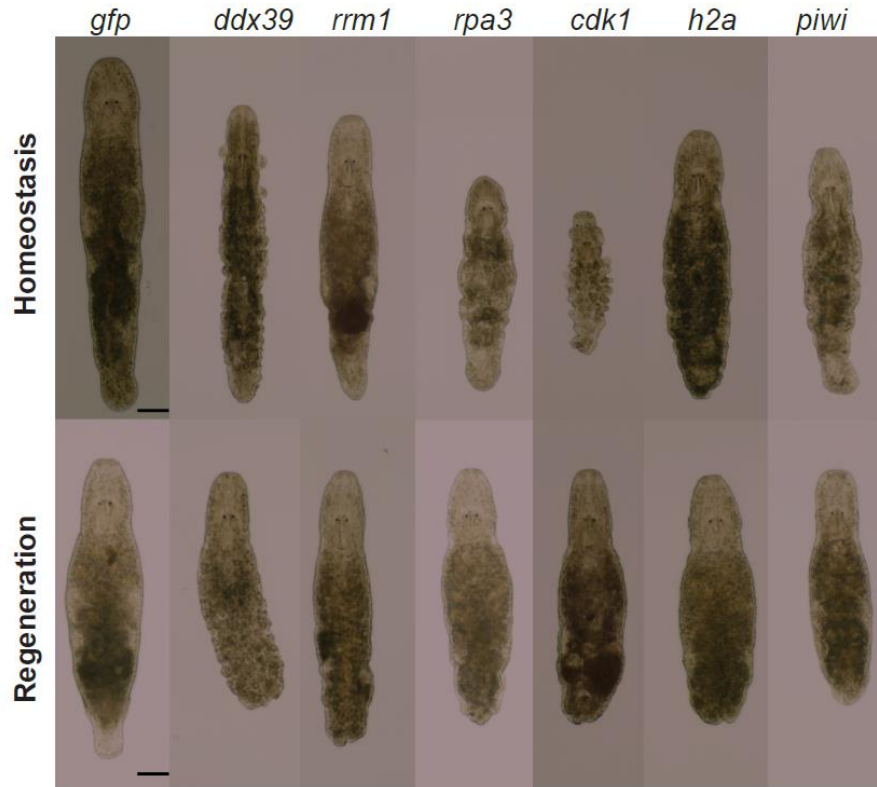
Верификация генов гонад



Экспрессия в гонадах: 27 из 27 протестированных

Grudniewska et al.(2016) *eLife* 5:e20607.

Нокдаун генов-кандидатов соматических неопластов



Доступ к данным экспрессии генов в *M. lignano*

M. lignano Neoblast Screen
2016

Transcriptional signatures of somatic neoblasts and germline cells in *Macrostomum lignano*.
(2016) Grudniewska M*, Mouton S*, Simanov S, Beltman F, Grelling M, de Mulder K, Arindrarto W,
Weissert P, van der Elst S, Berezikov E. *eLife*. In press.

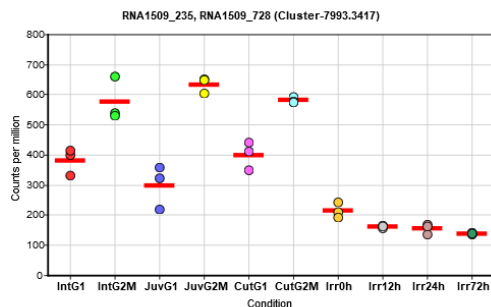
Home

Download

Text search

Transcript ID, gene name, etc.

☐ Exact search

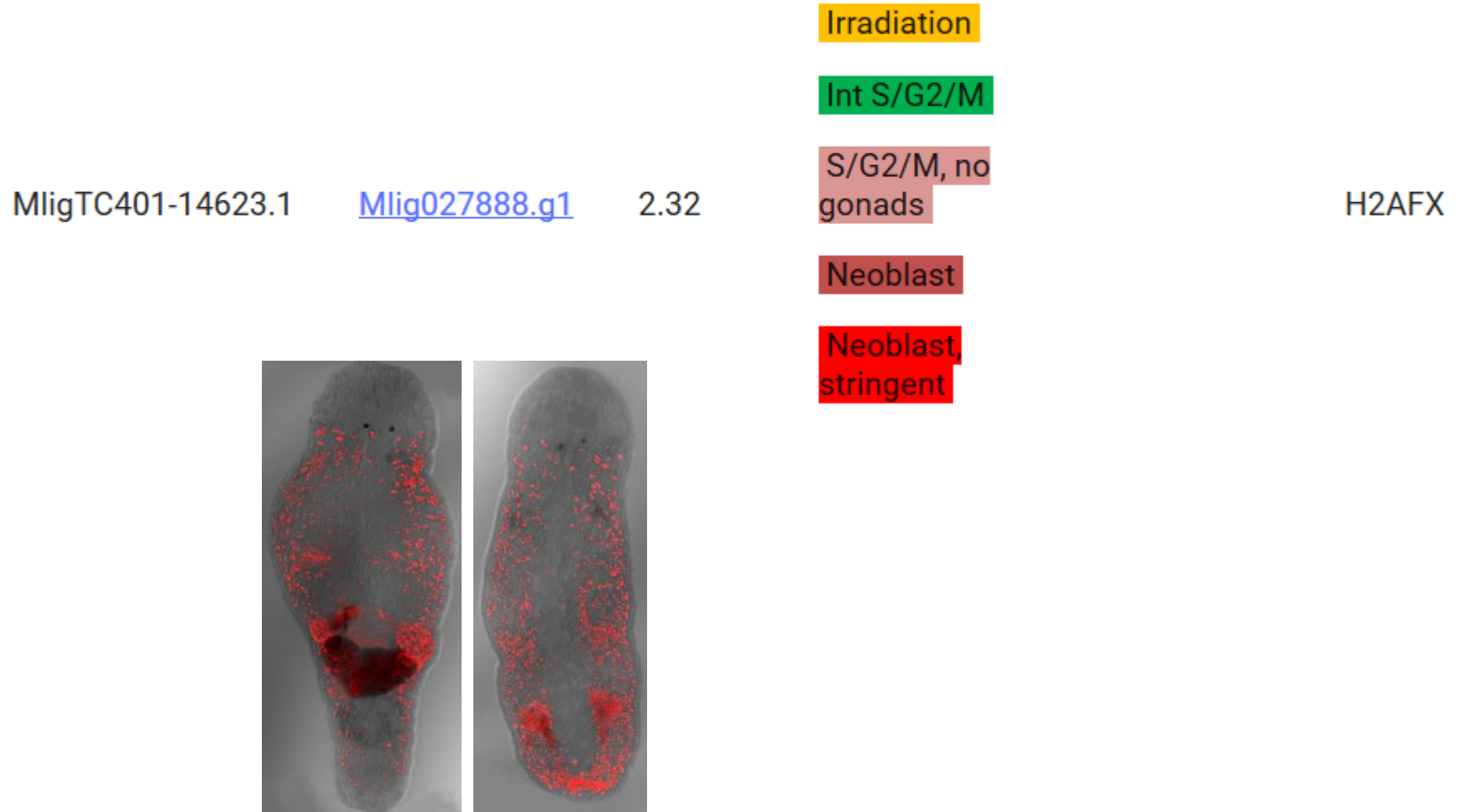


Found 357 results for class "Neoblast, stringent". Showing entries 1-20.

Graph	Cluster	Transcripts	Mean logCPM	Classification	Smed/Human type	Human gene	Annotation
☒	1.	Cluster-7993.3417	8.27	Irradiation Int S/G2/M S/G2/M, no gonads Neoblast Neoblast, stringent	Pluripotency maintenance	PPIF	RNA1509_235 {Length: 1100, Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase RepID=Q93W25_WHEAT [Source:FlyBase gene name: PPIF] {Human: PPIF} {Symbol:Acc:92591, e=6e-6} RNA1509_728 {Length: 1100, Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase RepID=Q93W25_WHEAT [Source:FlyBase gene name: PPIF] {Human: PPIF} {Symbol:Acc:92591, e=9e-6} RNA1509_198 {Length: 490, Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase RepID=Q93W25_WHEAT [Source:FlyBase gene name: PPIF] {Human: PPIF} {Symbol:Acc:92591, e=2e-1}

