



IX Международная научно-практическая конференция

«Морские исследования и образование»

**IX International conference
«Marine Research and Education»**

MARESEDU-2020



**ТРУДЫ КОНФЕРЕНЦИИ / CONFERENCE
PROCEEDINGS
Том I (III) / Volume I (III)**

26-30 октября 2020 г.

УДК [551.46+574.5](063)

ББК 26.221я431+26.38я431+28.082.40я431

T78

Труды IX Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2020)» Том I (III): [сборник]. Тверь: ООО «ПолиПРЕСС», 2020, 362 с.: ISBN 978-5-6045536-3-3.

Сборник «Труды IX Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2020)» представляет собой книгу тезисов докладов участников конференции, состоящую из трех томов. Сборник включает в себя главы, соответствующие основным секциям технической программы конференции: океанология, гидрология, морская геология, морская биология, геофизические исследования на акваториях, геофизика, рациональное природопользование и подводное культурное наследие.

Все тезисы представлены в редакции авторов.

В рамках конференции участники обсудили состояние и перспективы развития комплексных исследований Мирового океана, шельфовых морей и крупнейших озер, актуальные проблемы рационального природопользования и сохранения биоразнообразия в водных пространствах, проблемы освоения ресурсов континентального шельфа, достижения науки в области морской геологии, современные подходы к исследованиям обширных акваторий дистанционными методами, проблемы устойчивого развития экосистем моря и прибрежной зоны, организацию и проведение комплексных экспедиционных исследований, преподавание «морских дисциплин», вопросы организации полевых практик студентов.

Мероприятия проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №20-05-22025.

Подготовлено к выпуску издательством ООО «ПолиПРЕСС» по заказу ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова».

ООО «ПолиПРЕСС»

170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский
пр-т, д. 7, пом. II polypress@yandex.ru

ООО «Центр морских исследований МГУ
имени М.В. Ломоносова».

РФ, 119234, г. Москва, ул. Ленинские
Горы, д. 1, стр. 77

(495) 648-65-58/ 930-80-58

Все права на издание принадлежат
ООО «Центр морских исследований
МГУ имени М.В. Ломоносова».

© ООО «Центр морских исследований
МГУ имени М.В. Ломоносова», 2020
© ООО «ПолиПРЕСС»

ОСЕВЫЕ ОТНОШЕНИЯ У МНОГООСКУЛЮМНОЙ ГУБКИ: ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПОДХОД К ВОПРОСУ ПОЛЯРНОСТИ *LEUCOSOLENIA* CF. *VARIABILIS* (CALCAREA, PORIFERA).

**Борисенко Илья Евгеньевич¹, Лавров Андрей Игоревич²,
Ересковский Александр Вадимович^{1,3,4}**

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

³ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва

⁴ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, Марсель

Введение

На схеме тела взрослой губки того или иного класса можно отметить несколько разных осей симметрии, руководствуясь молекулярными или физиологическими признаками. Однако их сопоставление до сих пор не дает четкого ответа на вопрос гомологии осей у губок и у Eumetazoa. Нами была предпринята попытка с помощью дифференциальной транскриптомики оценить экспрессию генов, характерных для оскулюма, кормуса и дивертикулов губки *Leucosolenia* cf. *variabilis*, имеющей трубчато-ветвистую структуру, а также идентифицировать и описать эти гены. Акцент был сделан на участниках сигнальных путей, таких как Wnt и TGF-beta, для которых описана повышенная экспрессия в оскулюме. Нами показано, насколько сложным оказался механизм разметки тела губки вдоль оси водоносной системы с помощью дифференциальной экспрессии разных лигандов каскадов межклеточной коммуникации.

Методы

Терминальные участки оскулюмов, фрагменты кормуса и дивертикулы тела дефинитивной губки препарировали под стереоскопическим микроскопом с помощью микрохирургических ножниц Кастровьехо и остро заточенных пинцетов, и выделяли из них тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (Evrogen). Библиотеки мРНК готовили с помощью наборов TruSeq mRNA Stranded (Illumina) и секвенировали на ячейке S-Prime прибора NovaSeq6000 (Illumina). Было получено около 1,1 млрд парно-концевых прочтений длиной 150 п.н. Было секвенировано по 3 биологических повторности для каждого образца ткани (в последующем анализе использовали только по 2 повторности из-за девиаций в одной группе образцов). Референсный транскриптом собирали с помощью ПО Trinity после удаления последовательностей адаптеров с помощью Trimmomatic. Прочтения подвергали псевдокартированию на референсный транскриптом с помощью ПО kallisto с бутстреппингом (-b 100; Bray et al., 2016), после чего данные о представленности транскриптов обрабатывали в пакете sleuth в среде R (Pimentel et al., 2017).

