

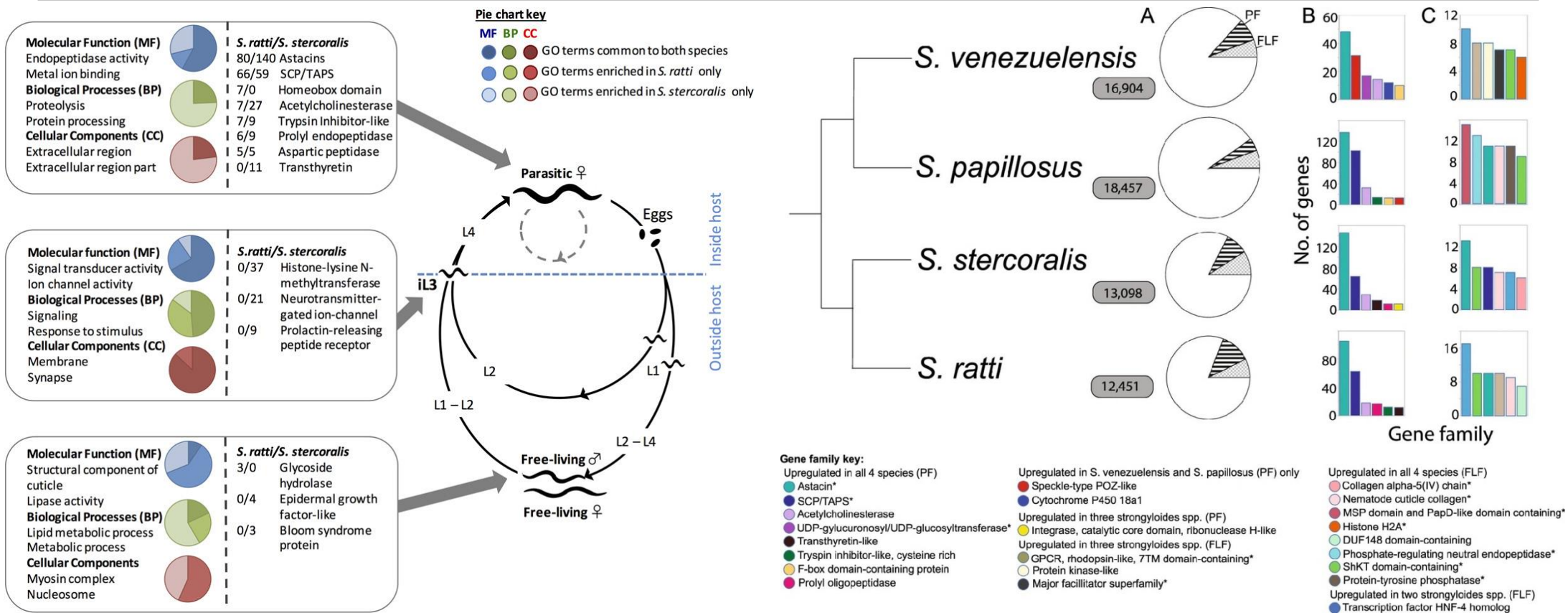
Кафедра зоологии беспозвоночных Санкт-Петербургского Государственного Университета

Сравнительный анализ транскриптомов паразитической и постпаразитической стадий жизненного цикла некоторых групп нематод