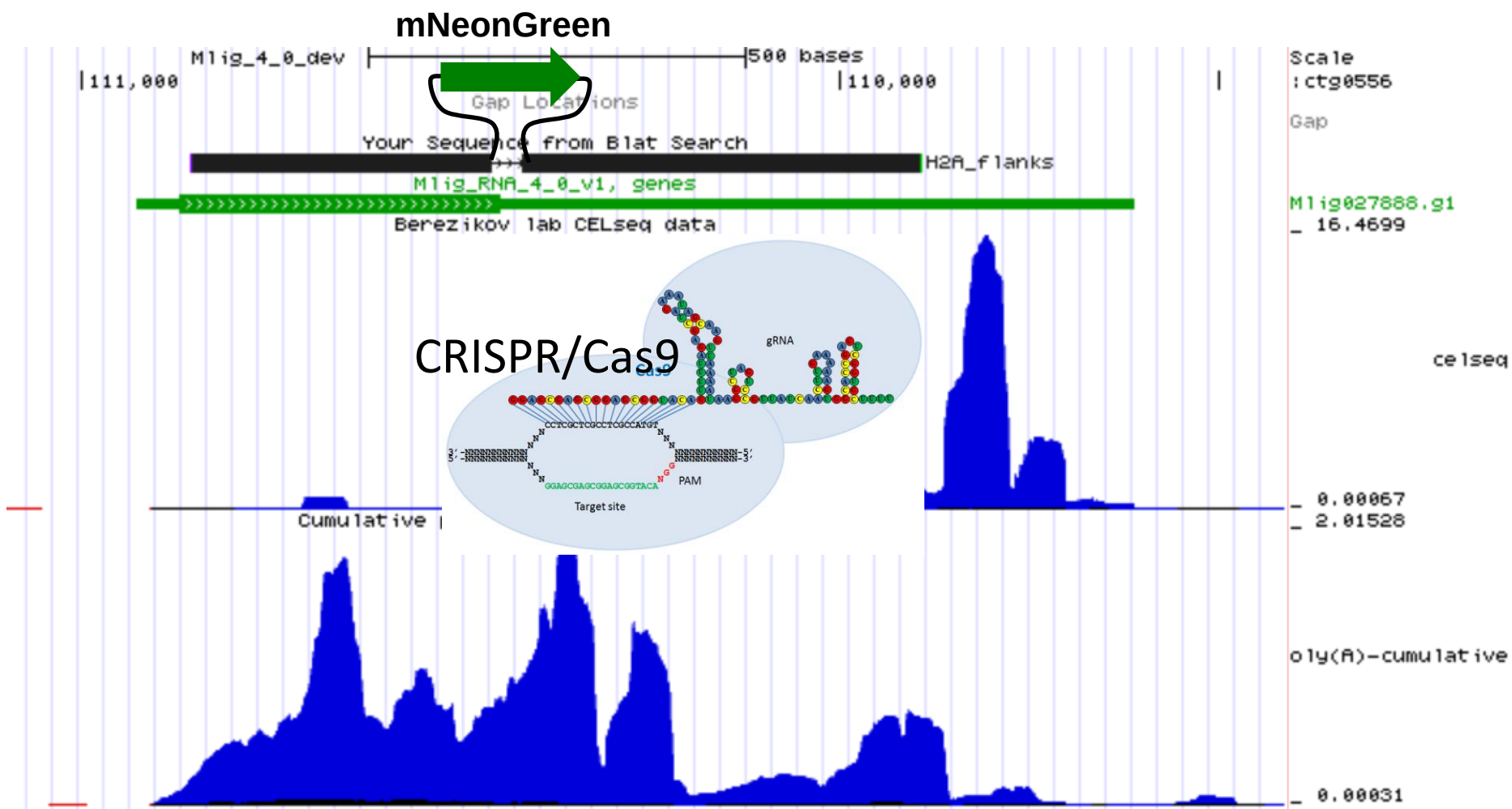
<http://neoblast.macgenome.org>

Необласт-специфичные трансгенные линии

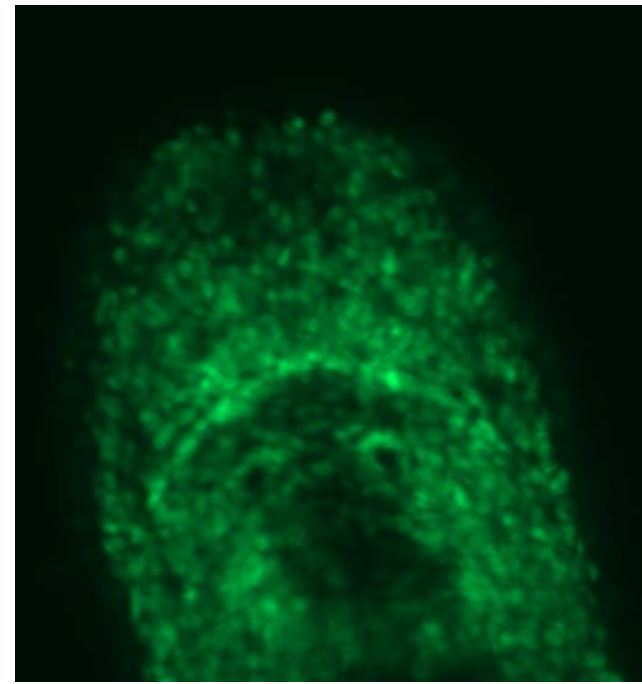
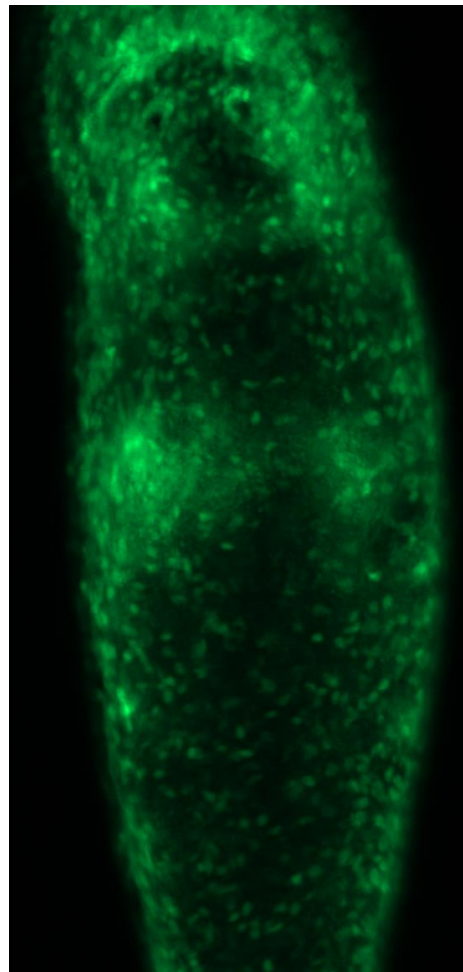
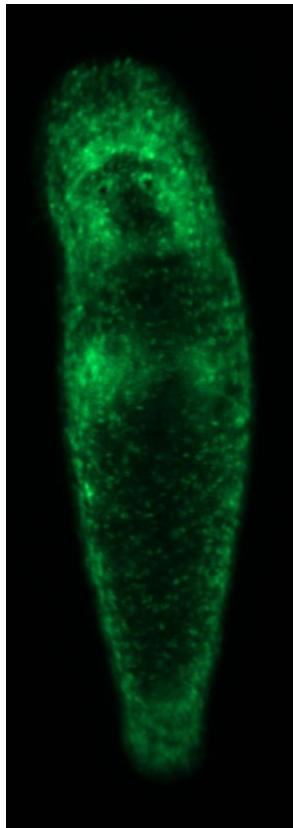


H2A.X *in situ* паттерн экспрессии

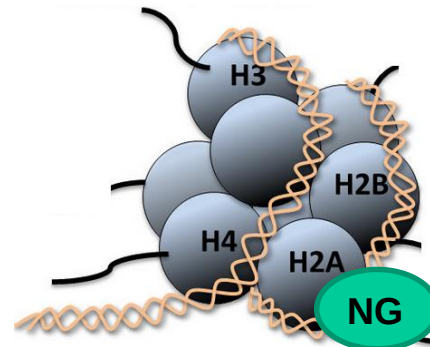
Нокин в ген *H2A.X* посредством CRISPR/Cas9



Линия KING (Knock-In of NeonGreen)

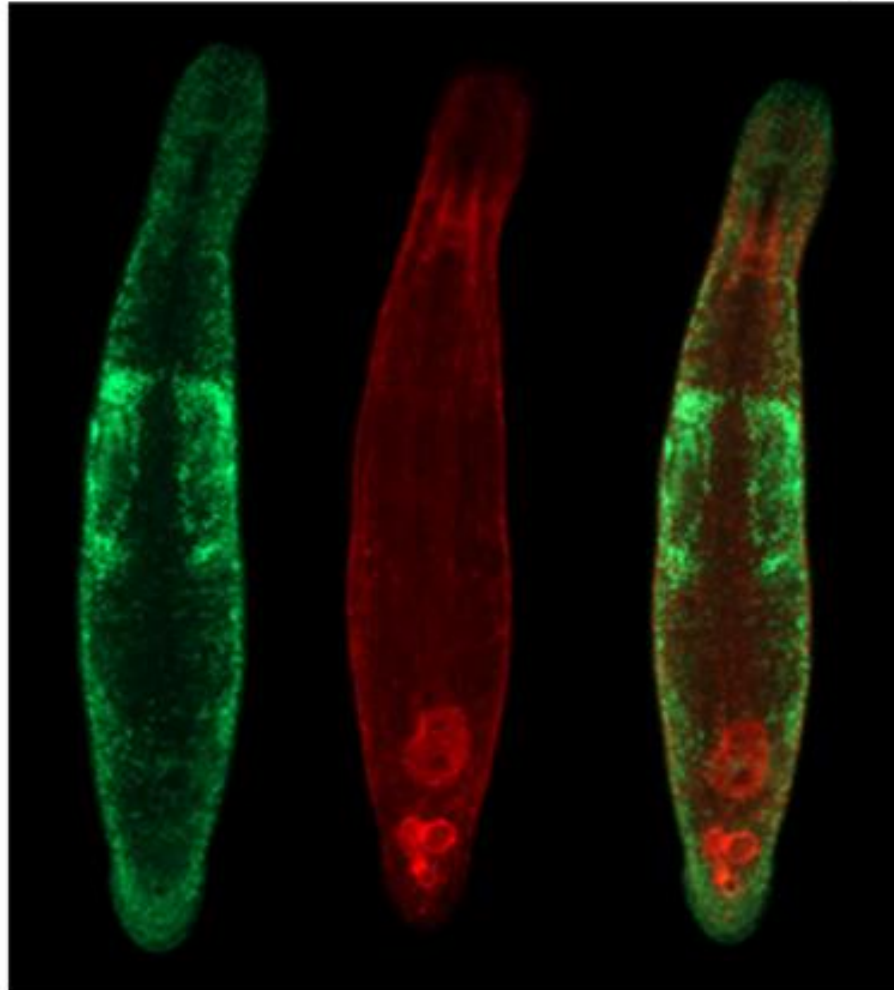


H2A.X::NeonGreen



KING x TNNT2 (мышцы)

Neoblasts Muscles Overlay



KING x TNNT2 (мышцы)

Neoblasts

Muscle

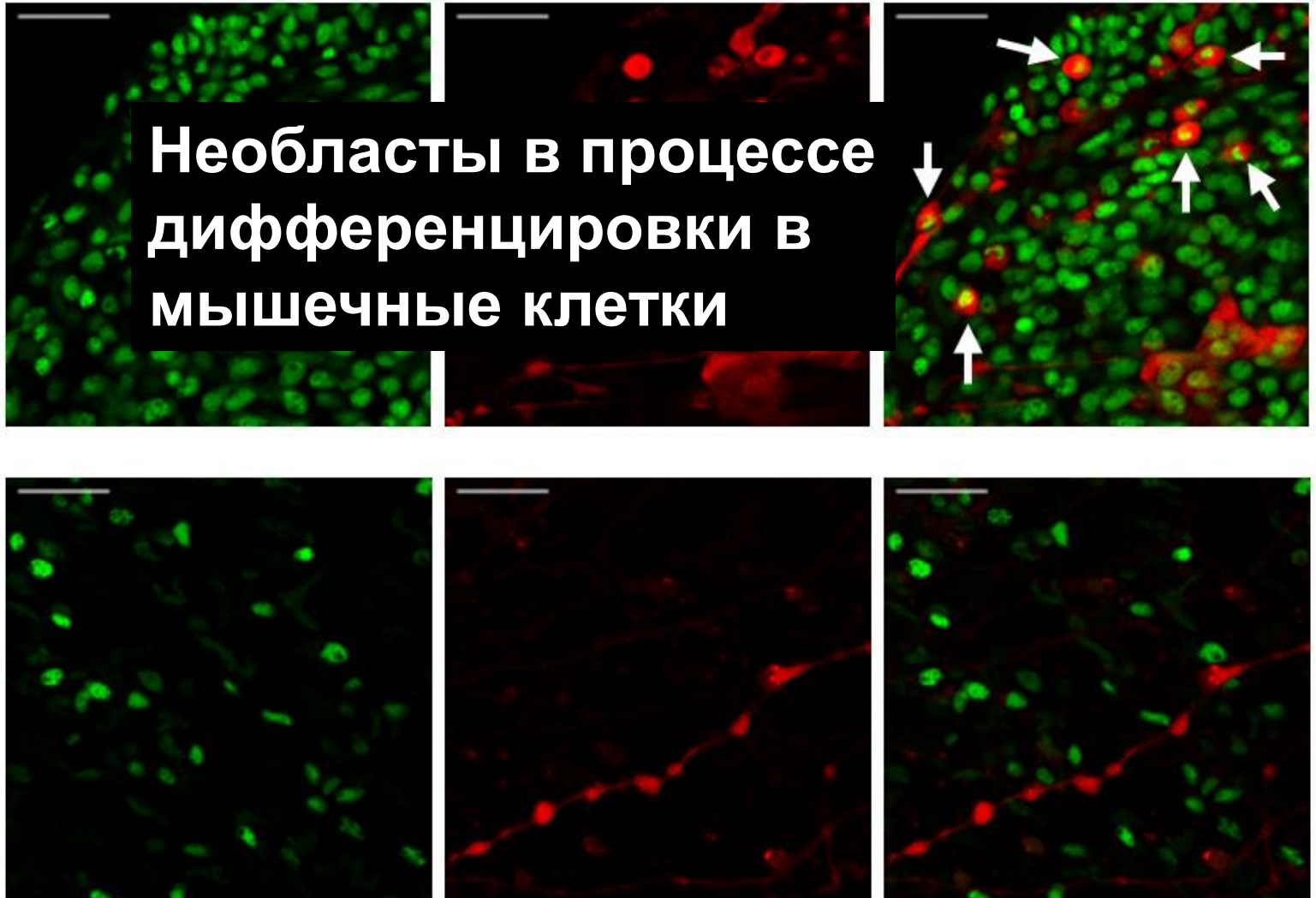
Overlay

H2AB::mNeonGreen pTNNT2::mScarlet

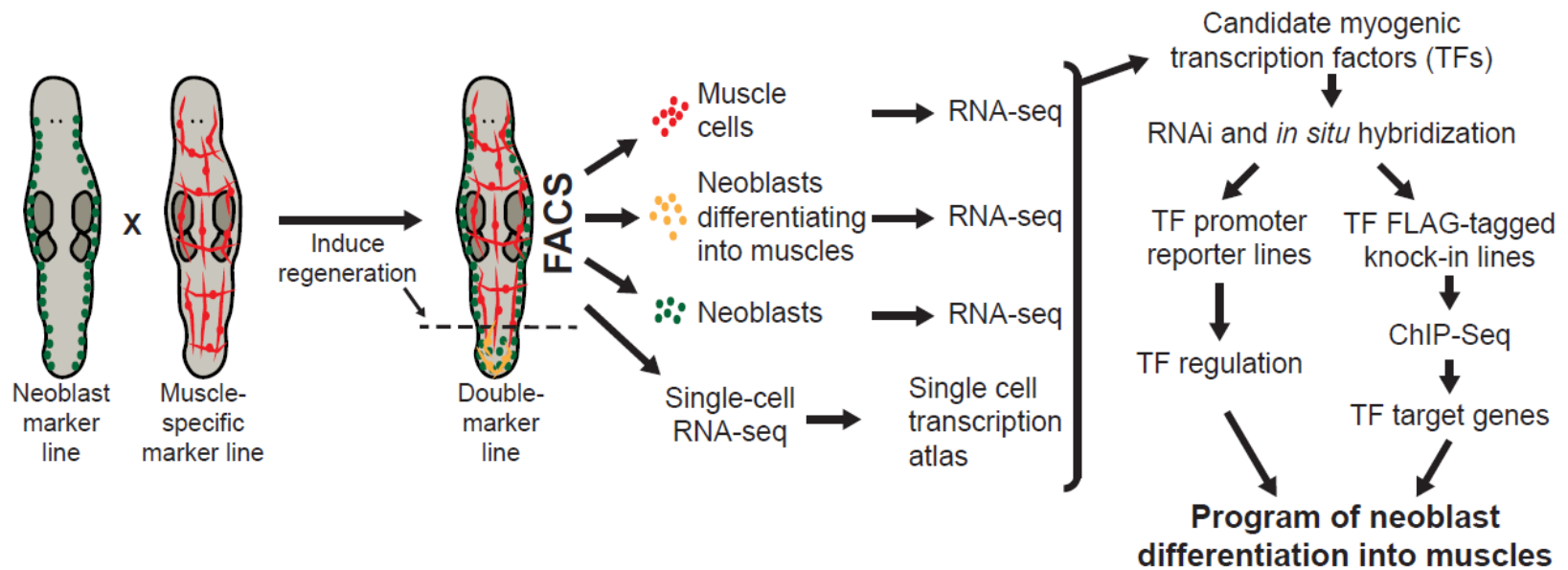
Regeneration

Необласты в процессе
дифференцировки в
мышечные клетки

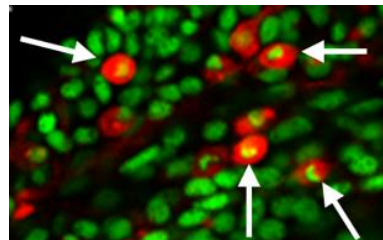
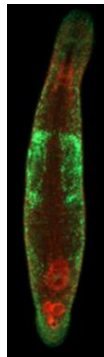
Homeostasis



