

# Эволюция криптобиоза у *Polypedilum vanderplanki*: роль горизонтального переноса генов от бактерий

Е.И.  
Шагимарданова  
КФУ, Казань  
[rjuka@mail.ru](mailto:rjuka@mail.ru)

Т. Кикавада  
NIAS, Tsukuba,  
Japan  
[kikawada@affrc.go.jp](mailto:kikawada@affrc.go.jp)

М.Р. Шарипова  
КФУ, Казань  
[Marsharipova@gmail.com](mailto:Marsharipova@gmail.com)

О.А. Гусев  
КФУ, Казань  
[ogusev@mail.ru](mailto:ogusev@mail.ru)

## Аннотация

*Некоторые живые эукариоты, например африканская хирономида Polypedilum vanderplanki способны выживать в условиях полной потери воды, впадая в состояние гипометаболизма - криптобиоз. Секвенирование генома спящей хирономиды позволило определить основные молекулярные механизмы криптобиоза. Из более чем 17 тысяч идентифицированных генов были обнаружены кодирующие нуклеотидные последовательности нетипичные для насекомых. В данной работе проведена оценка вероятности горизонтального переноса генов в геном P. vanderplanki от микроорганизмов. Идентифицировано несколько функционально-активных генов имеющих высокую степень сходства с бактериальными гомологами и формирующих монофилетичную ветвь при построении филогенетического древа. Среди этих генов выделяется группа лектинов, и фермент кинурениназа, в отношении которых получены строгие доказательства их возникновения путем горизонтального переноса.*

## 1. Введение

Горизонтальный перенос генов – процесс интеграции экзогенной ДНК в клетки организма-реципиента. В отличие от наследования генетической информации по вертикали от родителей к потомству, в процессе горизонтального переноса обмен ДНК может быть осуществлен между разными видами организмов.

Теоретически, любая фракция чужеродной ДНК может быть включена в геном, однако чаще всего это происходит при наличии определенных последовательностей – IS-элементов, транспозонов и др [1-3]. Механизмы горизонтального переноса генов достаточно хорошо изучены для бактерий. Этот процесс у прокариот считается одним из основных механизмов приобретения новых признаков. Масштабное секвенирование геномов различных таксонов привело к описанию случаев переноса генов у эукариотических организмов, включая растения, беспозвоночных, млекопитающих. В частности, после секвенирования генома человека наблюдался своеобразный ажиотаж по идентификации горизонтально-приобретенных генов. Большинство случаев было впоследствии опровергнуто [4]. Большое количество ложноположительных результатов является следствием микробной контаминации геномной ДНК при секвенировании и неверной аннотации полученных последовательностей. Кроме того, заключение часто делалось на основе наиболее близких по результатам поиска гомологичных последовательностей методом BLAST. В связи с этим для признания гена горизонтально приобретенным, необходимо учитывать информацию о содержании ГЦ пар, количестве интронов, хромосомной локализации, транскрипционной активности. Наиболее объективным подходом для определения случаев и направления горизонтального переноса генов считается филогенетический анализ [4]. В некоторых работах заключение о принадлежности генов к горизонтально-приобретенным делалось на основе поиска максимальной гомологии с бактериальными генами в