ГАНКЕВИЧ ВЛАДИМИР ДЕНИСОВИЧ, КАФЕДРА ЗООЛОГИИ
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ, СПбГУ

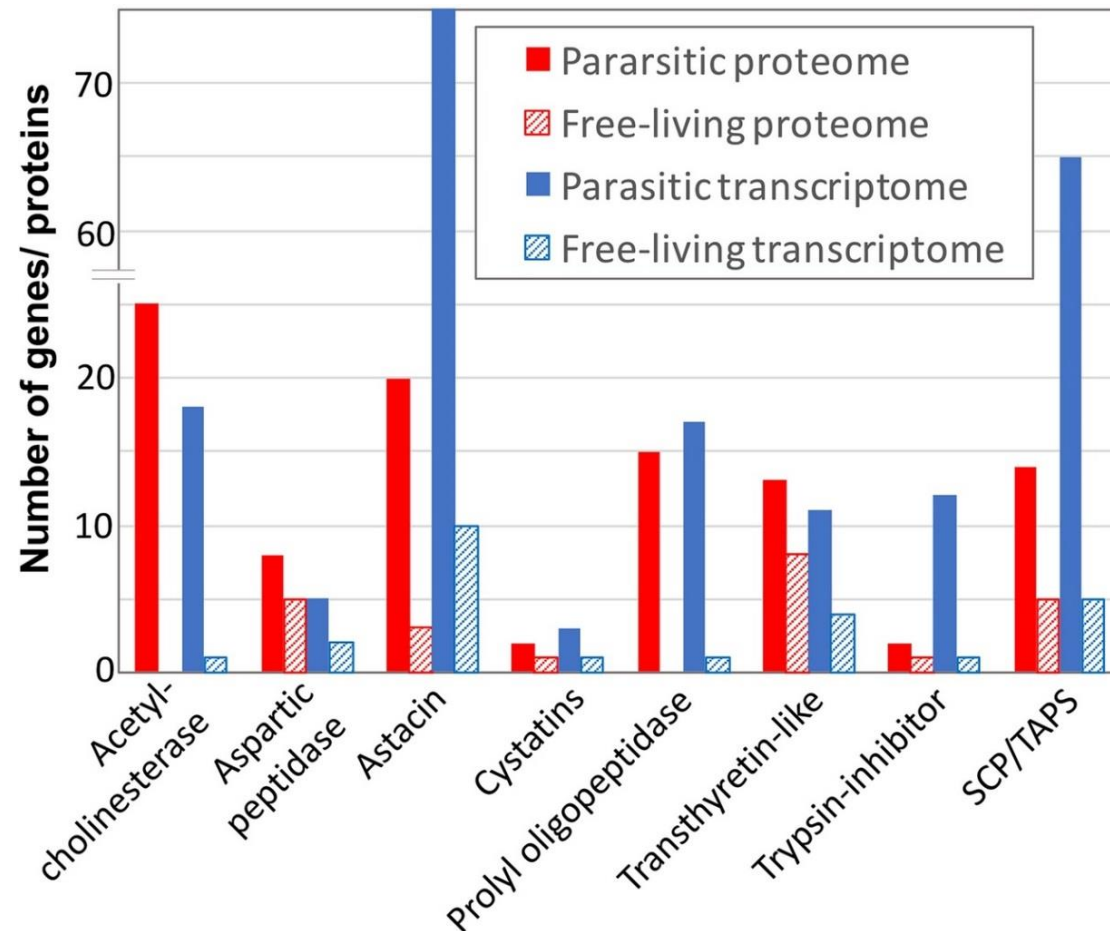
ЕФЕЙКИН БОРИС ДМИТРИЕВИЧ, ЛАБОРАТОРИЯ СИСТЕМАТИКИ
И ЭВОЛЮЦИИ ПАРАЗИТОВ, ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И
ЭВОЛЮЦИИ РАН ИМ. А. Н. СЕВЕРЦОВА)

Сравнительные исследования транскриптомов нематод (по литературным данным)



Hunt et al., 2018

Белки, потенциально участвующие в обеспечении протекания паразитической стадии *Strongyloides* spp.



Hunt et al., 2016

Rhabdias bufonis



Rana temporaria

Цель работы:

- Выявление генов, потенциально связанных с паразитическим образом жизни партеногенетических самок нематод *Rhabdias bufonis* путем сравнения паразитической и свободноживущей стадий.

