DOI: 10.31016/978-5-9902341-5-4.2020.21.388-396

УДК 616.995.121;577.214

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО DIBOTHRIOCHEPHALLUS DENDRITICUS (CESTODA)

Сидорова Т. В. 1,

ведущий инженер лаборатории ихтиологии

Кутырев И. А.^{2,3},

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов, ikutyrev@yandex.ru

Хабудаев К. В. 1,

главный специалист по биоинформатике лаборатории ультраструктуры микроводорослей

Суханова Л. В. 1,

кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории ихтиологии

Дугаров Ж. Н.²,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов

Жепхолова О. Б.²,

ведущий инженер лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов

Мазур О. Е.²,

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов

Аннотапия

В ряде северных районов Сибири и в Прибайкалье основным возбудителем дифиллоботриоза человека и животных является лентец чаечный Dibothriochephallus dendriticus (син. Diphyllobothrium dendriticum). В последнее десятилетие усилился интерес к молекулам, синтезируемым паразитическими червями и способным модулировать иммунный ответа хозяев — млеко-

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, а/я 278)

² Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)

³ Иркутский государственный университет, НИИ биологии (664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3)

питающих, в частности, человека. Биоинформатический анализ транскриптомов дает возможность получить информацию о белках, синтезируемых в определенный момент времени и вычленить среди них наиболее значимые для иммуномодуляторных функций. Цель настоящих исследований - проведение транскриптомного анализа взрослых особей D. dendriticus. Взрослые лентецы D. dendriticus были извлечены из кишечника серебристых чаек. Суммарная РНК выделялась с помощью реагента TRIzol. Создавались направленные баркодированные транскриптомные библиотеки. Секвенирование полученных библиотек выполнялось на высокопроизводительном секвенаторе Illumina NextSeq550. На основе полученных данных произведена сборка транскриптома de-novo. Аннотирование полученных транскриптов проводилось с помощью программы Blast2Go. Аннотирование позволило определить их распределение по категориям: биологические процессы, молекулярные функции, клеточные компоненты. На следующем этапе собранный и аннотированный транскриптом плероцеркоидов D. dendriticus будет использован для поиска генов, потенциально кодирующих белки, оказывающие иммунорегуляторное воздействие на своих хозяев, а также для идентификации подобных белков в секретоме паразитов.

Ключевые слова: *Dibothriochephallus dendriticus*, транскриптом, секвенирование, сборка, аннотация.

TRANSCRIPTOME ANALASYS OF ADULT GULL-TAPEWORM DIBOTHRIOCHEPHALLUS DENDRITICUS (CESTODA)

Sidorova T. V. 1,

Biological Science Technician

Kutyrev I. A. 2, 3,

Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms, ikutyrev@yandex.ru

Khabudaev K. V. 1,

Bioinformatics Techician, Chief Specialist in Bioinformatics, Laboratory of Ultrastructure of Microalgae

Sukhanova L. V. 1,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Ichthyology

_

¹ Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033, Russia)

² Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047, Russia)

³ Institute of Biology at "Irkutsk State University" (3, Lenin st., Irkutsk, 664003, Russia)

¹³⁻¹⁵ мая 2020 года, Москва

Dugarov Zh. N.²,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms

Zhepkholova O. B.2,

Biological Science Technician, Senior Engineer, Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms

Mazur O. E.²,

Candidate of Biological Sciences, Researcher, Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms

Abstract

In certain regions of Siberia and Baikal area, the main causative agent of diphyllobothriasis of human and animals is gull-tipeworm Dibothriochephallus dendriticus. In last decade, there was heightened interest to the study of molecules secreted by helminth which can modulate the immune response of their mammal hosts, particularly human. Bioinformatic analysis of transcriptomes gives opportunity to obtain data on proteins synthetized in certain time point and find among them ones the most significant for immunological functions. The aim of our study was to carry out transcriptome analysis of adult D. dendriticus. Adult D. dendriticus were pulled from the gut of herring gull. Total RNA was extracted with TRIzol reagent. Bar-coding transcriptome libraries were created. Sequencing obtained libraries was carried out using high-performance sequencer Illumina NextSeq550. De-novo assembly of transcriptome was performed. Annotation of obtained transcripts was done with Blast2Go software. Annotation allowed to describe their classification in terms of biological processes, molecular functions, and cellular components. At the next step, we plan to use *D. dendriticus*, assembled and annotated with transcriptome of plerocercoids, to search genes, potentially coding proteins that have an immunomodulatory effect on their hosts and also for identification of the proteins in secretome of parasites.

