

Тема работы.

Изучение молекулярной эволюции систем метаболизма гема и антиоксидантной системы у гельминтов

Состав коллектива: ФИО без сокращений, место работы/учёбы, учёные степени и звания. Опционально контактный адрес электронной почты.

Константинов Дмитрий Константинович; студент новосибирского государственного университета; б/с; б/з konstantinov@bionet.nsc.ru

Дорошков Алексей Владимирович; ассистент кафедры информационной биологии ФЕН НГУ; к.б.н. б/з; ad@bionet.nsc.ru

Научное содержание работы:

Постановка задачи.

Цель работы: изучить эволюцию ферментов метаболизма гема и антиоксидантной защиты у гельминтов.

Задачи:

- 1) На основе референсных белковых последовательностей модельных организмов провести широкомасштабный поиск генов, отвечающих за метаболизм гема и ферментов антиоксидантной системы у плоских и круглых червей.
- 2) На основе доступных данных полногеномных транскриптомных экспериментов оценить экспрессию найденных генов у свободноживущих и паразитических плоских червей.

Современное состояние проблемы (на момент начала работы).

На данный момент по различным данным от 50 до 500 миллионов человек заражены гельминтами (Keiser and Utzinger, 2009). У паразитических червей постепенно развивается устойчивость к лекарственным препаратам. В связи с этим разработка новых средств борьбы с гельминтами остается актуальной проблемой. Для успешной разработки новых антигельминтных средств необходимо подробное представление о функционировании системы паразит-хозяин (Geary et al., 2015). При переходе к паразитическому образу жизни значительно меняется как морфология (Poulin, Randhawa, 2015), так и биохимия исходного организма. Характерными приспособлениями к паразитизму на морфологическом уровне является редукция части органов, часто наблюдается усложнение жизненного цикла, включающего смену хозяев (Rohde 1994). Однако изменения, происходящие на молекулярно-генетическом уровне, при переходе к паразитическому образу жизни все еще недостаточно хорошо изучены (Geary et al., 2015).

Характерной особенностью пищеварения многих гельминтов является наличие продукта деградации гемоглобина – гема, который является чрезвычайно токсичным веществом. Он способствует образованию активных форм кислорода, которые являются инициаторами окислительного стресса

внутри организма (Kumar, Bandyopadhyay, 2005). Кроме того, внутренняя среда хозяина является агрессивной для паразита, что связано как с деятельностью иммунных клеток, которые продуцируют активные формы кислорода, так и с особенностями места обитания паразита (рН и т.д.).

Таким образом, антиоксидантная система и система метаболизма гема играют важную роль для выживания паразита-гематофага внутри организма-хозяина. На данный момент в базах данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), WormBase (parasite.wormbase.org), института Сэнгера (www.sanger.ac.uk/science/data) доступны геномы более 70 видов круглых и более 20 видов плоских червей. Для части видов имеются транскриптомные данные. Изучение эволюции отдельных ферментативных систем у данных видов позволит выявить тенденции перехода от свободноживущей к паразитической форме и также может быть использовано для выявления потенциальных мишеней антигельминтных препаратов в дальнейшем.

Список используемой литературы:

Keiser J., Utzinger J. Food-Borne Trematodiasis // *Clin Microbiol Rev.* 2009. Vol. 22, № 3. P. 466–483. DOI: 10.1128/CMR.00012-09

Geary T. G., Sakanari J. A., Caffrey C. R. Anthelmintic drug discovery: into the future // *Journal of Parasitology.* – 2015. – Т. 101. – №. 2. – С. 125-134.

Poulin R., Randhawa H. S. Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics // *Parasitology.* – 2015. – Т. 142. – №. S1. – С. S6-S15.

Rohde K. The origins of parasitism in the Platyhelminthes // *International Journal for Parasitology.* – 1994. – Т. 24. – №. 8. – С. 1099-1115.

Kumar, S., Bandyopadhyay, U., 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 157, 175–188.

Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

Анализ SRA файлов

Для анализа качества библиотек была использована программа FASTQC v0.11 (Andrews, 2010). В программе Trimmomatic-0.36 (Bolger 2014) были удалены даптеры при помощи функции HEADCROP и ILLUMINACLIP. Для удаления коротких ридов и ридов с низким качеством прочтения были использованы опции SLIDINGWINDOW:3:20 MINLEN:36 в программе Trimmomatic-0.36. Полученные данные были повторно проанализированы в программе FASTQC v0.11. Gff-файлы аннотации геномов плоских червей были взяты из базы данных WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). Референсная сборка генома браалась из базы WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>).

Для картирования полученных библиотек была использована программа STAR-2.5.4b (Dobin, 2015). Подсчет числа ридов, картированных на каждый ген, был выполнен при помощи программы subread из пакета featureCounts.

Уровни экспрессии были нормированы методом Transcripts Per Million (TPM) (Wagner et al., 2012) для сравнения библиотек внутри вида. Для сравнения между видами была выполнена дополнительная нормировка на ген актина.

Нормированные уровни экспрессии ортологов *Homo sapiens* были взяты из базы данных Expression Atlas (www.ebi.ac.uk/gxa/home), эксперимент E-GEOD-58387.

Список используемой литературы:

Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data //Bioinformatics. – 2014. – Т. 30. – №. 15. – С. 2114-2120.

Andrews S. et al. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. – 2010.

Dobin A., Gingeras T. R. Mapping RNA-seq reads with STAR //Current protocols in bioinformatics. – 2015. – Т. 51. – №. 1. – С. 11.14. 1-11.14. 19.