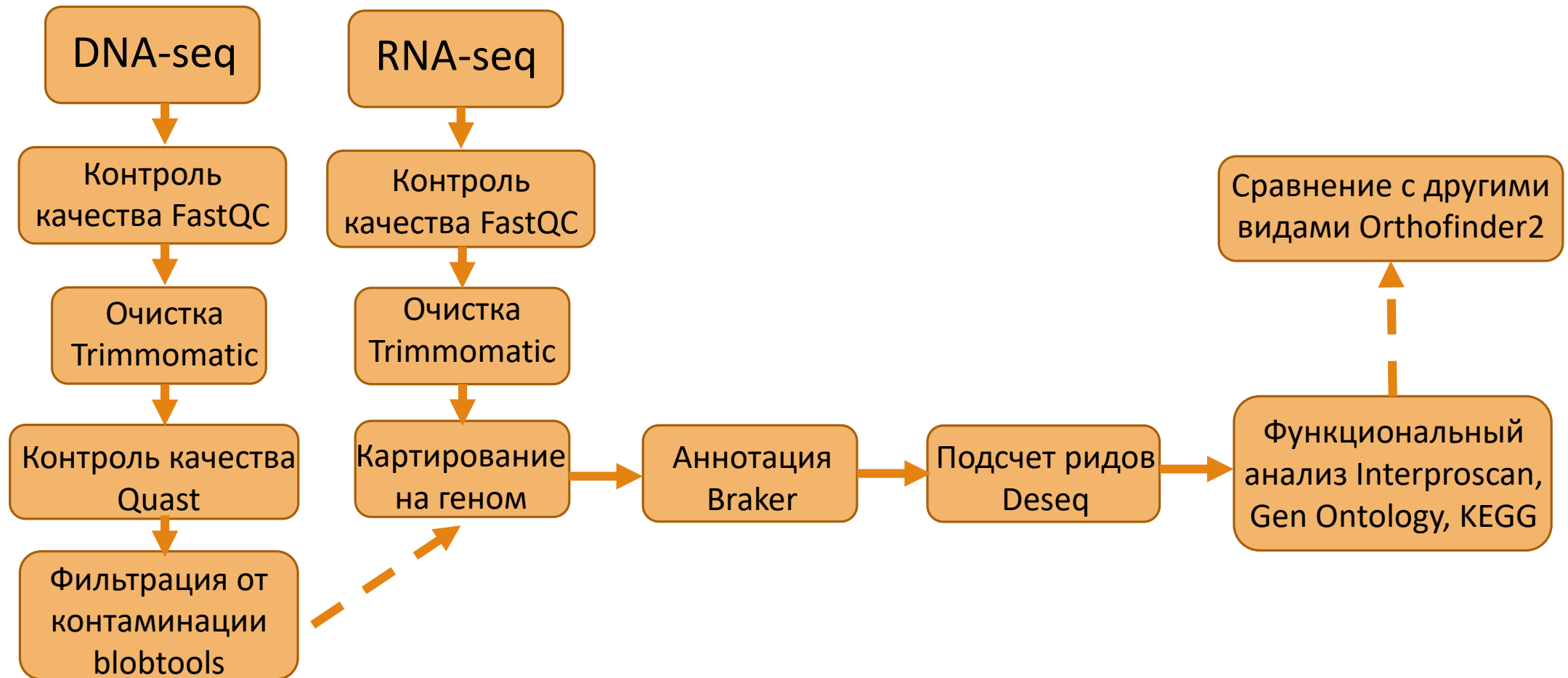
Задачи:

1. Получение паразитических самок *Rhabdias bufonis* из легких зараженных лягушек *Rana temroraria* путем паразитологического вскрытия.
2. Выращивание свободноживущих личинок в лабораторных условиях.
3. Экстрагирование РНК из полученных образцов и подготовка проб к секвенированию.
4. Экстрагирование ДНК из полученных образцов и подготовка проб к секвенированию
5. Получение полного генома из отобранных образцов в качестве референсной последовательности.
6. Проведение биоинформатического анализа полученных последовательностей.
7. Сравнительный анализ транскриптомов паразитической и свободноживущей стадий *Rhabdias bufonis*.

Материалы и методы

- Вскрытие *Rana temporaria* в целях обнаружения самок *Rhabdias bufonis*
- Выведение личинок первого возраста по модифицированному методу Chu (1936)
- Фиксация отобранных особей червей разных стадий в IntactRNA, 70% этаноле, 4% формалине
- Выделение РНК
- Получение библиотек кДНК
- Секвенирование на платформе Illumina Novaseq 4000
- Очистка при помощи Trimmomatic
- Сборка транскриптомов с применением Trinity2
- Картирование транскриптомных чтений на ранее полученные референсные геномы с помощью программы STAR
- Анализ дифференциальной экспрессии генов в R-пакете DEseq2 в iDEP.96
- Функциональная аннотация генов с использованием InterProScan, KEGG и WormBase
- Поиск ортологичных генов в Orthofinder2.