Результаты

Тело губки *Leucosolenia* cf. *variabilis* имеет асконоидное строение, т.е. представляет собой ветвящуюся трубку, выстланную снаружи слоем экзопинакоцитов, а внутри слоем хоаноцитов. Нами были собраны образцы тканей из участков ее тела губки, отличающихся на функциональном и анатомическом уровне: кормус – фактически, стенка тела с хоанодермой, терминальный отдел оскулюма – трубки, через которую из тела губки выбрасывается поток воды (в этих участках внутренний слой хоаноцитов, замещается слоем эндопинакоцитов), и дивертикулы – слепо замкнутые отростки кормуса. Из этих образцов была выделена и секвенирована полиаденилированная РНК. Все полученные прочтения (около 1,1 млрд) были использованы в сборке референсного транскриптома, из которого затем были удалены избыточно представленные сходные транскрипты (изоформы, полиморфные и гетерозиготные последовательности). Всего было получено 58141 белок-кодирующих последовательностей с N50 = 1299 п.н.

Количественный анализ транскриптов с помощью пакета sleuth, использующего бутстрэп для анализа дифференциальной экспрессии, позволил идентифицировать 64 транскрипта, уровень экспрессии которых отличается в оскулюме/кормусе/дивертикулах на достоверном уровне. Так, из представленной на рис. 1А тепловой карты видно, что оскулюм по отношению к дивертикулам и кормусу имеет наиболее ярко выраженный набор транскриптов, представленных только в его клетках (левый нижний угол, показано пунктирной рамкой). В то же время, при сравнении кормуса и дивертикулов видно, что отличия между ними невелики, и приходится на небольшую группу транскриптов, которые есть в обеих тканях, но в кормусе присутствуют в большем количестве (пунктирная рамка в середине). Эта же группа транскриптов практически отсутствует в клетках оскулюма. Логично предположить, что группа кормус/дивертикул-специфичных транскриптов связана с хоаноцитами, присутствующими как в кормусе, так и в дивертикулах (но в меньшем количестве). Эти же транскрипты не представлены в оскулюме, т.к. хоанодерма в терминальном его отделе отсутствует. Остаются неясными функции оскулюм-специфичных транскриптов, т.к. ожидаемых лигандов сигнальных каскадов среди наиболее широко представленных молекул обнаружено не было.