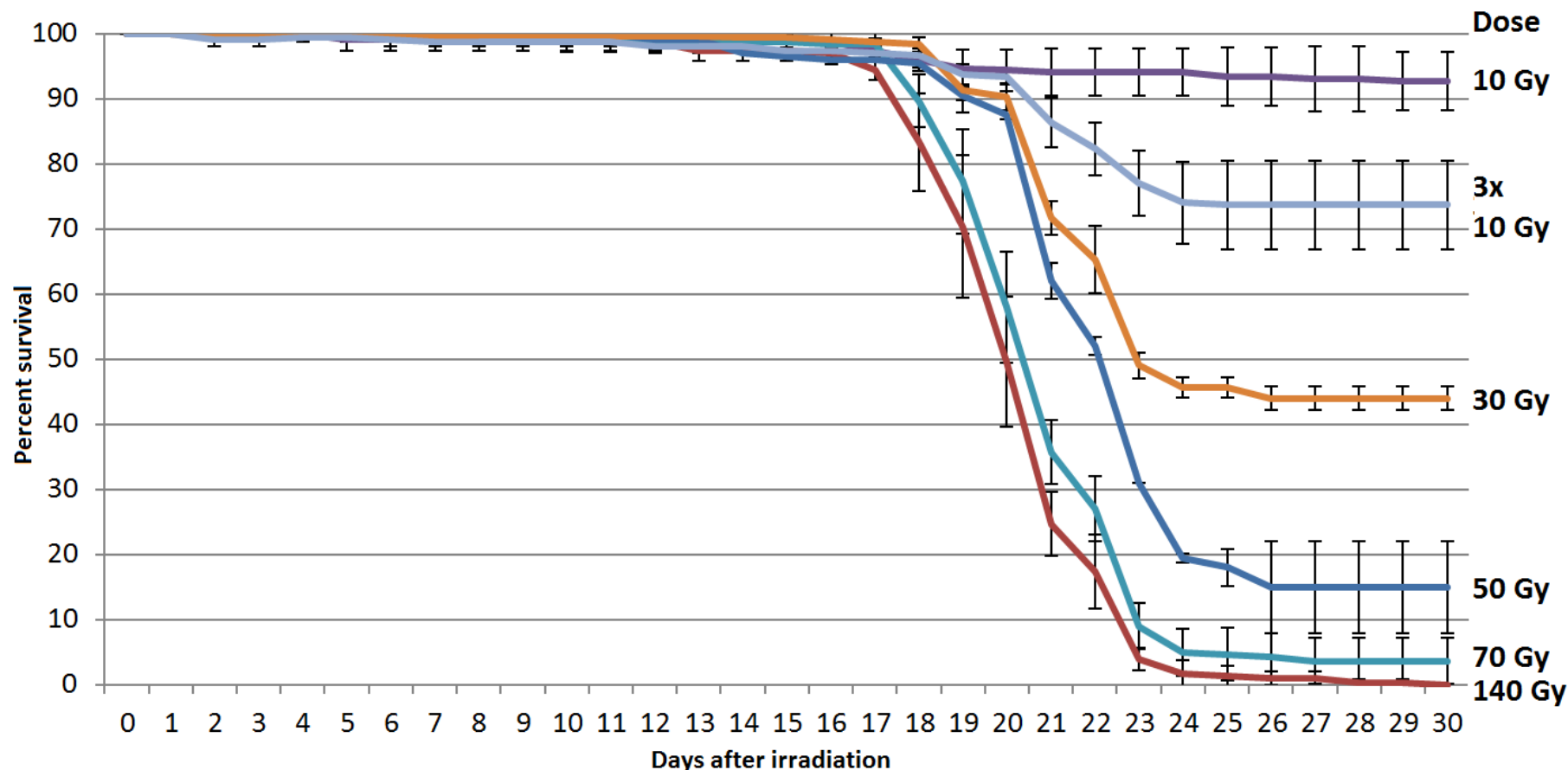
Платформа для исследования механизмов дифференцировки стволовых клеток



Experimental platform to study stem cell differentiation during regeneration in *M. lignano*



Выживаемость *M. lignano* после γ -облучения



Какие механизмы?

ARTICLE

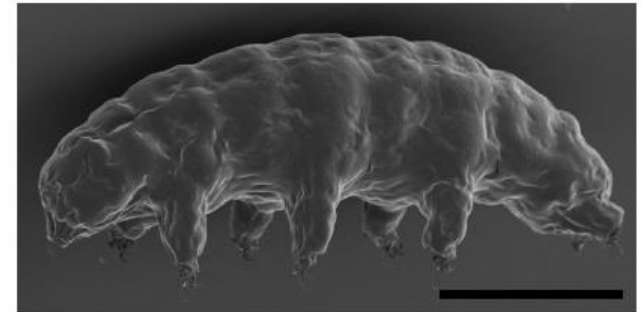
Received 21 Jun 2015 | Accepted 3 Aug 2016 | Published 20 Sep 2016

DOI: 10.1038/ncomms12808

OPEN

Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein

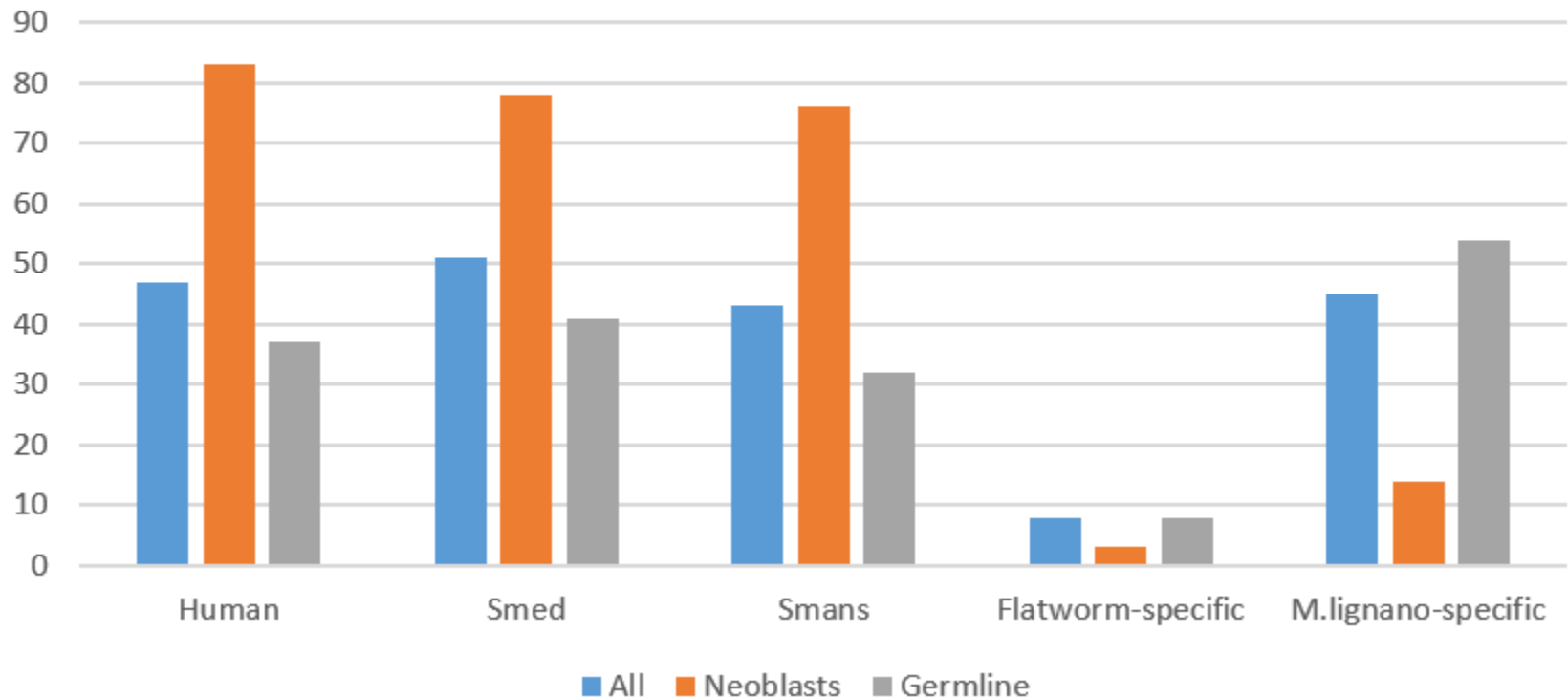
Takuma Hashimoto^{1,*}, Daiki D. Horikawa^{1,2,3,*}, Yuki Saito¹, Hirokazu Kuwahara^{1,4}, Hiroko Kozuka-Hata⁵, Tadasu Shin-I⁶, Yohei Minakuchi⁷, Kazuko Ohishi⁶, Ayuko Motoyama⁷, Tomoyuki Aizu⁷, Atsushi Enomoto⁸, Koyuki Kondo¹, Sae Tanaka¹, Yuichiro Hara⁹, Shigeyuki Koshikawa^{10,11}, Hiroshi Sagara⁵, Toru Miura¹⁰, Shin-ichi Yokobori¹², Kiyoshi Miyagawa⁸, Yutaka Suzuki¹³, Takeo Kubo¹, Masaaki Oyama⁵, Yuji Kohara⁶, Asao Fujiyama^{7,14}, Kazuharu Arakawa³, Toshiaki Katayama¹⁵, Atsushi Toyoda⁷ & Takekazu Kunieda¹



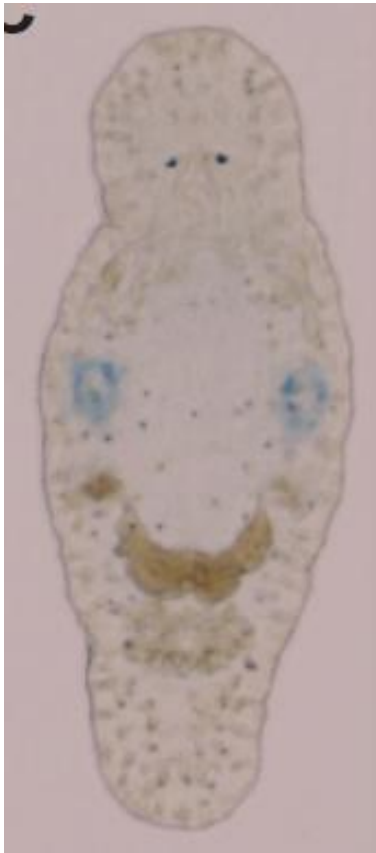
Tardigrades, also known as water bears, are small aquatic animals. Some tardigrade species tolerate almost complete dehydration and exhibit extraordinary tolerance to various physical extremes in the dehydrated state. Here we determine a high-quality genome sequence of *Ramazzottius varieornatus*, one of the most stress-tolerant tardigrade species. Precise gene repertoire analyses reveal the presence of a small proportion (1.2% or less) of putative foreign genes, loss of gene pathways that promote stress damage, expansion of gene families related to ameliorating damage, and evolution and high expression of novel tardigrade-unique proteins. Minor changes in the gene expression profiles during dehydration and rehydration suggest constitutive expression of tolerance-related genes. Using human cultured cells, we demonstrate that a tardigrade-unique DNA-associating protein suppresses X-ray-induced DNA damage by ~40% and improves radiotolerance. These findings indicate the relevance of tardigrade-unique proteins to tolerability and tardigrades could be a bountiful source of new protection genes and mechanisms.