базах данных. При этом в списке имелись и эукариотические последовательности с достаточно высокой степенью гомологии [5]. При правильном выравнивании этих последовательностей филогенетическое дерево свидетельствовало о монофилии гена-кандидата с эукариотами [4]. В данном исследовании проводили поиск вероятных событий горизонтального переноса генов у криптобиотической хирономиды *Polypedilum vanderplanki*. Личинки этого организма обитают во временных водоемах засушливых регионов Африки. При наступлении продолжительного засушливого сезона личинки хирономиды впадают в аметаболическое состояние, т.н. ангидробиоз [6,7]. После того как вода становится доступной, личинки способны восстановить метаболизм в течение часа и продолжить нормальный жизненный цикл [8]. Примечательно, что *P. vanderplanki* является единственным организмом, в роде *Polypedilum* и единственным насекомым, способным к формированию ангидробиоза. Эволюция этого феномена у хирономиды является одной из самых интригующих загадок современной биологии. Наличие технологии лабораторного культивирования вида делает *P. vanderplanki* идеальным модельным организмом для изучения устойчивости к обезвоживанию. В последние годы зарегистрировано несколько случаев горизонтального переноса генов, отвечающих за адаптацию к неблагоприятным факторам среды у эукариот, живущих в экстремальных условиях [9, 10]. Более того, описан случай встраивания целого генома паразитической бактерии рода *Wolbachia* в геном дрозофиллы. Часть этих генов активно транскрибируется и оказывает значительное влияние на хозяина [11]. С одной стороны, горизонтальный перенос может быть важным механизмом эволюции адаптаций к различным экологическим условиям. Альтернативная гипотеза предполагает, что криптобиоз облегчает включение чужеродной ДНК в геном хозяина. Показано, что при криптобиозе ДНК хирономиды подвергается множественным двуцепочечным разрывам и восстанавливается через 3 дня после регидратации [12]. Можно предполагать, что у хирономид имеется аналог Sos- репарации у бактерий и молекулы чужеродной ДНК внедряются в процессе восстановления целостности ДНК. Завершение секвенирования генома хирономиды позволило оценить вклад событий горизонтального переноса генетического материала в формирование криптобиоза.

## 2. Поиск генов-кандидатов и их филогенетический анализ

Было осуществлено кросс-платформенное (Illumina HiSeq, Roche SOLID 4, 454, RS PacBio) секвенирование геномной ДНК *P.* с финальным покрытием 1000x и последующей сборкой генома с использованием программы Platanus и коррекцией скаффолдов данными PacBio. Общий размер 9380 полученных скаффолдов

составил 123,5 миллионов пар нуклеотидов, что соответствовало данным цитометрической оценке размера генома. В результате полномасштабного секвенирования генома и транскриптома криптобиотической хирономиды было идентифицировано 17 824 гена. Для того, чтобы можно было использовать методы сравнительной геномики, также было проведено секвенирование генома родственной хирономиды *P. nubifer*, не способной к индукции ангидробиоза, у которой было идентифицировано 17 224 гена (Гусев с соавт., неопубликованное). Первоначальную идентификацию нуклеотидных последовательностей нетипичных для насекомых и их принадлежность к определенному филогенетическому таксону определяли при помощи программной среды MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov>). Эта программная среда позволяет определить таксономическую принадлежность нуклеотидных последовательностей в общем пуле секвенированных последовательностей. Показано, что около 8% последовательностей имеют бактериальное происхождение и чуть менее 2% принадлежат к группе архей. Большинство идентифицированных микробных последовательностей принадлежат либо к ассоциированной микрофлоре либо являются результатом контаминации геномной ДНК хирономиды. Для идентификации генов, которые могли быть результатом латерального переноса был проведен автоматический анализ помощью программного обеспечения SILSE (<http://eebweb.arizona.edu/sicle/>). На данном этапе для анализа использовали виды организмов, геномы которых полностью секвенированы и доступны для скачивания на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Было определено 1748 генов формирующих монофилетические ветви с микробными (а не эукариотическим) последовательностями в геноме *P. vanderplanki* и 1385 генов в геноме *P. nubifer*. На следующем этапе был проведен Blastx анализ первичной последовательности каждого гена кандидата с последовательностями, имеющимися в базе данных NCBI. Данные белковых последовательностей, находящихся в базе данных были разделены на 7 групп: эубактерии, археи, грибы, растения, артроподы, остальные метазоа и другие. В качестве порога достоверности использовали значение  $e\text{-value} \leq 10^5$  и идентичностью  $\geq 25\%$ . Отбирались гены, демонстрирующие максимальную степень сходства с прокариотическими последовательностями. Гены, имеющие высокую степень сходства с насекомыми и другими представителями метазоа исключались из дальнейшего анализа. Определение консервативных доменов было проведено с помощью программной среды DTT [13]. После этапа поиска гомологии потенциально горизонтально перенесенных генов вручную, количество генов-кандидатов в геноме *P. vanderplanki* снизилось до 37.