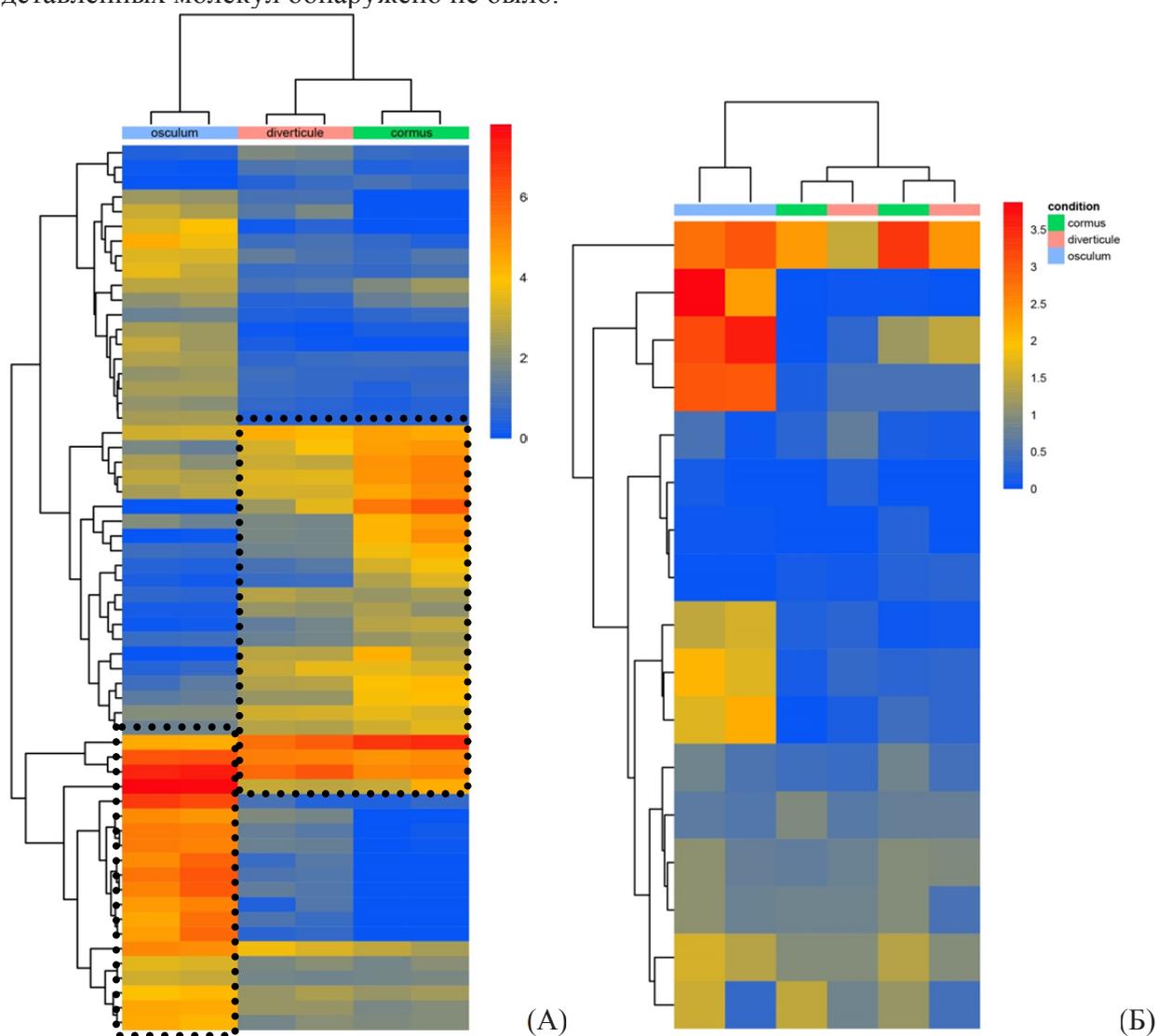


Рис 1. (А) Тепловая карта, демонстрирующая дифференциальную экспрессию в тканях оскулюма, кормуса и дивертикулах. Показаны транскрипты, для которых отличия между образцами статистически значимы ($p\text{-value} < 0,05$). (Б) Экспрессия 17 ортологов лигандов TGF-beta в тканях оскулюма, кормуса и дивертикулах. Цветовая шкала уровня экспрессии – логарифмическая.

В качестве генов интереса нами были выбраны лиганды Wnt и TGF-beta каскадов, поскольку ранее была показана их экспрессия вдоль апико-базальной оси у некоторых губок (Leininger et al., 2014; Borisenko et al., 2016). С помощью tblastn было идентифицировано 17 ортологов TGF-beta и 19 ортологов Wnt. Оказалось, что некоторые лиганды TGF-beta экспрессируются в оскулюме на значительно большем уровне, нежели в кормусе или дивертикулах. При этом, судя по кластеризации образцов (столбцы на рис. 1Б), разница между уровнями экспрессии в дивертикулах и в кормусе, незначительна. Лиганды Wnt-каскада также демонстрируют повышенную экспрессию в оскулюме (рис. 2А); два из них, для которых у однооскулюмной губки *Sycon ciliatum* была показана специфичная экспрессия в оскулюме (Leininger et al., 2014), были клонированы, и экспрессия их показана с помощью гибридизации *in situ* с меченым РНК-зондом (рис. 2Б). Для одного из *wnt*, *LvaWntJ* (названия даны по филогенетической близости к ортологам губки *S. ciliatum*), была показана экспрессия в краевом ряду клеток оскулярной трубки (рис. 2б, з, ж), а также в клетках, расположенных под экзопинакодермой на конце некоторых дивертикулов (рис. 2Б, е, и). Это согласуется с предположением, что дивертикулы с течением времени или при каких-то определенных условиях способны формировать оскулюм. В кормусе какой-либо локальной экспрессии показано не было. Однако другой лиганд, *LvaWntI*, экспрессируется не только в оскулярной трубке (в частности, от ее основания до края), но и в экзопинакодерме по всей поверхности тела губки. При этом, что хорошо видно в падающем свете (рис. 2Б, а), экспрессия наблюдается не во всех экзопинакоциях, а *LvaWntI*-позитивные клетки разбросаны мозаично. В терминальном отделе дивертикулов экспрессия *LvaWntI* не наблюдается.