Гены, специфичные для плоских червей

Conservation of different *M. lignano* gene groups in human and flatworms



Ген *Mlig-sperm1*, специфичный для плоских червей

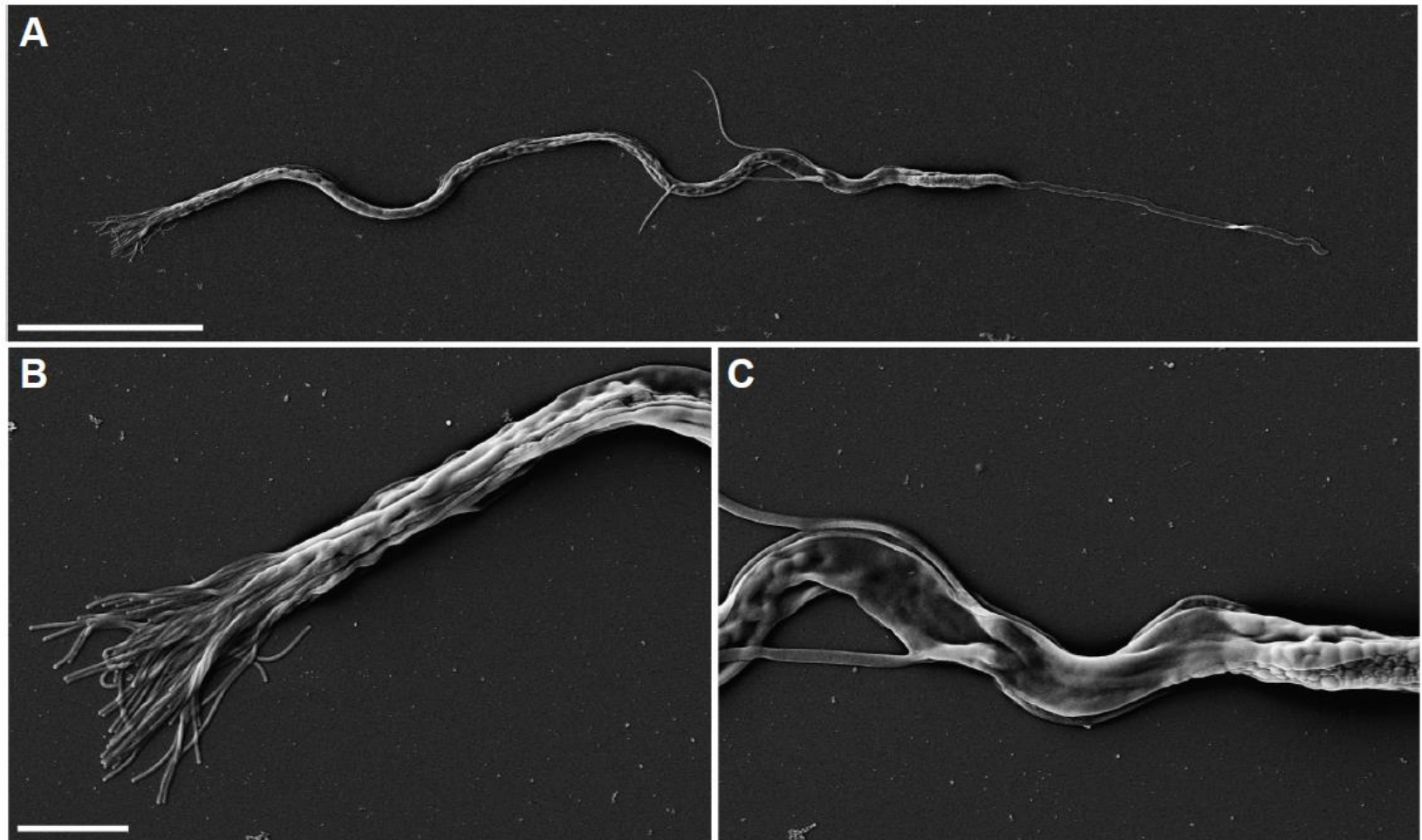


In situ

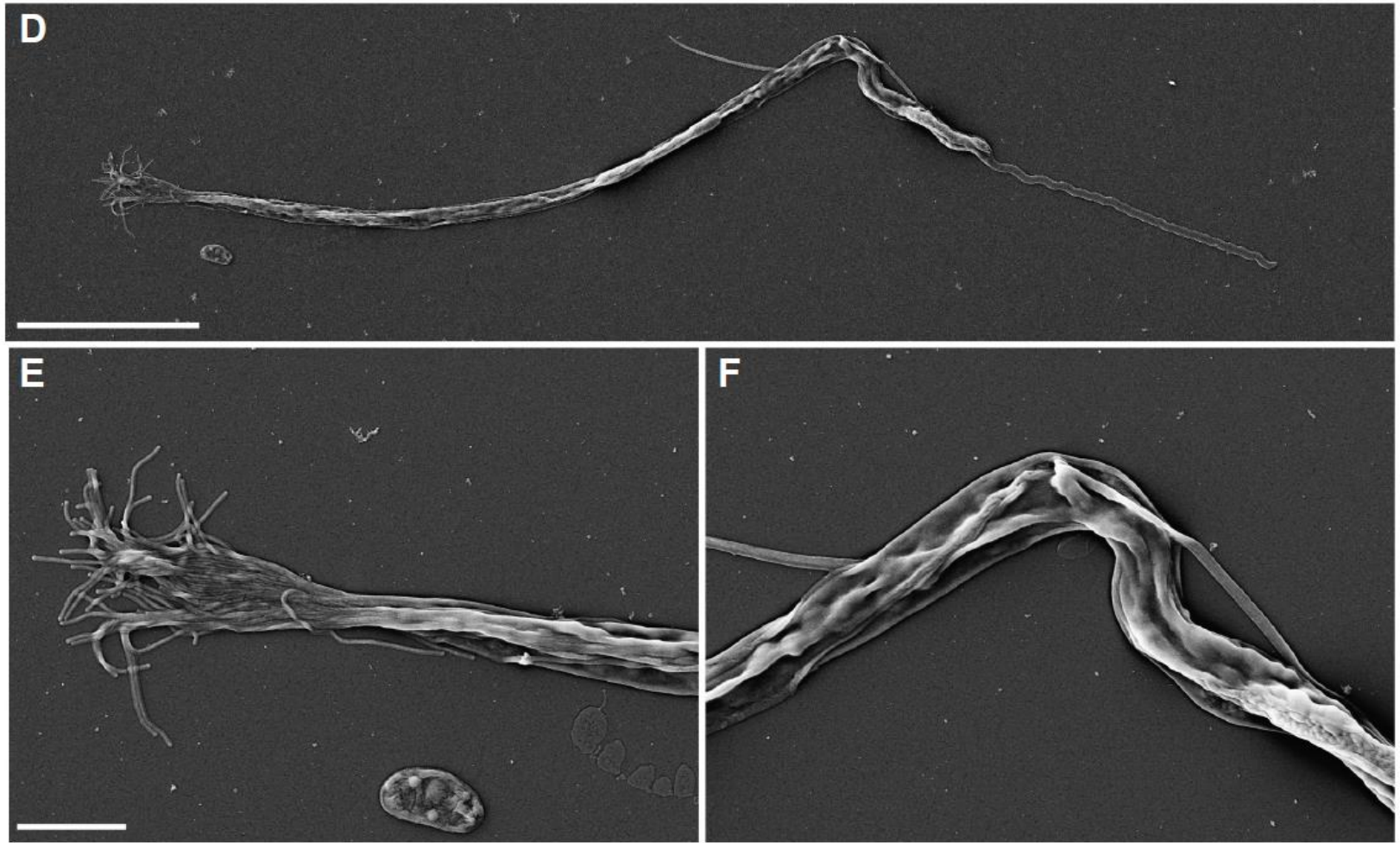


GFP(RNAi) Mlig-sperm1(RNAi)

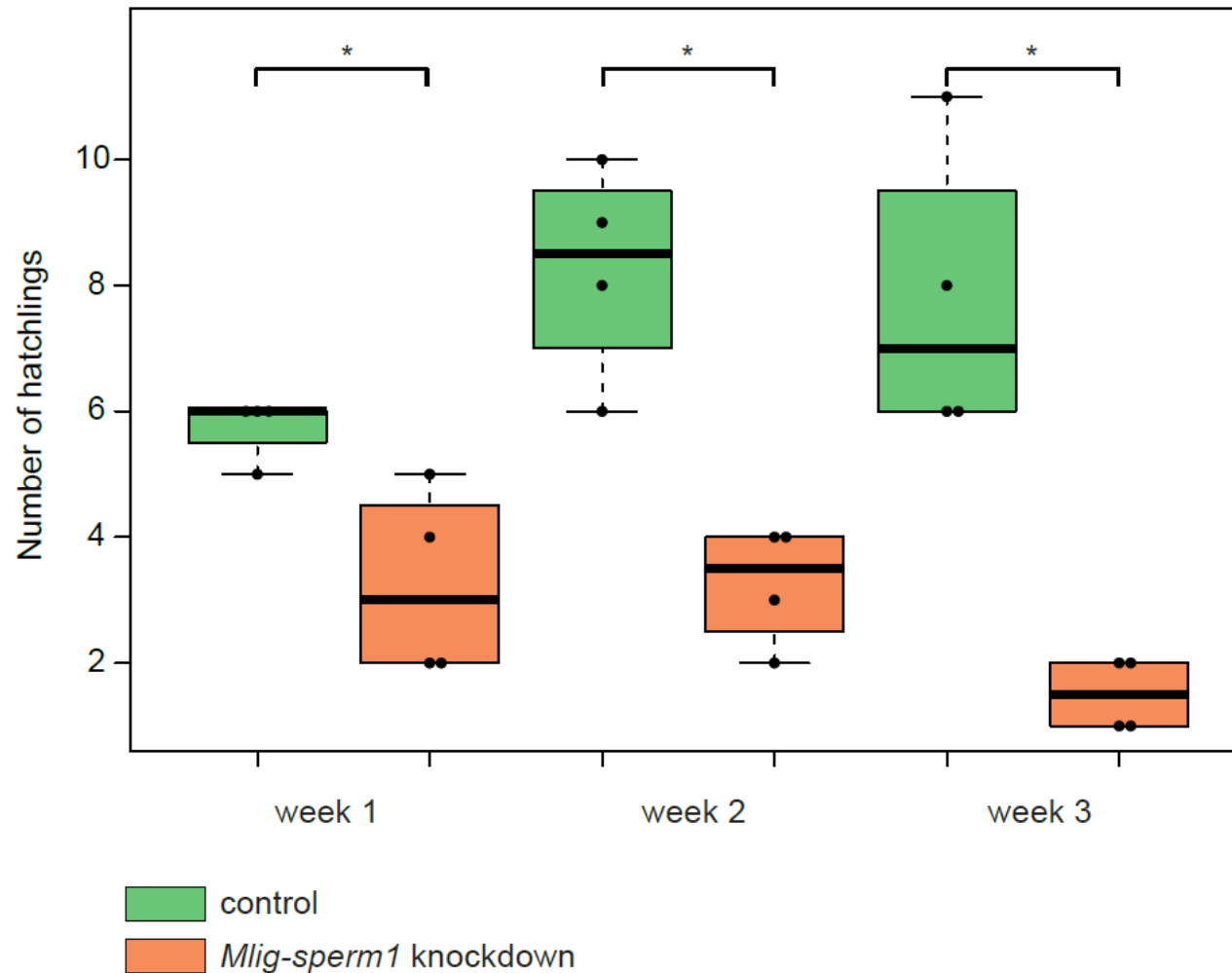
Сканирующая электронная микроскопия нормального сперматозоида *M. lignano*



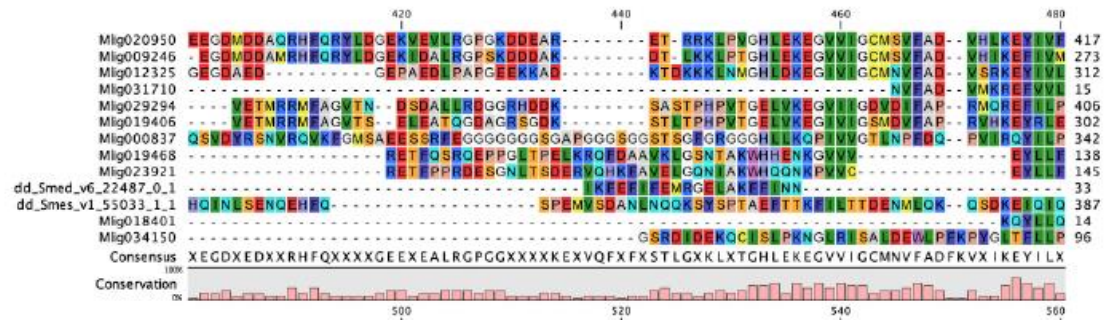
Сканирующая электронная микроскопия *Mlig-sperm1*(RNAi) сперматозоида *M. lignano*



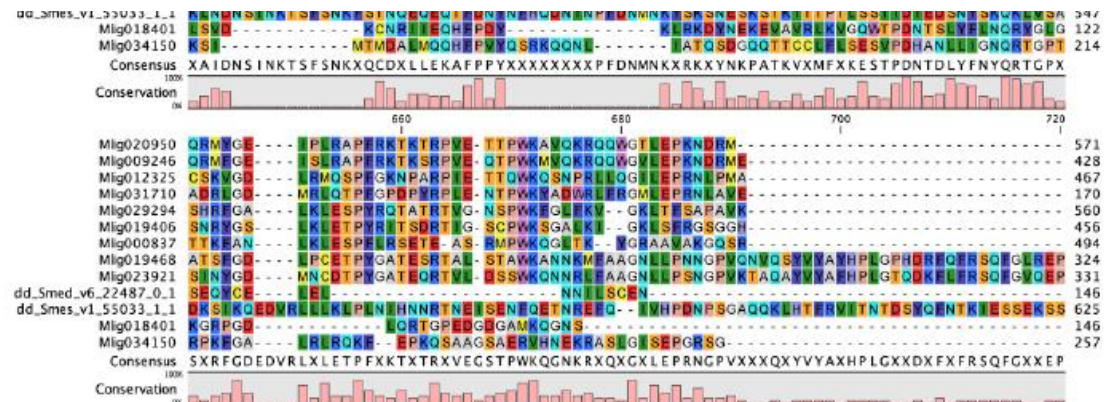
Уменьшение фертильности при нокдауне *Mlig-sperm1*



Генное семейство *Mlig-sperm1*



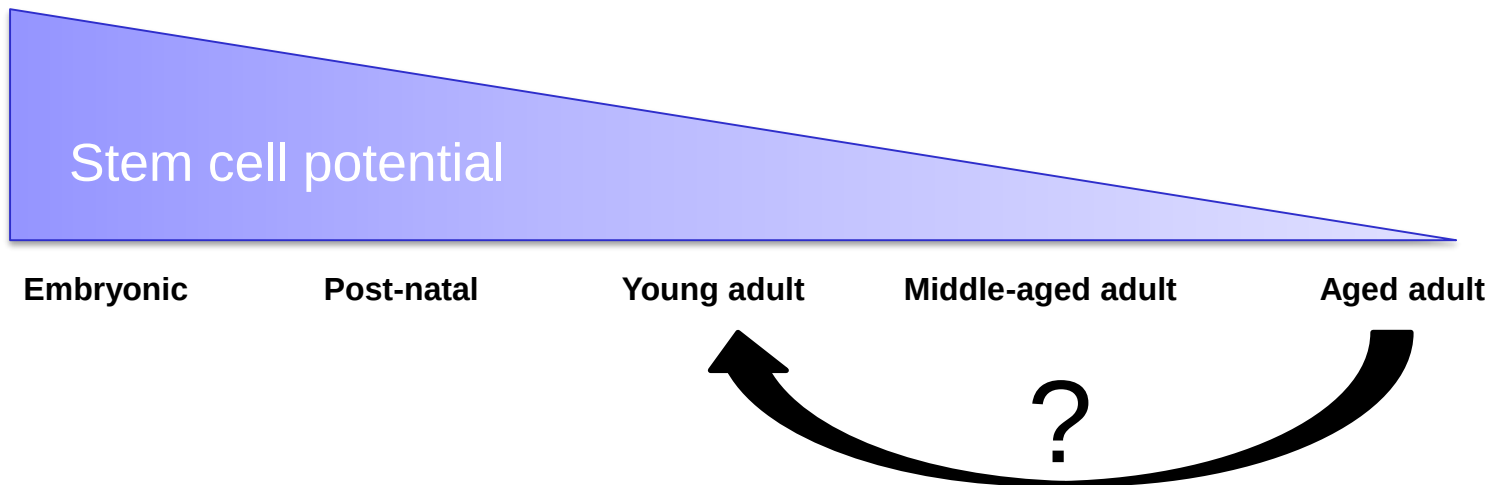
Для понимания биологии плоских червей необходимо изучать таксон-специфичные гены



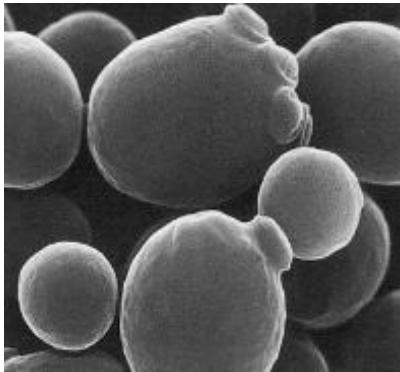
***Macrostomum* и старение**

Теория старения стволовых клеток:

**Упадок функции
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ведет к старению**



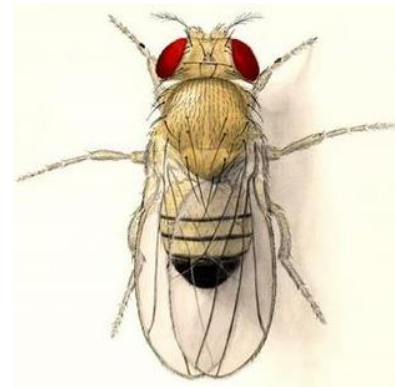
Необходимость в новом модельном организме для исследования взаимосвязи между старением и стволовыми клетками



Yeast
S. cerevisiae



Round worms
C. elegans



Flies
D. melanogaster



Flatworms
M. lignano

Регенерация = Омоложение?