Гены-кандидаты и их гомологи у прокариот были использованы для построения филогенетических

деревьев. Принадлежность генов к горизонтально-перенесенным из бактерий или архей или нет определяли согласно предыдущему исследованию, в котором было определено шесть моделей гипотетических филогенетических деревьев [4]. Вырывание последовательностей и построение филогенетических деревьев было проведено с использованием программного обеспечения CLC Main Workbench ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)) и MEGA 5.1. (<http://www.megasoftware.net/>). Для определения вероятных событий горизонтального переноса генов использовали критерий монофилетичности гена-кандидата с бактериальными гомологами. Чтобы исключить вероятность того, что гены-кандидаты являются результатом контаминации геномной ДНК хирономиды при секвенировании использовали критерий наличия или отсутствия экспрессии, определенной с помощью технологии mRNA-seq с критерием “RPKM>3”. Методика создания библиотек mRNASeq включала отбор по наличию *polyA*, что позволило исключить гены экспрессирующиеся в бактериях-контаминантах. Дополнительным признаком перенесенных генов служил %ГЦ гена кандидата, отличный от такового среднего значения %ГЦ остальных генов в геноме хирономиды.

При правильном выравнивании, построение филогенетических деревьев свидетельствует о монофилетичности с микробными последовательностями генов, кодирующих лектины у *P. vanderplanki*. Кроме того, по ГЦ-составу эти гены отличаются от среднего значения встречаемости ГЦ-пар в геноме криптобиотической хирономиды. В геноме хирономиды обнаружено 13 генов, имеющих консервативные домены лектинов и лектиноподобных белков. Лектины являются сахаросвязывающими белками и выполняют различные функции в клетках животных организмов от адгезии до роли в формировании иммунной системы [14]. Лектины также часто встречаются в семенах высших растений, что свидетельствует об их роли в выживаемости семян или в их прорастании [15]. Семена можно рассматривать как форму криптобиоза у растений, что также свидетельствует в пользу гипотезы о роли лектинов в формировании криптобиоза. Более того имеются свидетельства того, что лектины были горизонтально заимствованы у других видов – ангидробионтов [16]. Показано также, что лектиноподобные белки были латерально перенесены у рыб и играют роль в устойчивости к низким температурам. Способность выживать при пониженных температурах окружающей среды – криобиоз – является разновидностью криптобиоза. Поиск лектинов в геноме некриптобиотической хирономиды *P. nubifer* и их филогенетический анализ не выявил генов, которые вероятно были заимствованы у микроорганизмов.

При построении филогенетических деревьев и использовании критерия монофилетичности с микробными последовательностями гена-кандидата было показано, что мульти-экзонный ген кинурениназы

*kynU* был заимствован по механизму горизонтального переноса. Этот фермент ответственен за гидролиз кинуренина и 3-гидроксикинуренина до антраниловой кислоты и 3-гидроксиантраниловой кислоты, соответственно, и располагается в геноме хирономиды в кластере типичных генов артропод. *KynU* является геном, характерным для микроорганизмов и животных, но не насекомых. Недавно было показано, что этот ген есть в геноме шелкопряда *Bombix mori* и является результатом горизонтального переноса, но потенциальный бактериальный источник отличается для кунурениназа шелкопряда и хирономиды [17, 18].

Вследствие этого у шелкопряда и, вероятно, у хирономиды путь кинуренина отличается от такового у других насекомых.

Аналогично, гистон H2A имеет признаки латерально-перенесенного гена в геном криптобиотической хирономиды.

После детального анализа каждого гена кандидата, было сделано заключение, что только 12 генов имеют строгие доказательства возникновения в геноме в результате процесса горизонтального переноса. 10 из них кодируют лектины и лектиноподобные белки, подтверждая функцию последних в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам среды, в частности к обезвоживанию и низким температурам. Вероятно, дальнейший поиск позволит идентифицировать новые гены-кандидаты, эволюция которых шла по пути горизонтального переноса, а не вертикального наследования. Однако, вряд ли можно ожидать открытия массивного включения чужеродной ДНК в геном хирономиды.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 12-04-97071-р\_поволжье и грантом Федеральной Целевой Программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг № 14.A18.21.0201.

