

Особенности вторичной структуры спейсерного участка ITS2 рРНК трематод надсемейства Echinostomatoidea

Калинина К.А.^{1, 2*}, Татонова Ю.В.^{1, 2}, Щелканов М.Ю.^{1, 2}

¹ ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

² Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

*zzzssssqqq@yandex.ru

Ключевые слова: Echinostomatoidea; *Psilotrema*; *Sphaeridiotrema*; *Echinochasmus*; ITS2; филогенетика; вторичные структуры

Мотивация и цель: Echinostomatoidea – это большая космополитическая группа дигенеев, которые имеют сложный жизненный цикл с одним или несколькими промежуточными и окончательными хозяевами. Промежуточными хозяевами служат различные виды моллюсков, рыбы и амфибии [1–3]. Подавляющее большинство трематод этой группы в качестве окончательного хозяина используют птиц, а также млекопитающих, рептилий и рыб [1, 2, 4]. Некоторые виды были зарегистрированы у человека, что повышает эпидемиологическую значимость данной группы трематод [5] и интерес к изучению разных аспектов выживаемости и адаптации этих паразитов. Одно из таких направлений – это изучение транскрибируемых спейсерных регионов. Они являются важным компонентом процессинга рРНК и биогенеза активных рибосомных субъединиц, в связи с этим получение и анализ вторичных структур этих участков востребованы для понимания биологической роли этих молекул [6]. Эта информация, в свою очередь, может быть полезна для понимания формирования адаптаций разных групп паразитов. Поэтому целью данной работы стало изучение вторичных структур участка ITS2 рРНК для трематод надсемейства Echinostomatoidea.

Методы и алгоритмы: Для бионформатического анализа были использованы виды *Echinochasmus pseudobeleocephalus* [7], *Sphaeridiotrema ussuriensis*, *S. aziaticus*, *S. pyriforme* и *Psilotrema limosum* [8]. Выделение ДНК проводили методом HotSHOT [9]. Далее все образцы были амплифицированы и секвенированы по Сэнгеру. Выравнивание нуклеотидных последовательностей произведено с помощью двух методов: ClustalW [10] и T-coffee [11]. Филогенетические конструкции построены с использованием байесовского вывода (BI) в программе MrBayes 3.1.2 [12] и алгоритма максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML 3.1 [13]. Для построения вторичных структур спейсерного участка ITS2 использованы веб-серверы: UNAFold, RNAfold и NUPACK. Для сравнительного анализа были также изучены нуклеотидные последовательности других представители надсемейства из базы данных NCBI (GenBank).

Результаты: Филогенетический анализ на основе последовательностей участка ITS2 рДНК показал, что положение всех семейств на реконструкциях совпадает с данными, полученными Ткачом и соавторами по гену 28S рРНК [4]. Узлы имеют

относительно высокие значения статистических поддержек, а генетические дистанции имеют широкий диапазон межродовых отличий (47–61 %).

Согласно ранее опубликованным данным, пространственное строение участка ITS2 рРНК для большинства трематод имеет типичную четырехдоменную структуру [14]. Но мы обнаружили, что в некоторых случаях структура может быть вариабельна. Это зависит от длины последовательности: чем она длиннее, тем больше петельных доменов присутствует в смоделированной структуре. На разработанной нами общей модели вторичной структуры для надсемейства Echinostomatoidea наиболее консервативными являются первый и второй домены. **Выводы:** Несмотря на то что маркер ITS2 рДНК во многих группах трематод не подходит для проведения филогенетического анализа, например, в надсемействе Opisthorchioidea [15], он дает хорошие результаты при оценке филогенетических отношений внутри надсемейства Echinostomatoidea, как было показано ранее для семейств Echinostomatidae [16] и Echinochasmidae [17]. В настоящей работе филогенетические реконструкции по участку ITS2 рДНК позволили уточнить таксономический статус некоторых представителей надсемейства Echinostomatoidea, а морфологические особенности вторичной структуры рРНК подтвердили возможность использования маркера для дальнейшего изучения этой группы трематод.