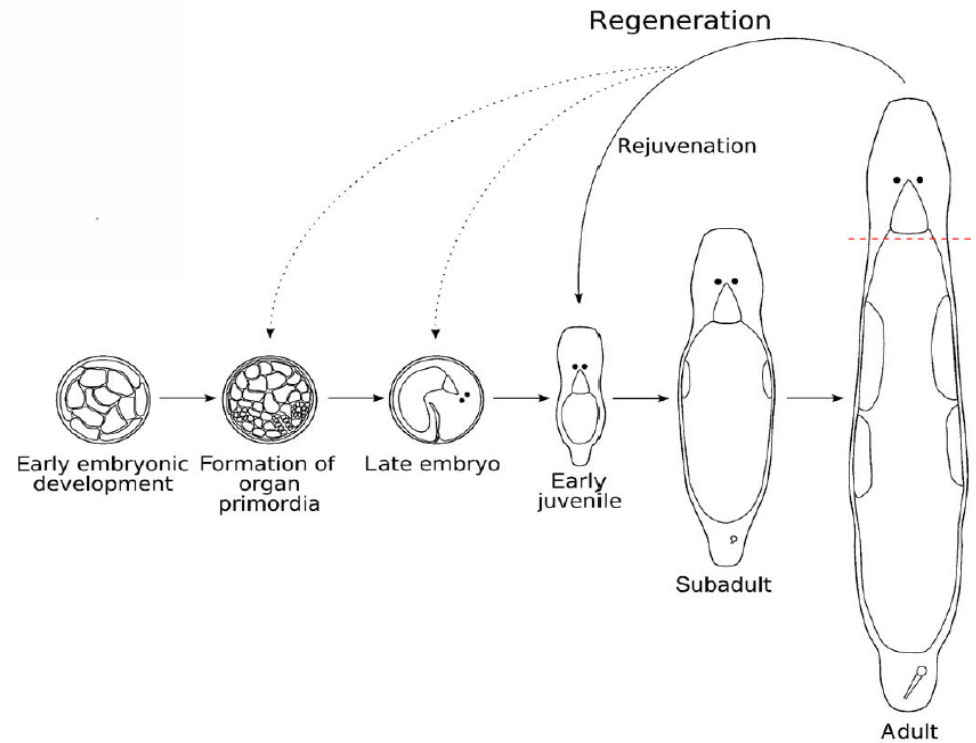
A Study of Senescence and Rejuvenescence Based on Experiments with *Planaria dorotocephala*.

By
C. M. Child.

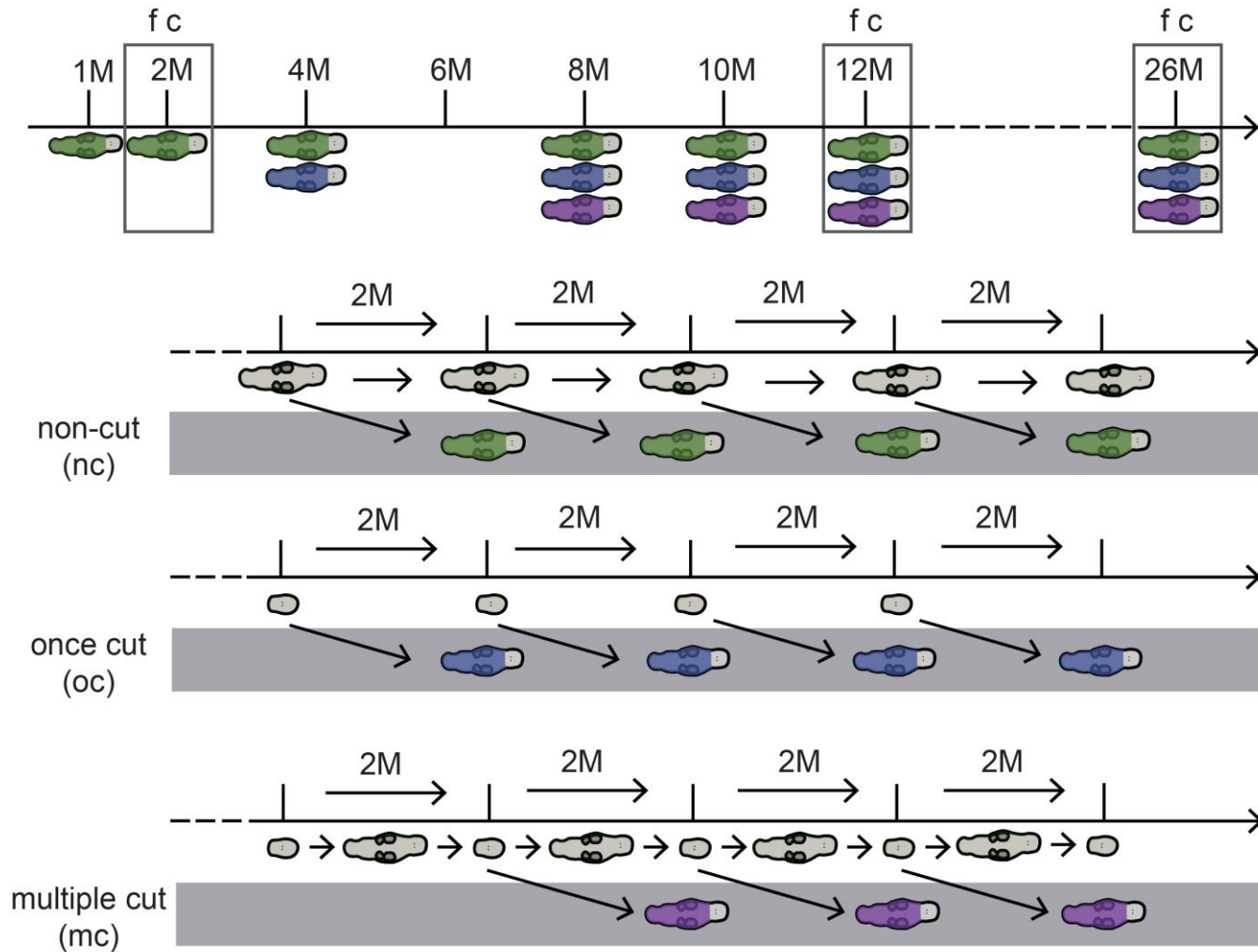
With 14 Curves and 1 Figure.

Eingegangen am 13. Juni 1910.

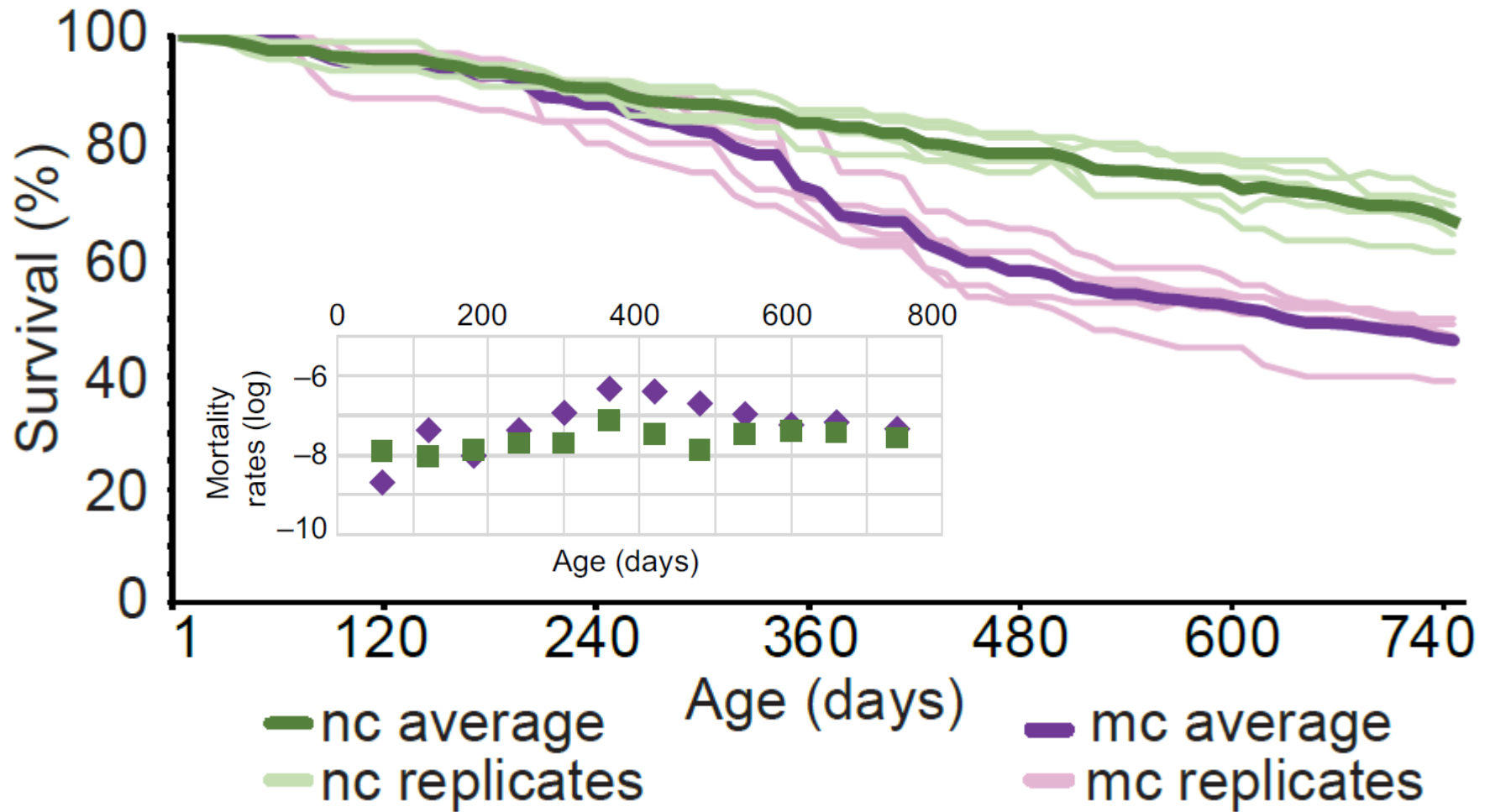
Egger et al. (2007). *Dev Genes Evol.* 217:89-104