## Список литературы

- [1] I.G. Hoi, S.H. Kim, *Global extent of horizontal gene transfer*. Proc Natl Acad Sci USA (2007), 4489-4494.
- [2] C Gilbert, S Schaack, J.K. Pace, P.J. Brindley, C.A. Feschotte, *A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla*. Nature (2010), 1347-1350.
- [3] D.S. Kim, Y. Lee, Y. Hahn. *Evidence for bacterial origin of heat shock RNA-1*. RNA (2010), 274-279.
- [4] M.J. Stanhope, A. Lupas, M.J. Italia, K.K., Koretke, C. Volker, J.R. Brown. *Phylogenetic analyses do not support horizontal gene transfer from bacteria to vertebrates*. Nature (2001), 940-944.
- [5] International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature (2001), 860-921.
- [6] J.S. Clegg. *Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization*. Comp Biochem Physiol B. (2001), 613-624.
- [7] L. Rebecchini, T. Altiero, R. Guidetti. *Anhydrobiosis: the extreme limit of dessication tolerance*. Invert Surv J. (2007), 65-81.
- [8] M. Watanabe. *Anhydrobiosis in invertebrates*. Appl. Entom. and Zool. (2006), 15-31.

- [9] E. Gladyshev., M. Meselson., I.R. Arkhipova. *Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers*. Science. 30 (2008), 1210-1213.
- [10] G.Schönknecht, W-H. Chen, C. M. Ternes, et al., *Gene transfer from bacteria and archaea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote*. Science. (2013), 1207-1210.
- [11] J.C. Hotopp, M.E. Clark, D.C. Oliveira, J.M. Foster, P. Fischer, M.C. Muñoz Torres, J.D. Giebel, N. Kumar, N. Ishmael, S. Wang, J. Ingram, R.V. Nene, J. Shepard, J. Tomkins, S. Richards, D.J. Spiro, E. Ghedin, B.E. Slatko, H. Tettelin, J.H. Werren. *Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes*. Science. (2007), 1753-1756.
- [12] O. Gusev, Y. Nakahara, V. Vanyagina, L. Malutina, R. Cornette, T. Sakashita, N. Hamada, T. Kikawada, Y. Kobayashi, T. Okuda. *Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance*. PLoS ONE (2010), e14008.
- [13] A. Marchler-Bauer, S. Lu, J.B. Anderson, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J.H. Fong, L.Y. Geer, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, J.D. Jackson, Z. Ke, C.J. Lanczycki, F. Lu, G.H. Marchler, M. Mullokandov, M.V. Omelchenko, C.L., .Robertson, J.S. Song, N. Thanki, R.A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng, S.H. Bryant. *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins*. Nucleic Acids Res. (2011), 225-229.
- [14] L. Halina; N. Sharon. *Lectins* (Second ed.). Berlin: Springer, 2007, pp. 6605-6608.
- [15] S.S. Komath, M. Kavitha, M.J. Swamy. *Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research*. Org. Biomol. Chem. (2006), 973–988.
- [16] W. Reardon, S.Chakrabortee, T.C. Pereira, T. Tyson, M.C. Banton, M. Katharine, B.A. Culleton, M. J. Wise, A.M. Burnell, A. Tunnacliffe. *Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode Aphelenchus avenae*. BMC Molecular Biology (2010), doi: 10.1186/1471-2199-11-6.
- [17] Y. Meng, S. Katsuma, K. Mita, T. Shimada. *Abnormal red body coloration of the silkworm, Bombyx mori, is caused by a mutation in a novel kynureninase*. Genes Cells. (2009), 129–140.
- [18] Z.W. Li, Y.H. Shen, Z.H. Xiang, Z. Zhang. *Pathogen-origin horizontally transferred genes contribute to the evolution of Lepidopteran insects*. BMC Evol Biol. (2011), doi: 10.1186/1471-2148-11-356.