Финансирование: Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031000154-4) и государственного задания № 123022200035-0 «Структура природных очагов паразитарных заболеваний на юге Дальнего Востока России».

Features of the secondary structure of the ITS2 rRNA spacer region of trematodes from the superfamily Echinostomatoidea

Kalinina K.A.^{1, 2*}, Tatonova Y.V.^{1, 2}, Shchelkanov M.Y.^{1, 2}

¹ G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, Russia

² Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of East Asia, FEB RAS, Vladivostok, Russia

* zzzzssssqqq@yandex.ru

Key words: Echinostomatoidea; *Psilotrema*; *Sphaeridiotrema*; *Echinochasmus*; ITS2; phylogenetics; secondary structures

Motivation and Aim: The Echinostomatoidea are a large cosmopolitan group of digeneans that have a complicated life cycle with one or more intermediate and definitive hosts. Intermediate hosts serve as various species of mollusks, fish and amphibians [1–3]. The vast majority of trematodes in this group use birds, as well as mammals, reptiles and fish as the definitive host [1, 2, 4]. Some species have been recorded in humans, which increase the epidemiological significance of this group of trematodes [5] and interest in studying different aspects of the survival and adaptation of these parasites. One of such areas is the study of transcribed spacer regions. They are very important for rRNA processing and the biogenesis of active ribosomal subunits; therefore, obtaining and analyzing the secondary structures of these regions is in demand for understanding the biological role of the analyzed molecules [6]. Based on mentioned above, the aim of

this work is to analyze the features of secondary structures of the ITS2 rRNA region for trematodes of the superfamily Echinostomatoidea.

Methods and Algorithms: The species *Echinochasmus pseudobeleocephalus* [7], *Sphaeridiotrema ussuriensis*, and *S. aziaticus*, *S. pyriforme* and *Psilotrema limosum* [8] were used for bioinformatics analysis. The HotSHOT method [9] was used for DNA extraction. Further, all the samples were amplified and sequenced. Alignment of the nucleotide sequences was performed using ClustalW [10] and T-coffee [11]. Phylogenetic trees were constructed using Bayesian inference (BI) in MrBayes 3.1.2 [12] and maximum likelihood (ML) in PhyML 3.1 [13]. Secondary structures of the ITS2 spacer region were created using the following web servers: UNAFold, RNAfold, and NUPACK. For comparative analysis, the nucleotide sequences of other representatives of the superfamily from the GenBank were also studied.

Results: Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of ITS2 rRNA region showed that the position of all families in the obtained reconstructions is similar to data obtained by Tkach and co-authors based on the 28S rRNA gene [4]. Nodes have relatively high statistical support values, and genetic distances have a wide range of intergeneric differences (47–61 %).

According to previously published data, the spatial structure of the ITS2 rRNA region has a typical four-domain structure for most trematodes [14]. But we found that the structure is variable in some cases. This variability depends on the length of the sequence: the longer it is the more loop domains are present in the modeled structure. Based on the general secondary structure model developed for the superfamily Echinostomatoidea, the first and second domains are the most conservative.

Conclusion: Although the ITS2 rDNA marker is not suitable for phylogenetic analysis in many trematode groups, for example, in the superfamily Opisthorchioidea [15], it presented good results in assessing phylogenetic relationships within the superfamily Echinostomatoidea, as previously shown for the families Echinostomatidae [16] and Echinochasmidae [17]. In this study, the obtained phylogenetic reconstructions using ITS2 rDNA made it possible to clarify the taxonomic status of some representatives of the superfamily Echinostomatoidea, and the morphological features of the secondary structure of rRNA confirmed the possibility of using the marker for further study of this group of trematodes.

Funding: The research was carried out within the framework of the state assignment from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (topic No. 121031000154-4) and government assignment no. 123022200035-0 “The structure of natural foci of parasitic diseases in the south of the Russian Far East”.