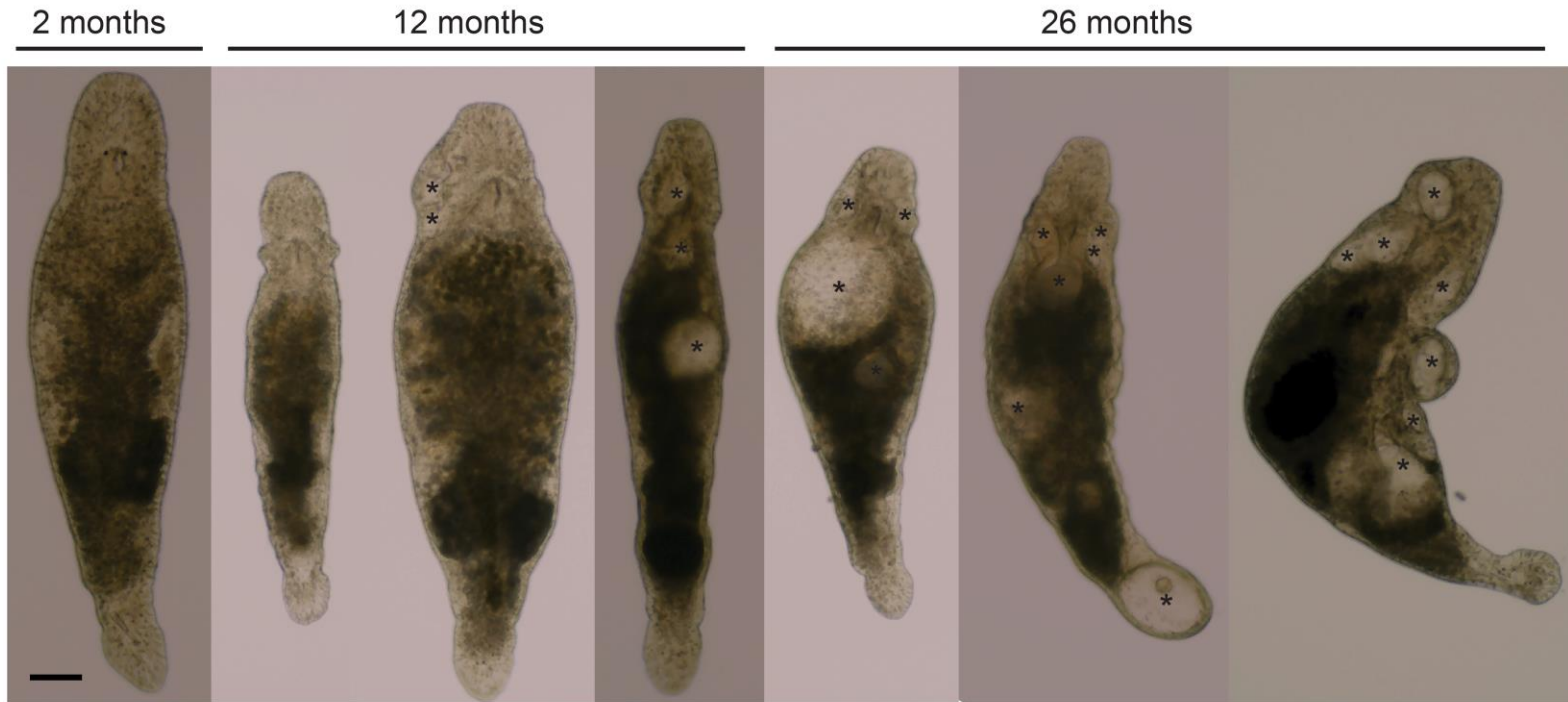
Дизайн эксперимента



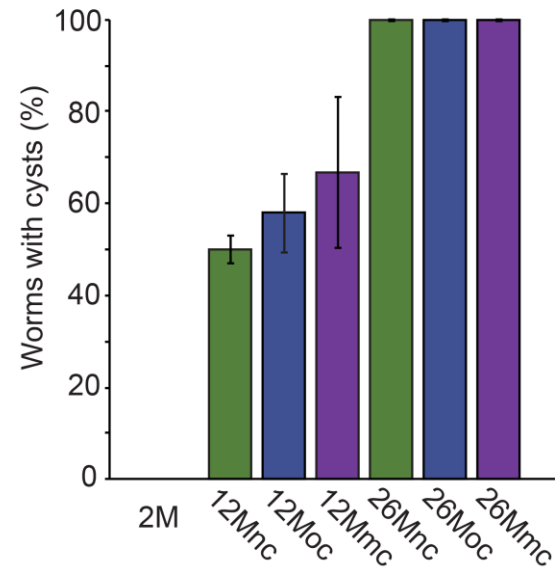
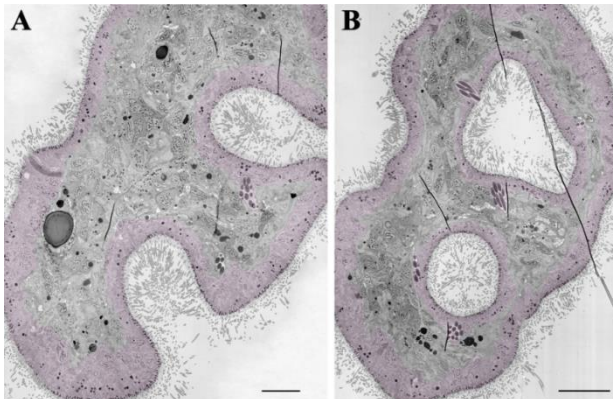
Выживаемость



Морфология

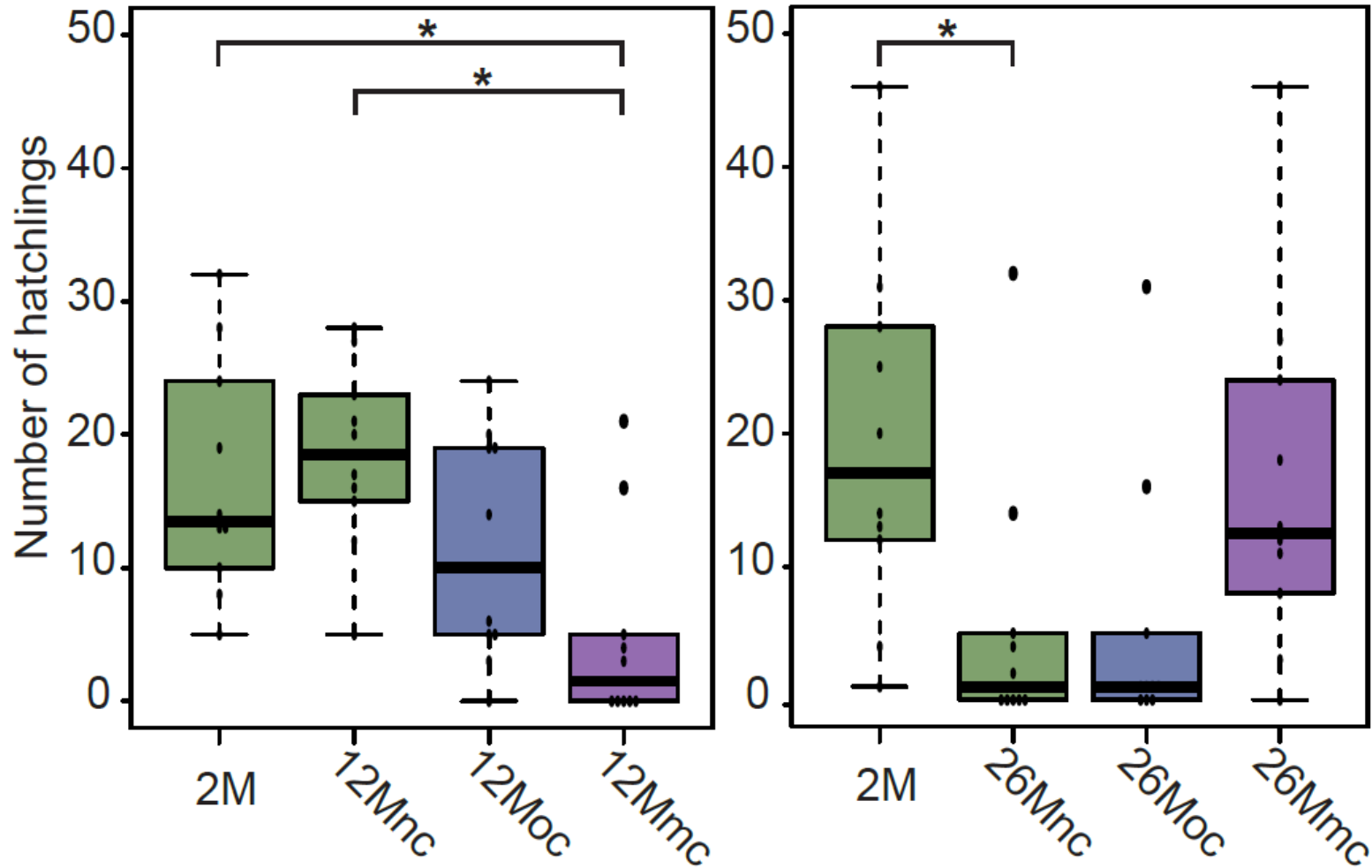


electron microscopy



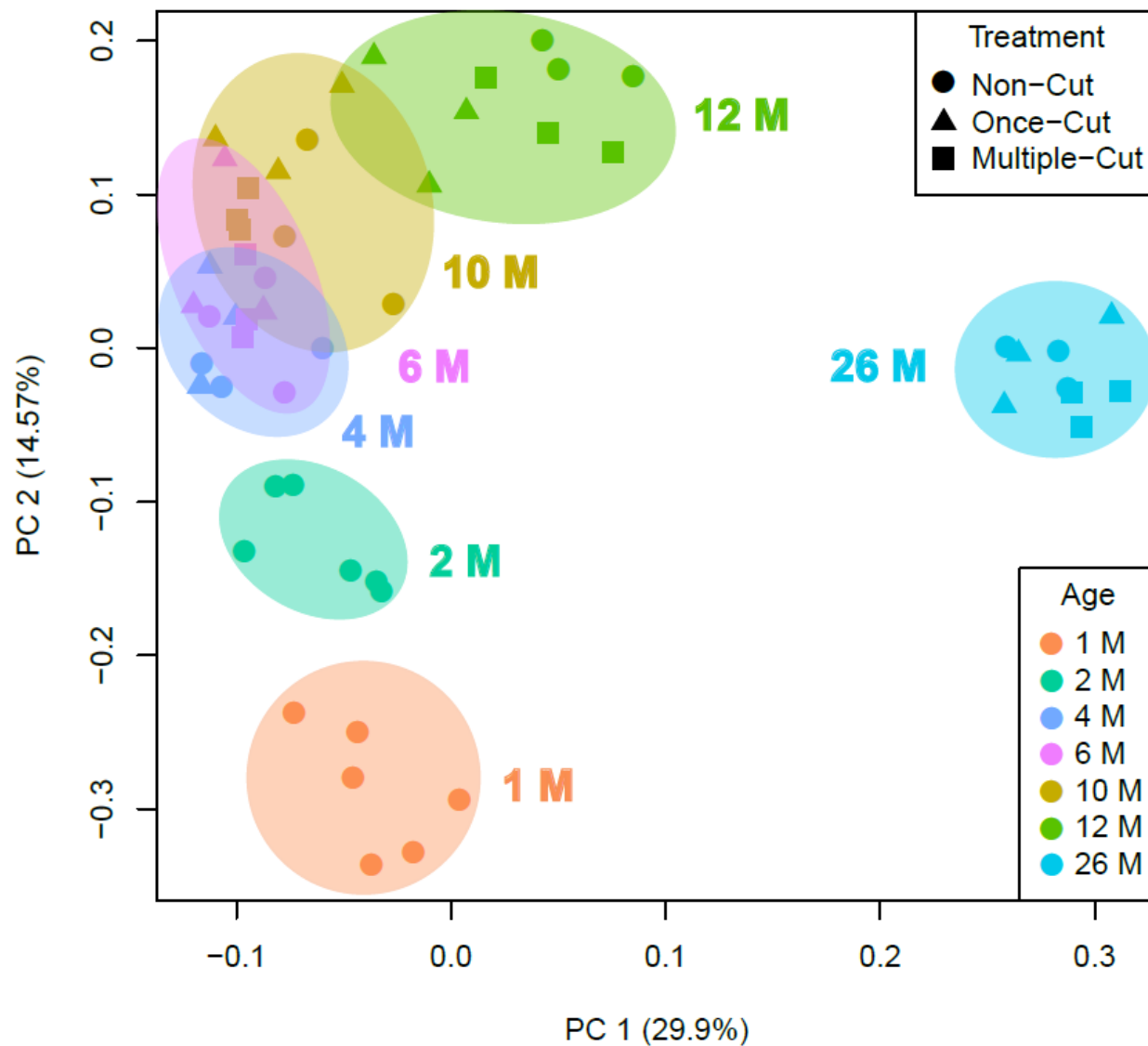
Mouton et al.(2018)
Aging Cell 17:e12739

Фертильность

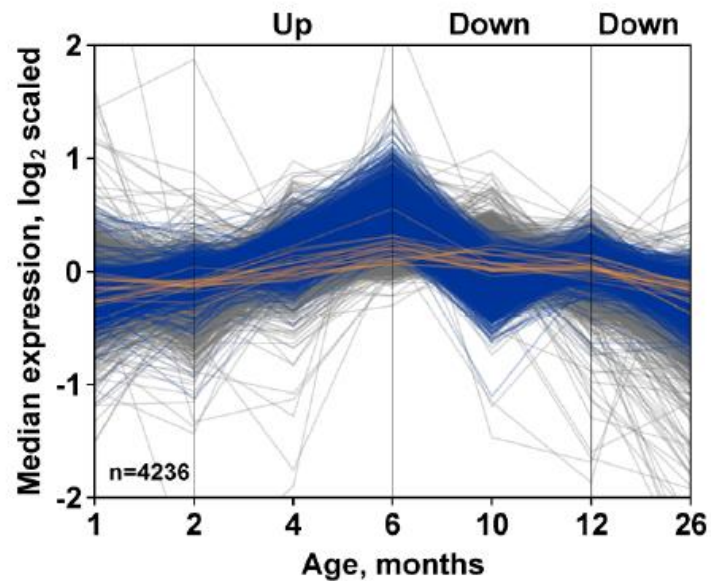
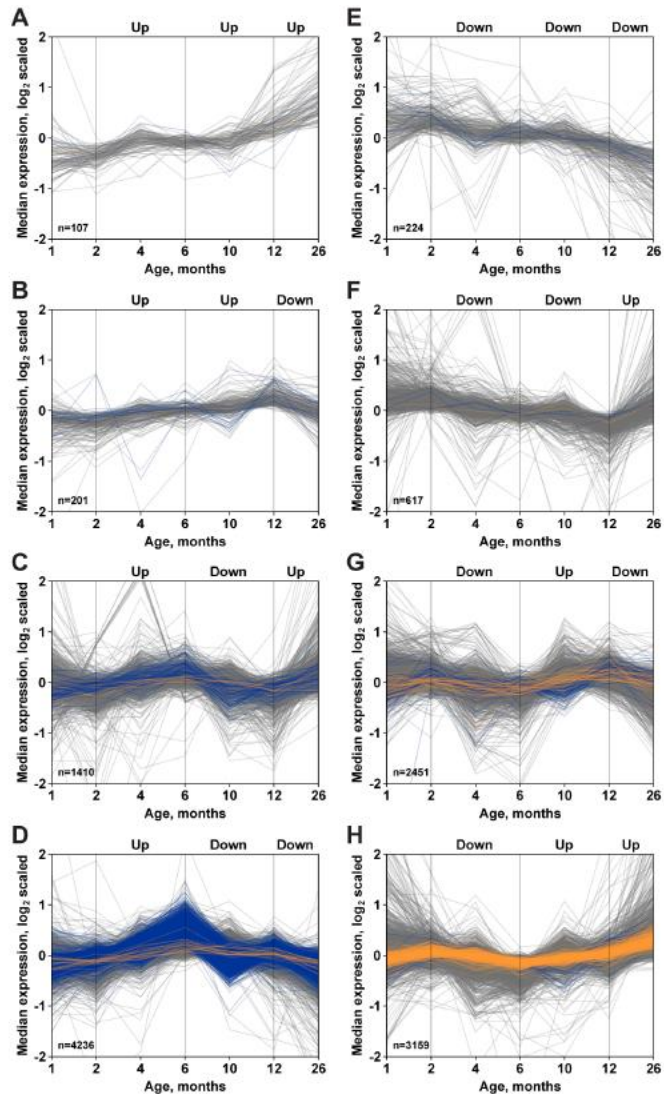