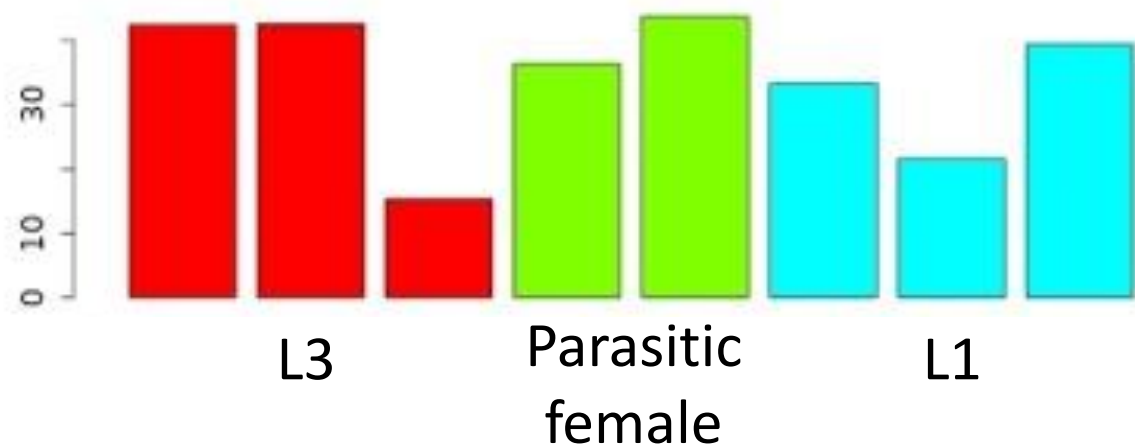
План биоинформатического анализа



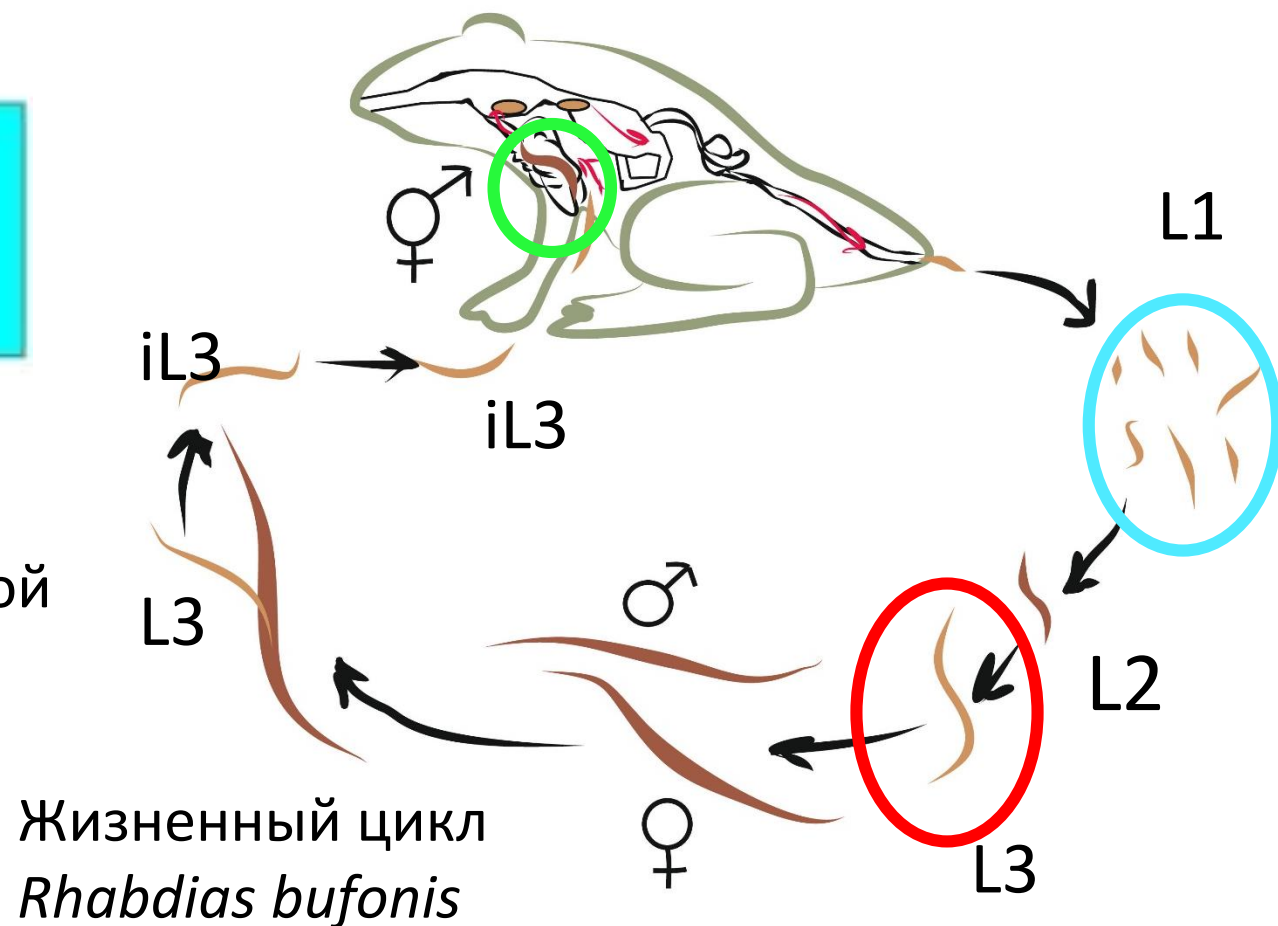
Статистика полногеномной сборки

	<i>Rhabdias bufonis</i>
#contigs	62 901
Total lenght	254 298 742
Largest contig	1 042 887
GC (%)	43.12
N50	34981
# N per 100 kb	0,17