Keywords: Dibothriochephallus dendriticus, transcriptome, sequencing, assembly, annotation.

Введение. В некоторых эндемичных регионах цестодозы по своему эпидемиологическому и эпизоотическому значению выходят на первый план среди остальных гельминтозов. В частности, во многих европейских странах широко распространены случаи дифиллоботриоза [1]. На территории России ежегодно дифиллоботриозом заболевает более 20 тысяч человек. В ряде северных районов Сибири и в Прибайкалье основным возбудителем дифиллоботриоза человека и

² Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047, Russia)

животных является лентец чаечный Dibothriochephallus dendriticus.

Гельминты являются мощными иммунорегуляторами [2]. Способность гельминтов регулировать иммунный ответ является основой их длительного существования в организме хозяина. В последнее десятилетие усилился интерес к молекулам, синтезируемым паразитическими червями, способным модулировать иммунный ответа хозяев — млекопитающих, в частности, человека [3]. Биоинформатический анализ транскриптомов дает возможность получить информацию о белках, синтезируемых в определенный момент времени и вычленить среди них наиболее значимые для иммуномодуляторных функций. Ранее нами уже был проведен транскриптомный анализ плероцеркоидов *D. dendriticus*. Цель настоящих исследований — проведение транскриптомного анализа взрослых особей *D. dendriticus*.

Материалы и методы. Взрослые лентецы *D. dendriticus* были извлечены из кишечника серебристых чаек, отмыты от содержимого кишечника в физиологическом растворе и зафиксированы в жидком азоте. Суммарная РНК из 0,5-1 г ткани выделялась с помощью реагента TRIzol (Ambion), доочищалась с одновременной обработкой ДНКазой I на колонках PureLink RNA Mini (Invitrogen). Качество РНК определялось на биоанализаторе BA2100 набором RNA Nano. Для создания направленных баркодированных транскриптомных библиотек использован набор TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina) с двойными индексами UD согласно протоколу изготовителя с модификациями для получения встроек большей длины (200-500 п.н.). Взято 1 мкг суммарной РНК, время фрагментации мРНК составило 4 мин. После амплификации библиотек дополнительно проводилась селекция по длине на магнитных частицах AMPureXP - к разбавленной библиотеке добавлялось 0,65 объёма AMPureXP. Качество и молярность полученных библиотек определялось на биоанализаторе ВА2100, библиотеки смешивались в эквимолярных количествах до суммарной концентрации 2 нМ. Секвенирование полученных библиотек выполнялось на высокопроизводительном секвенаторе Illumina NextSeq550 набором NextSeq® 550 High Output v2 Kit (300 cycles) парными чтениями по 150 п.н. На основе полученных данных произведена сборка de-novo с использованием программного пакета Trinityrnaseq. Аннотирование полученных транскриптов проводилось с помощью программы Blast2Go.

Результаты исследований. Было проведено полнотранскриптомное парноконцевое секвенирование; в результате секвенирования было

¹³⁻¹⁵ мая 2020 года, Москва

получено 111 304 624 парных чтения. На основе полученных данных секвенирования РНК произведена сборка de-novo. Статистика сборки приведена в табл. 1. Аннотирование полученных транскриптов (рис. 1А—1В) позволило определить их распределение по категориям: биологические процессы, молекулярные функции, клеточные компоненты. В биологических процессах преобладают транскрипты клеточных процессов (10%), метаболических процессов (8%), биологической регуляции (8%) и компонентов регуляции биологических процессов (8%). Среди молекулярных функций преобладают транскрипты связывания (60%), каталитической активности (31%) и активности по регуляции транскрипции (9%). В клеточных компонентах преобладают транскрипты цитоплазматических везикул (9%), клеточных выростов, связанных с плазматической мембраной (8%), цитоскелета (7%), нейронов (7%).