10 pairs of worms per condition; fertility = number of hatched worms

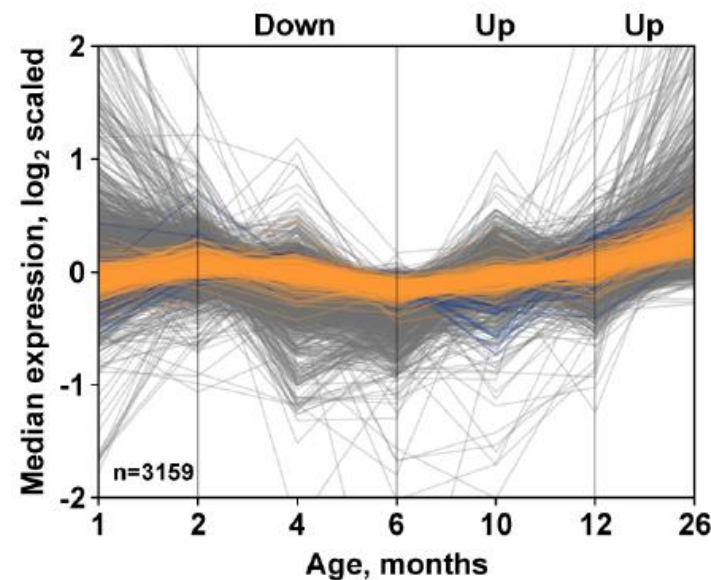
Нет явного эффекта омоложения



Изменение экспрессии генов с возрастом

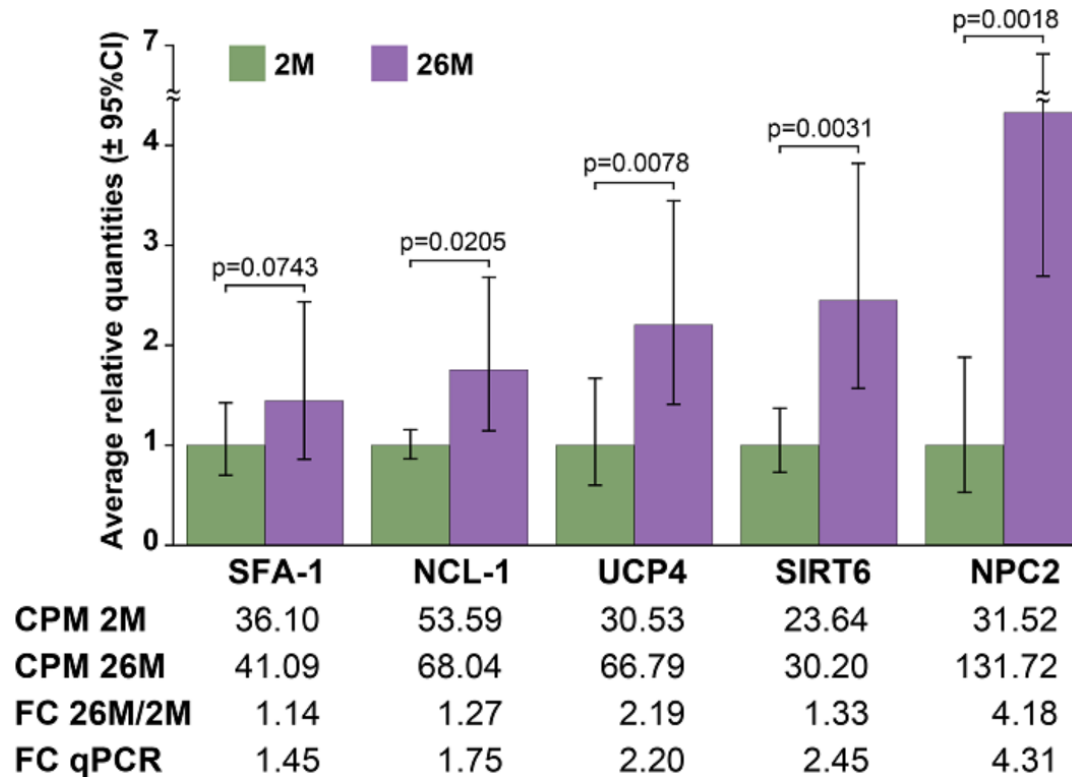


Гонады



Необласты

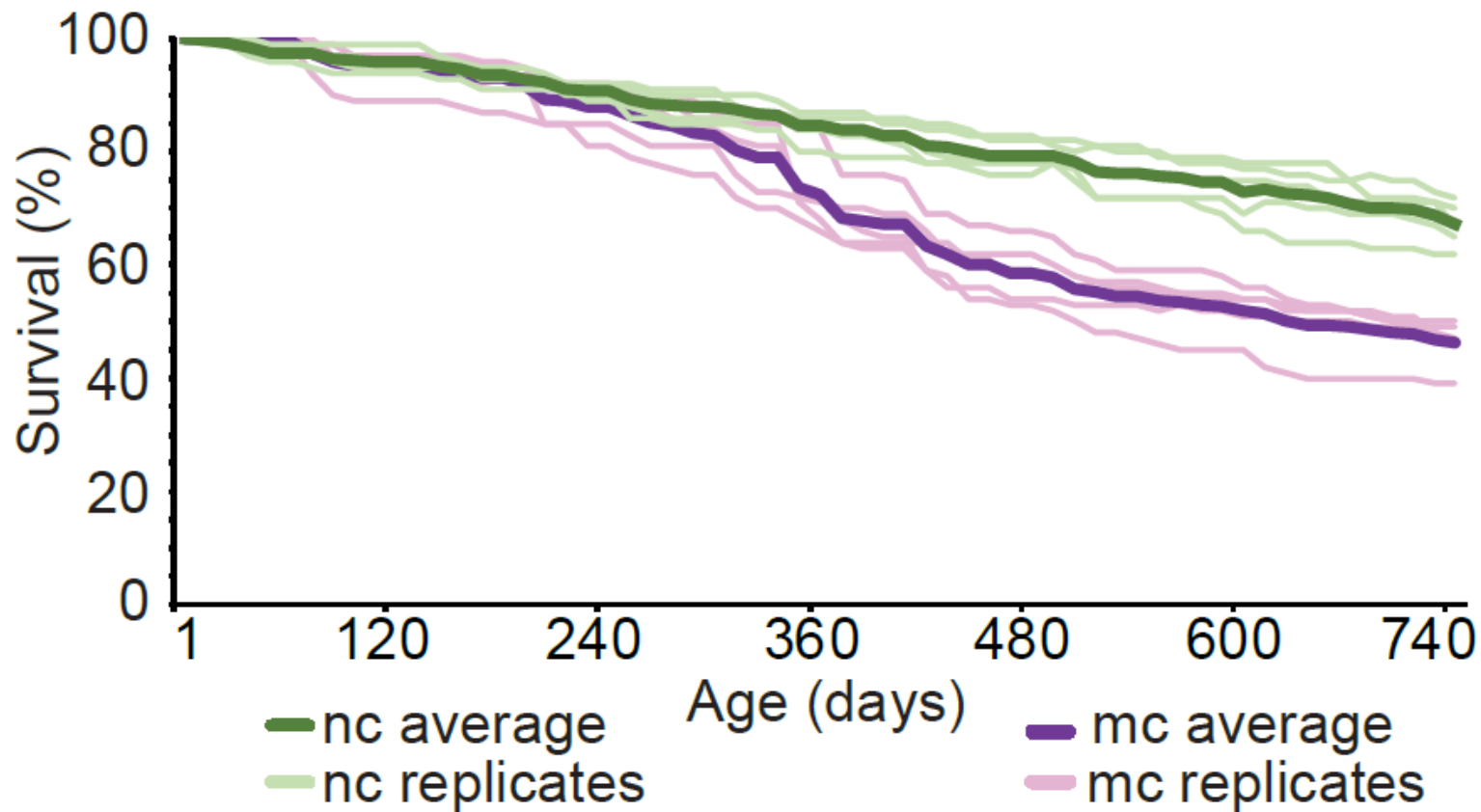
Верификация возрастных изменений в экспрессии генов



SFA-1, NCL-1, UCP2/4: увеличивает продолжительность жизни у *C. elegans* при оверэкспрессии (Heintz et al. 2016; Tikun et al. 2017; Sagi & Kim 2012)

SIRT6: увеличивает продолжительность жизни у мышей при оверэкспрессии (Kanfi et al. 2012)

Что с возрастом пошло не так и как это исправить?



Как червям удастся так долго жить?

Гипотеза:

***У M. lignano* в процессе эволюции возникли эффективные механизмы противостояния старению.**

***M. lignano* – информативная модель для изучения механизмов аттенуации старения.**

Пилотные эксперименты в *C. elegans*

373 “biological quality” genes upregulated with age and potentially conferring aging resilience to *M. lignano* (Mouton et al., 2018)



D Conserved in *C. elegans* (275) and have ‘neoblast’ (54) or ‘stress response’ (89) annotation

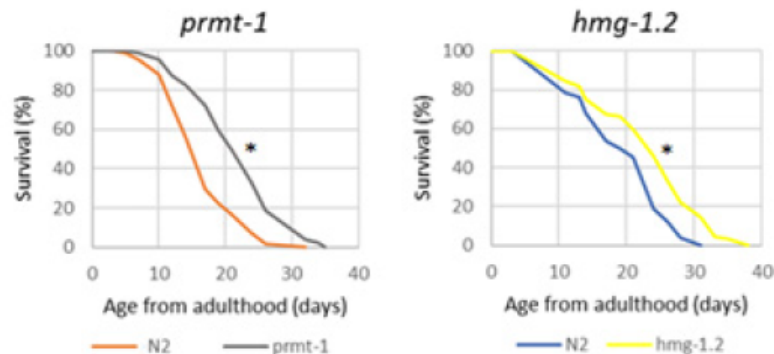
AACS, AAK1, ABCB1, ACADVL, ACHE, ACO1, ACP5, ADD1, AK3, AKAP1, AKAP10, ALDH9A1, AMPD2, ANK2, ANK3, ANPEP, APEX1, APRT, AQP9, ARF1, ARF6, ARFGF1, ARID2, ARL2, ARPC2, ARRD3, ATM, ATP2A2, ATP2C1, ATP5B, ATP6V1D, ATP6V1E1, ATP6V1G1, BCAP31, BCAT2, BEST2, BOLL, CA12, CA7, CACNA1D, CACNB2, CAD, CALR, CAPN3, CAPZB, CAV1, CAV3, CBX5, CCT2, CCT3, CCT4, CCT6A, CCT7, CCT8, CD81, CDC20, CDC42, CDK5RAP1, CDK7, CDO1, CHRNA10, CHRNA2, CHRNA4, CLNS1A, COPA, CORO1B, CTSA, DHCR7, DKC1, DLG1, DLL1, DMPK, DNA2, DNLZ, DSP, DYNLL2, EIF4A3, ERBB4, EXOSC10, EXOSC2, EXOSC3, EXOSC6, EXOSC9, FABP3, FAM46A, FBN1, FGA, FMNL1, FTH1, GAPDH, GATA4, GLRX3, GLRX5, GLUD1, GLUL, GNAS, GNL3L, GOLGA7, GPI, GRID1, GRIK1, GRIK2, GRM5, GSK3B, GSTO1, H3F3B, HCK, HK1, HMGB1, HMGB2, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPU, HSD17B4, HSD17B6, HSD17B8, HSP90AA1, HSP90B1, HSPA5, HSPD1, IARS, ICA1, IDE, IGF2BP1, ITPR1, KCNN2, KDELR2, LCK, MAOA, MAP3K4, MEX3D, MUC4, MXI1, MYH10, MYH6, MYH7, MYL12B, NAALAD2, NAPA, NCLN, NLE1, NLGN4X, NLK, NPR2, NR2F2, NXN, P4HB, PAFAH2, PAH, PBLD, PCID2, PCK1, PCK2, PDIA3, PDIA6, PHB, PHB2, PHPT1, PIF1, PKD1, PLB1, PLSCR1, POLA1, POLG, POSTN, PPA2, PPARG, PPIB, PPP2R3C, PPT1, PRDX6, PRELID1, PRKAA2, PRMT1, PSMA1, PSMA3, PSMA5, PSMB3, PSMB4, PSMB6, PSMB7, PSMD10, PSMD4, PTGES2, PTPN11, PTPRC, PUM2, QRSL1, RAB11A, RAB1A, RAC1, RAD23A, RDX, RFC3, RFC4, RGS14, RHAG, RHOA, RPA1, RPL11, RPL23, RPL5, RPS17, RPS24, RPS27A, RPS5, RPS6, RPS7, RPS9, SEL1L, SET, SGPL1, SH3GLB1, SHANK3, SIRT6, SLC1A3, SLC1A6, SLC25A5, SLC26A2, SLC26A5, SLC30A2, SLC34A1, SLC34A2, SLC39A14, SLC46A1, SLC4A8, SLC8A1, SLC8B1, SLC9A6, SLC9A8, SLMAP, SMAD2, SMAP1, SPTBN1, SRC, SREBF1, STAR, STIM1, STX1A, STXBP5, STXBP5L, SYNCRIP, SYT7, TAF9, TCP1, TFPI, TMEM165, TMOD3, TMX1, TPM1, TRA2B, TRIM71, TRPA1, TRPM2, TRPM8, TRPV5, UBA52, UMPS, UNC13B, VAMP2, VAMP8, VAPB, VARS, VAV1, VIL1, WRN, XBP1, XRCC5, YBX1, YWHAB, YWHAЕ, YWHAZ, ZFP36, ZFP36L1, ZNF236