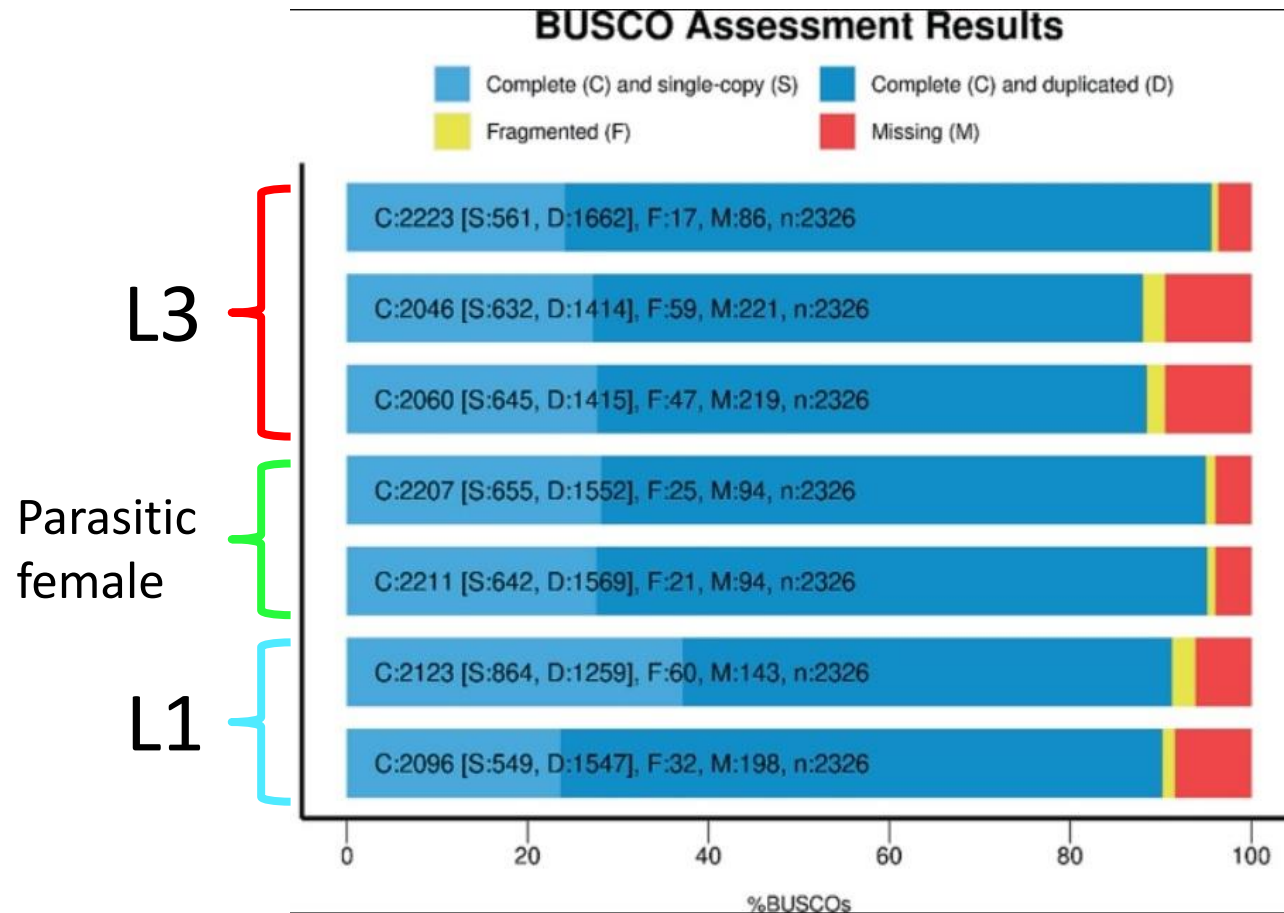
Результаты



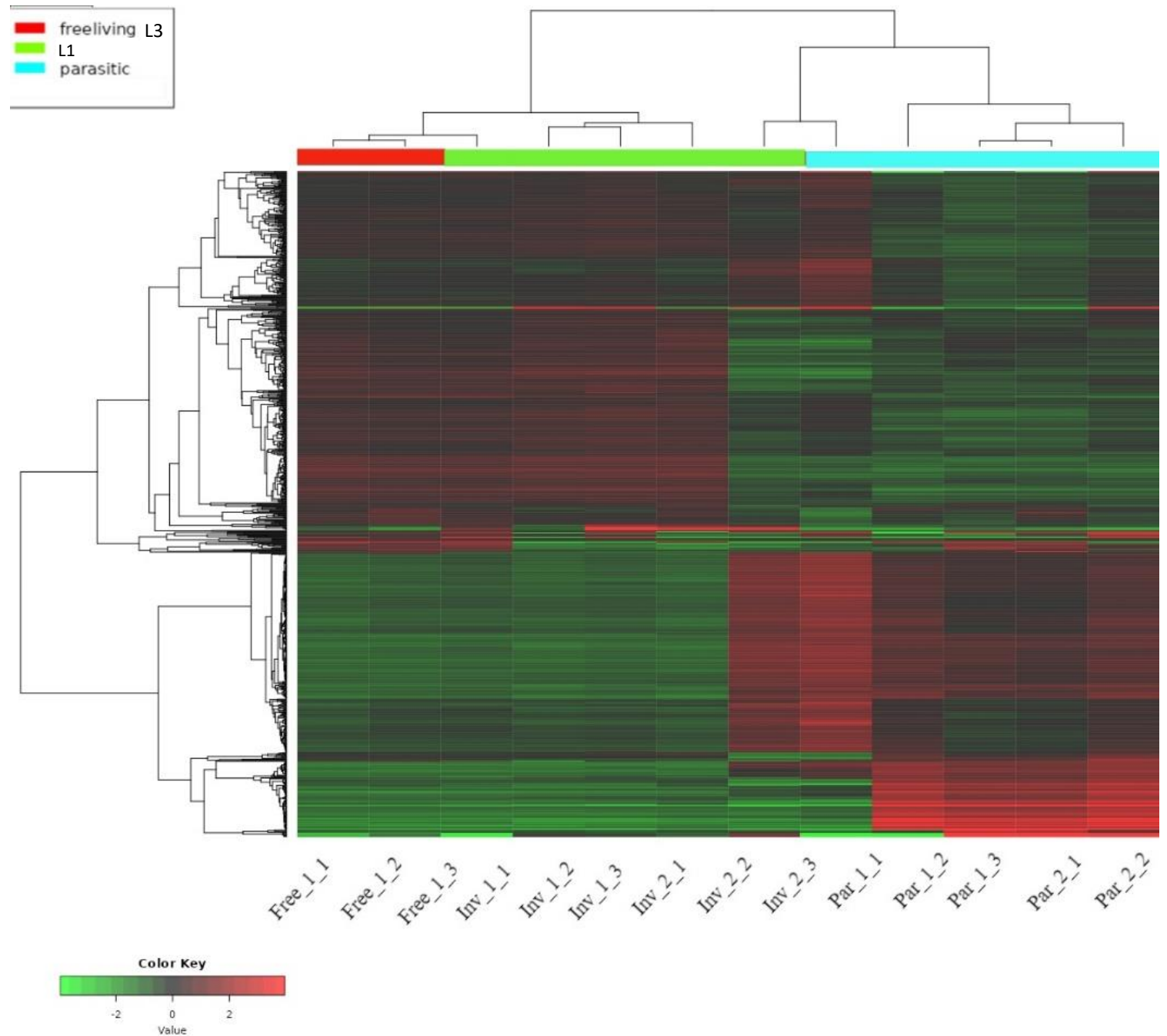
Повторности и количество ридов каждой стадии (миллионов пар оснований)