Wagner G. P., Kin K., Lynch V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples //Theory in biosciences. – 2012. – Т. 131. – №. 4. – С. 281-285.

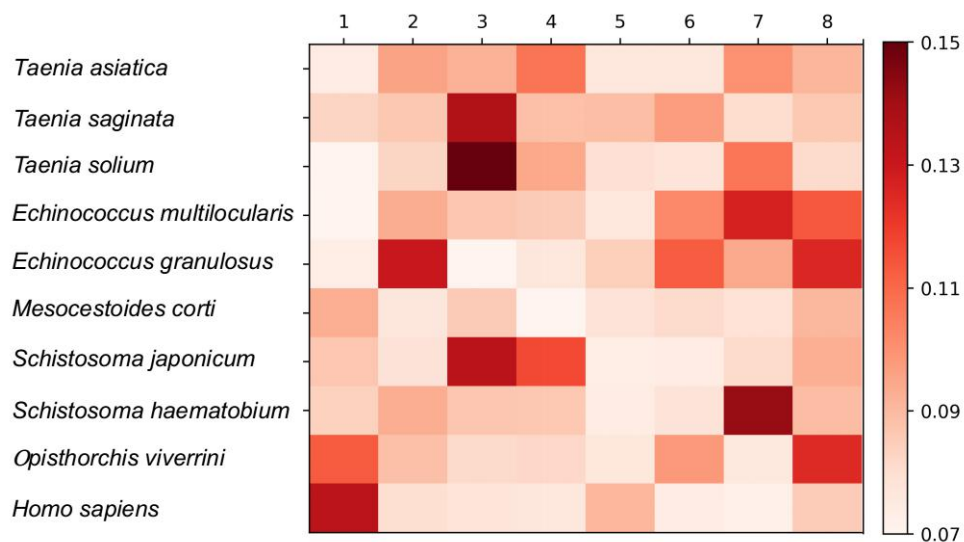
Полученные результаты.

1) Полный набор ферментов биосинтеза гема присутствуют в геномах паразитических и свободноживущих плоских червей. Доменная структура белков плоских червей совпадает с доменной структурой позвоночных животных. Все ферменты биосинтеза гема экспрессируются на половозрелой стадии развития у паразитических плоских червей и *Schmidtea mediterranea*.

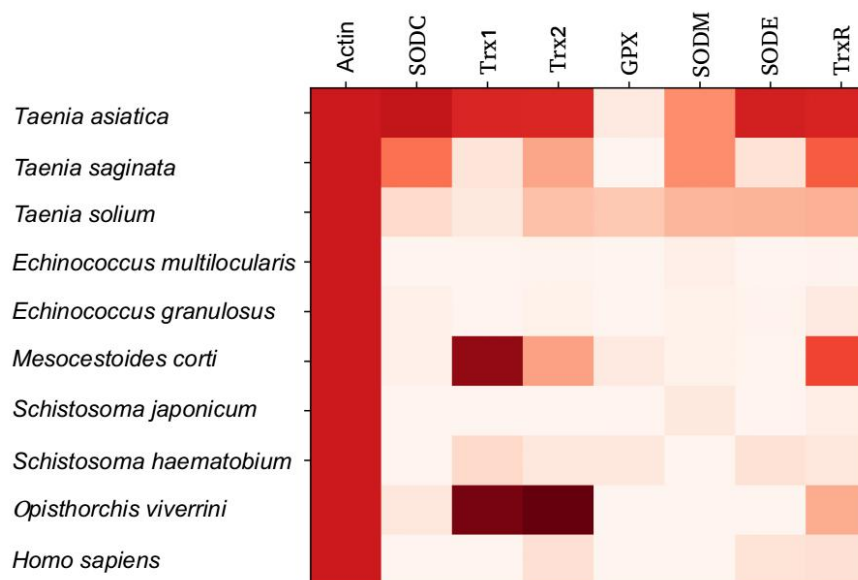
2) Ферменты феррохелатаза и протопорфириноген оксидаза, катализирующие седьмую и восьмую стадию биосинтеза гема, присутствуют у паразитических круглых червей отряда Spirurida и подотряда Panagrolaimomorpha. Данные белки вероятно получены путем горизонтального переноса генов от бактерий. У других видов круглых червей не выявлены ферменты биосинтеза гема.

3) Антиоксидантная система плоских и круглых червей состоит из меньшего количества ферментов чем у позвоночных животных. Фермент каталаза отсутствует в геноме у паразитических плоских червей. Внеклеточные супероксиддисмутазы отсутствуют у плоских червей подкласса Eucestoda и у части круглых червей класса Euploea, а у плоских червей подкласса Digenea выявлены события дупликации. Глутатион пероксидаза представлена одним геном у плоских червей и двумя копиями у круглых червей. Объединение ферментов тиоредоксин редуктазы и глутатион редуктазы в один фермент тиоредоксин-глутатион редуктазы произошло у предка круглых и плоских червей, который существовал около 550 миллионов лет назад.

Иллюстрации, визуализация результатов.



Тепловая карта уровней экспрессии генов восьми стадий биосинтеза гема, на стадии мариты у изучаемых плоских червей



Тепловая карта уровней экспрессии генов антиоксидантной системы, на стадии мариты у изучаемых плоских червей

Эффект от использования кластера в достижении целей работы.

Отдельные этапы работы требовали единовременное выделение порядка 100 Гб оперативной памяти, В связи с чем проведение таких расчетов на личных компьютерах не представлялось возможным. Часть результатов дипломной работы были получены на кластере НГУ.