E



Pilot overexpression screen of 13 candidate genes in *C. elegans*



От макростому к человеку

373 “biological quality” genes upregulated with age and potentially conferring aging resilience to *M. lignano* (Mouton et al., 2018)



Оверэкспрессия в мышах

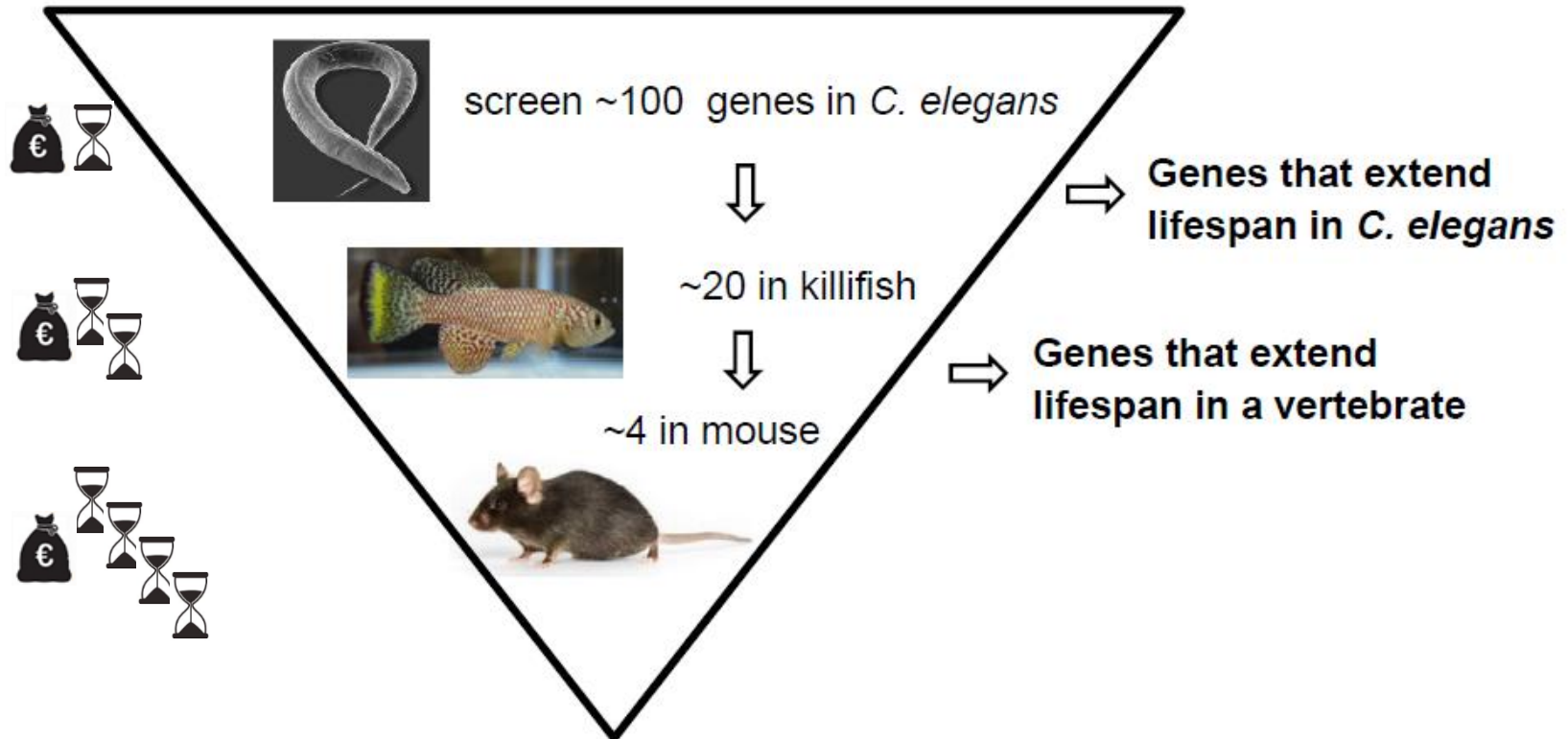


От макростомума к человеку

373 “biological quality” genes upregulated with age and potentially conferring aging resilience to *M. lignano* (Mouton et al., 2018)

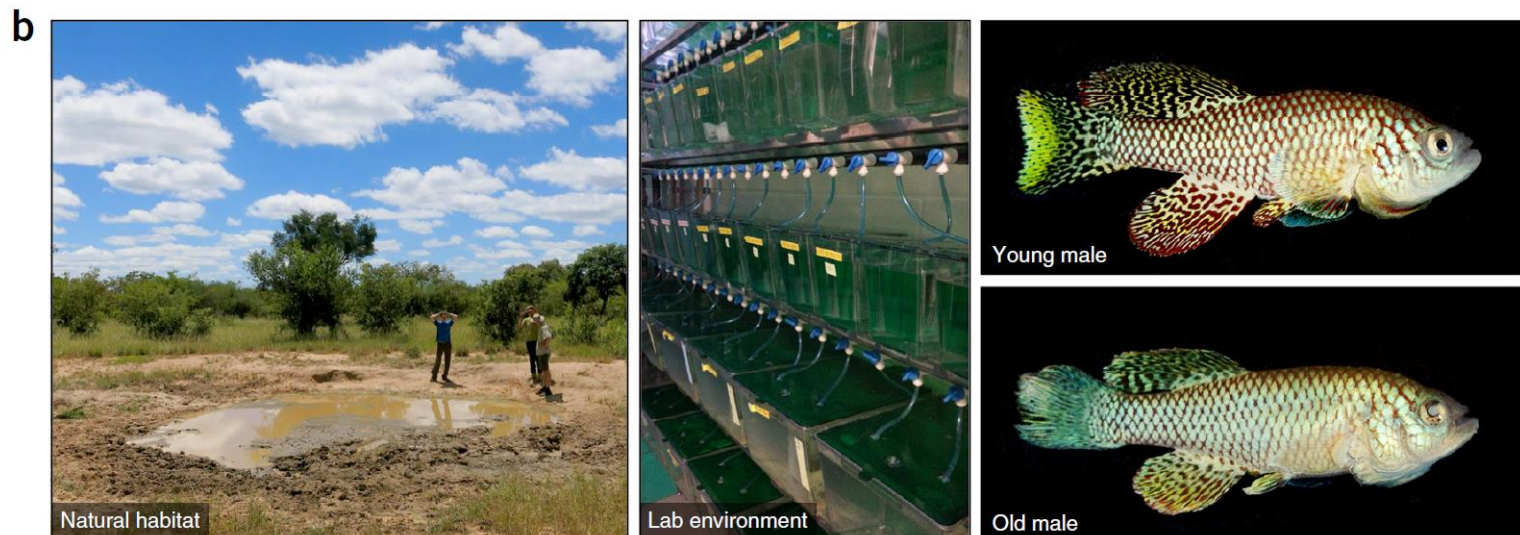
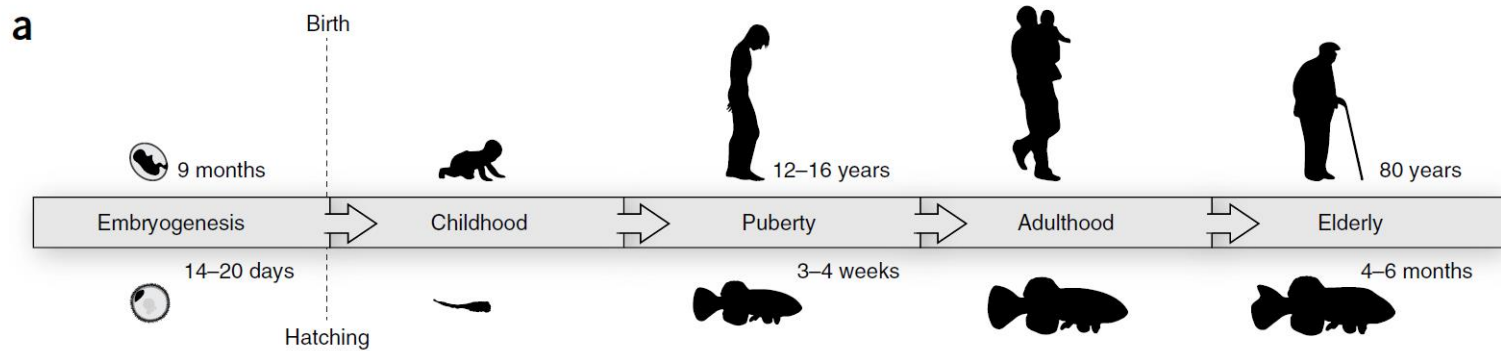


Conserved in *C. elegans* (275) and have ‘neoblast’ (54) or ‘stress response’ (89) annotation



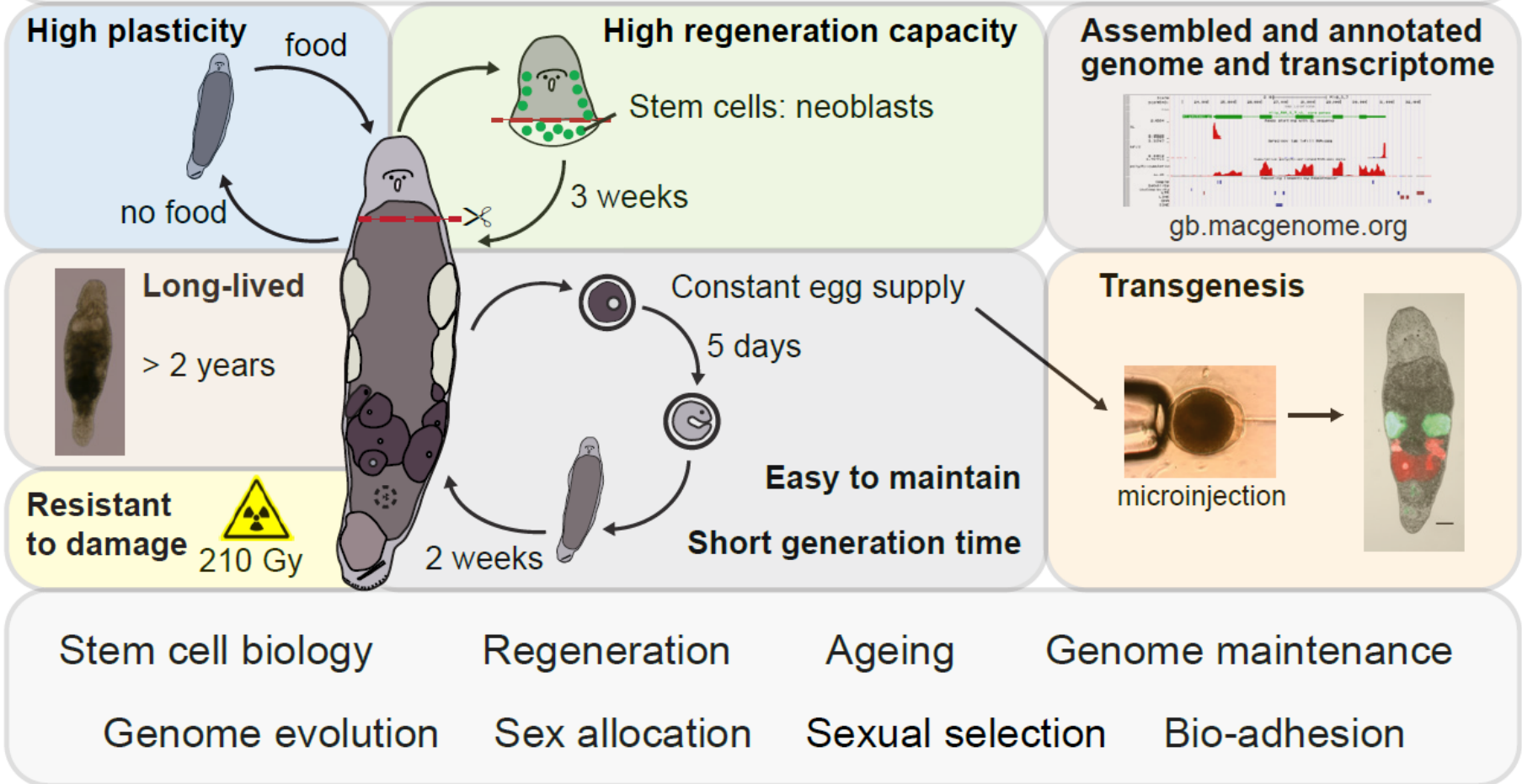
Mouse-validated healthspan-extending genes

Однолетние рыбки киллифиш: *Nothobranchius furzeri*



**Перспективная позвоночная модель для
исследования биологии старения**

The free-living flatworm *Macrostomum lignano*





М. lignano



Трансгенез



Геномика