Полнота по BUSCO



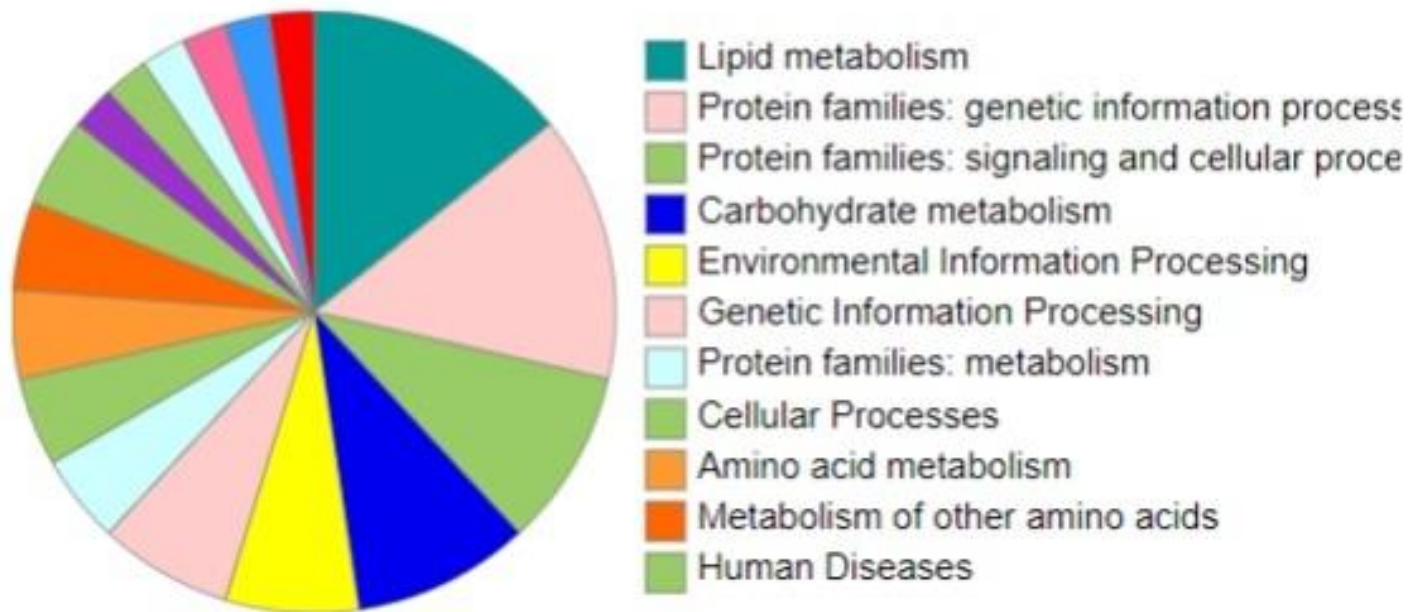
Тепловая карта
дифференциальной
экспрессии генов
на разных стадиях
жизненного цикла
R. bufonis (iDEP.96)



Аннотация дифференциально экспрессирующихся генов (по KEGG)

42 entries (18.8%) annotated

View Pathway only



Основные механизмы и пути, отличные между паразитической и свободноживущей стадиями (программный пакет BlastKoala)

Процессы и основные белки (гены) и пути метаболизма, участвующие в них (по KEGG).

Функции	Семейство генов
Проникновение в ткани хозяина	Пептидазы (dnpp-1, nas-6)
Окислительный стресс	Глутатион и тиоредоксин редуктазы (gsr-1, gpx-5, gst-8), пентозо-фосфатный путь (tkt-1)
Формирование мембран	Синтез и окисление жирных кислот (fadD, acs-17), сфингозина (sphk-1)
Активный рост, пролиферация клеток и формирование кутикулы	МАРК-путь (arr-1, pfn-2), инсулин-подобный гормон, кутикула (Y64G10A.7, gon-1)
Питание	Транспортеры олигопептидов (pept-2), жирных кислот (acs-22), расщепление гликогена (gyg-1, ipgm-1), эндоцитоз (epn-1, snx-1), метаболизм нуклеотидов (Y71H10B.1, let-754, ndk-1)

Процессы и пути метаболизма, меняющие активность (ортологи *C.elegans* по WormBase)

Процесс	Путь метаболизма, меняющий активность
Поведение	Глоточные сокращения*, синаптическая активность*
Транспорт	Экскреция*, захват тетрапирролов***, транспорт ионов металлов: Fe**, Ca*, кислорода*
Размножение	Дифференцировка ооцитов*
Взаимодействие со средой	Антимикробные гены*
Питание	Активность эндопептидаз*, убиквитина*, модификация пептидил-серин/тирозин***
Рост и деление клеток, линька	Формирование кутикулы*, конденсация хромосом**, деление ядра*, деление клеток*