Список литературы/References

1. Догель В.А. Зоология беспозвоночных. Москва: Высшая школа, 1981 [Dogel V.A. Invertebrate zoology. Moscow: Vysshaya shkola, 1981 (in Russian)]
2. Галактионов К.В. Эволюция и биологическая радиация трематод: краткий очерк идей и мнений. Гл. II. Труды Зоологического института РАН. 2016;320(S4):74-126 [Galaktionov K.V. Evolution and biological radiation of trematodes: a brief outline of ideas and opinions. Chapter II. *Trudy Zoologicheskogo Instituta RAN*. 2016;320(S4):74-126 (in Russian)]
3. Щелканов Е.М., Тишина Е.А., Мануков Ю.И., Сапрыкин В.П. Биотрансформация ксенобиотиков моллюсками (Mollusca L., 1758) – индикаторами состояния водных экосистем. *Географическая среда и живые системы*. 2024(3) [Shchelkanov E.M., Tishina E.A., Manukov Y.I., Saprykin V.P. Biotransformation of xenobiotics by mollusks (Mollusca L., 1758) – indicators of the state of aquatic ecosystems. *Geograficheskaya sreda i zhivyye sistemy* 2024(3) (in Russian)]

4. Tkach V.V., Kudlai O., Kostadinova A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *Int J Parasitol.* 2016;46(3):171-185
5. Sayasone S., Tesana S., Utzinger J., Hatz C., Akkhavong K., Odermatt P. Rare human infection with the trematode *Echinochasmus japonicus* in Lao PDR. *Parasitol Int.* 2020;5(1):106-109
6. Tatonova Y.V., Chelomina G.N., Besprosvannykh V.V. Genetic diversity of nuclear ITS1–5.8S–ITS2 rDNA sequence in *Clonorchis sinensis* Cobbold, 1875 (Trematoda: Opisthorchidae) from the Russian Far East. *Parasitol Int.* 2012;61:664-674
7. Kalinina K.A., Besprosvannykha V.V., Tatonova Y.V., Shchelkanov M.Y. A Description of *Echinochasmus pseudobeleocephalus* n. sp. (Echinochasmidae) based on morphological and molecular data. *Animals (Basel).* 2023;13(20):3236
8. Kalinina K.A., Tatonova Y.V., Besprosvannykha V.V. New species of *Psilotrema* and *Sphaeridiotrema* (Psilostomidae Odhner, 1913) in the east Asian region: Morphology of developmental stages and genetic data. *Parasitol Int.* 2022;88:102-554
9. Truett G.E., Heege P., Mynatt R.L., Truett A.A., Walker J.A., Warman M.L. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques.* 2000;29:52-54
10. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-2948
11. Notredame C., Higgins D.G., Heringa J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment 1. *J Mol Biol.* 2000;302(1):205-217
12. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572-1574
13. Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010;59(3):307-321
14. Morgan A.T., Blair J.D. Trematode and monogenean rRNA ITS2 secondary structures support a four-domain model. *J Mol Evol.* 1998;47:406-419
15. Thaenkhama U., Blair D., Nawaa Y., Waikagula J. Families Opisthorchiidae and Heterophyidae: Are they distinct? *Parasitol Int.* 2012;61(1):90-93
16. Izrailskaia A.V., Besprosvannykh V.V., Tatonova Y.V. *Echinostoma chankensis* nom. nov., other *Echinostoma* spp. and *Isthmiophora hortensis* in East Asia: Morphology, molecular data and phylogeny within Echinostomatidae. *Parasitology.* 2021;148(11):1366-1382
17. Tatonova Y.V., Izrailskaia A.V., Besprosvannykh V.V. *Stephanoprora amurensis* sp. nov., *Echinochasmus milvi* Yamaguti, 1939 and *E. suifunensis* Besprosvannykh, 1991 from the Russian southern Far East and their phylogenetic relationships within the Echinochasmidae Odhner 1910. *Parasitology.* 2020;147(13):1469-1479