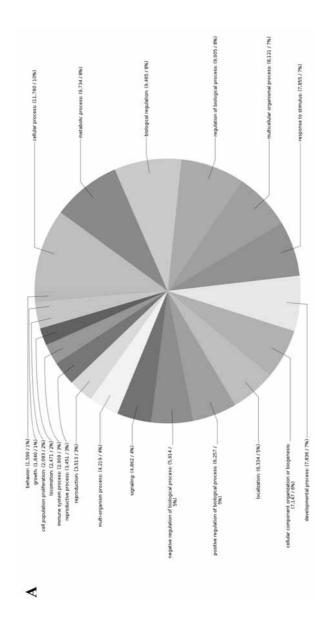
Таблица 1 **Статистика сборки de-novo транскриптома** *D. dendriticus*

n_seqs	smallest	largest	n_bases	mean_len	n_under_200	n50
130 761	280	25 470	150 124 911	1148,09	0	1841

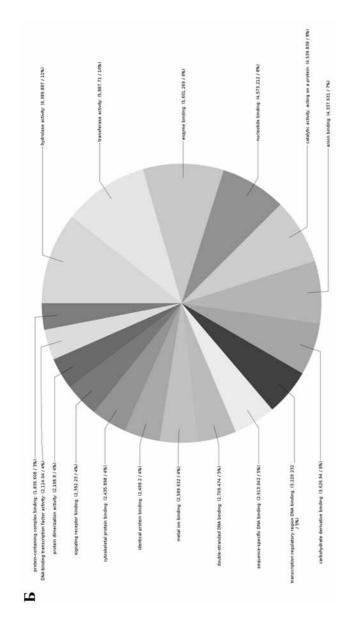
Заключение. На следующем этапе собранный и аннотированный транскриптом плероцеркоидов *D. dendriticus* будет использован для поиска генов, потенциально кодирующих белки, оказывающие иммунорегуляторное воздействие на своих хозяев, а также для идентификации подобных белков в секретоме паразитов. Кроме того, анализ транскриптомов цестод должен позволить идентифицировать различия в экспрессии генов, в том числе ответственных за иммунорегуляцию у цестод на разных стадиях жизненного цикла: у плероцеркоидов и половозрелых особей.

Авторы выражают благодарность Елизову А.В., Селиванову А.В., Попову А.Г., Никонову Д.П. (Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов, Республика Бурятия) за помощь в сборе материала; Помазному М.Ю. (ИЦиГ СО РАН), Нестеренко М.А. (СПбГУ) за консультативную помощь по методам секвенирования и транскриптомного анализа.

Работа выполнена в рамках темы госзадания (№ госрегистрации AAAA-A17-117011810039-4) и при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-34-20015) и Минобрнауки (№ темы госзадания FZZE-2020-0026).



Puc. 1A. Аннотация в терминах Gene Ontology. Классификация белков взрослых особей D. dendriticus в терминах молекулярных функций



Puc. 1Б. Аннотация в терминах Gene Ontology. Классификация белков взрослых особей D. dendriticus в терминах биологических процессов

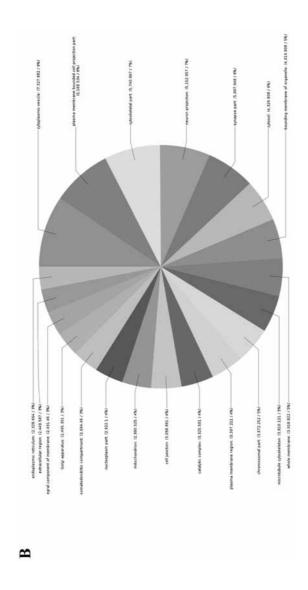


Рис. 1В. Аннотация в терминах Gene Ontology. Классификация белков взрослых особей D. dendriticus в терминах клеточных компонентов

Литература

- Dupouy-Camet J., Year H. Diphyllobothrium // Molecular detection of foodborne pathogens, London, New York: Taylor and Francis. 2010. P. 781– 788.
- 2. McSorley H.J., Hewitson J.P., Maizels R.M. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators // International Journal for Parasitology. 2013. V. 43. P. 301–310. DOI:10.1016/j.ijpara.2012.11.011
- 3. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity // Molecular and Biochemical Parasitology. 2009. V. 167. P. 1–11. DOI: 10.1016/j. molbiopara.2009.04.008

References

- 1. Dupouy-Camet J., Year H. Diphyllobothrium. *Molecular detection of foodborne pathogens*. London, New York: Taylor and Francis, 2010. P. 781–788.
- McSorley H.J., Hewitson J.P., Maizels R.M. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43:301–310. DOI:10.1016/j.ijpara.2012.11.011
- 3. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2009; 167:1–11. DOI: 10.1016/j. molbiopara.2009.04.008