*** - q-value < 0.00001

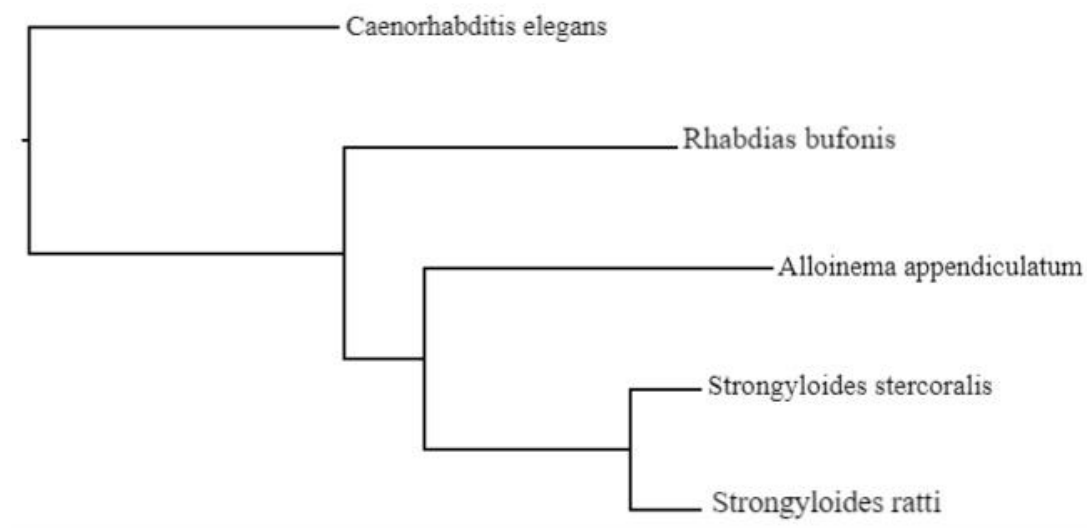
** - q-value < 0.0001

* - q-value < 0.001

Количество
ортогрупп с генами,
общими для каждой
пары видов.

Кладограмма,
показывающая
сходство *Rhabdias*
bufonis с
родственными
модельными видами
по группам
ортологичных генов

	<i>Alloinema appendiculatum</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Rhabdias bufonis</i>	<i>Strongyloides ratti</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Alloinema appendiculatum</i>	8323	5579	6390	6924	6839
<i>Caenorhabditis elegans</i>		9340	6196	6440	6360
<i>Rhabdias bufonis</i>			8277	7614	7514
<i>Strongyloides ratti</i>				9997	9639
<i>Strongyloides stercoralis</i>					9950



Гены, выявленные InterProScan

Astacins (Peptidase family M12A)

SCP/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7

Propyl endopeptidase family serine active site

Transthyretin-like family

Zinc finger, C4 type (two domains)

Allergen V5/Tpx-1 family signature

SignalP-TM

SignalP-noTM

Phloem filament protein PP1

Region of membrane-bound protein predicted to be outside the membrane, in the extracellular region

Region of membrane-bound protein predicted to be outside the membrane, in the cytoplasm

Выводы

1. Нематоды *Rhabdias bufonis* - удобный модельный объект для изучения особенностей паразитизма. Были разработаны методики сбора, культивирования и определения стадий жизненного цикла данного вида.
2. Анализ транскриптомов данного вида выявил кластеры генов, отличающихся по профилю экспрессии между стадиями развития.
3. Функциональный анализ KEGG показал, что такие процессы, как питание, рост, линька, изменяют активность на паразитической стадии.
4. Анализ ортологов *C.elegance* в WormBase показал возможные процессы, в которых участвуют дифференциально экспрессирующиеся гены *R. bufonis*, в их числе: захват тетрапиролов, конденсация хромосом, транспорт ионов металлов и др.
5. Анализ единичных ортологов при помощи InterProScan показал семейства генов с повышенным уровнем экспрессии на паразитической стадии. Данные о повышенной экспрессии генов семейства астацинов, SCP, пропил эндопептидаз и транстиретин-подобных белков коррелируют с данными полученными для нематод рода *Strongyloides*.

Перспективы

- Валидация результатов (Real-time PCR, in situ гибридизация)
- Более глубокий функциональный анализ генов. Получение геномных прочтений на платформе PacBio.

Благодарности

Грановичу Андрею Игоревичу

Ефейкину Борису Дмитриевичу

Крапивину Владимиру Александровичу

Спиридонову Сергею Эдуардовичу

Спасибо за внимание!