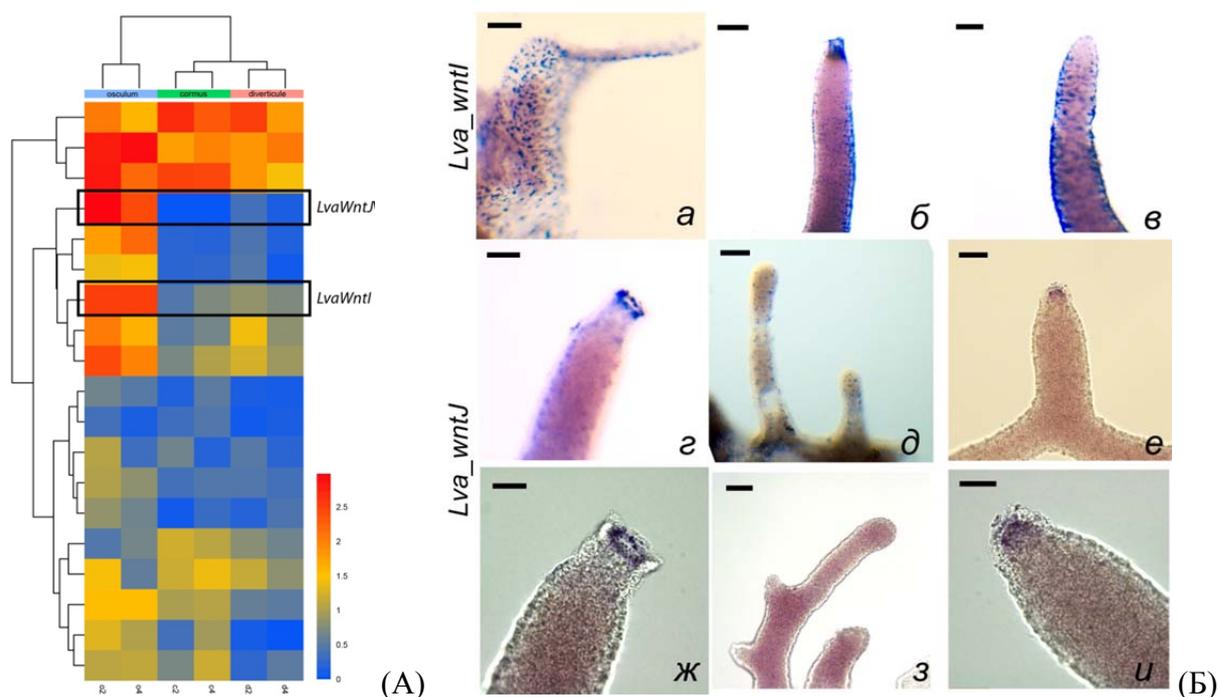


Рис 2. (А) Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию 19 ортологов Wnt в тканях оскулюма, кормуса и дивертикулах. Черными рамками показаны два лиганда, использованных для гибридизации *in situ*. Цветовая шкала уровня экспрессии – логарифмическая. (Б) Экспрессия *LvaWntI* и *LvaWntJ*, выявленная с помощью гибридизации *in situ* с диоксигенин-меченым РНК-зондом. а-е – падающий свет, ж-и – проходящее освещение. Шкала: б-е – 500 мкм, а, ж-и – 250 мкм.

Закключение

Нами была предпринята попытка оценить паттернирование физиологической оси полярности тела губки, связанной с правлением потока воды, с помощью RNA-Seq. Путем

анализа дифференциальной экспрессии в тканях оскулюма, кормуса и дивертикулов многооскулюмной губки *Leucosolenia cf. variabilis* было показано, что относительно небольшая группа транскриптов присутствует в тех или иных отделах тела губки с достоверными отличиями в уровнях экспрессии. Отдельные лиганды сигнальных каскадов Wnt и TGF-beta экспрессируются в оскулюме на более высоком уровне, однако, как показано с помощью гибридизации *in situ*, система паттернов по крайней мере для Wnt сложна и не ограничена тем или иным отделом тела, а также может быть связана с онтогенезом осевых структур, таких как оскулюм. Работа поддержана РФФИ (гранты № 19-04-00563) и грантом РНФ № 17-14-01089 (в части биоинформатического анализа).

Список литературы

Borisenko I., Adamski M., Ereskovsky A., Adamska M. Surprisingly rich repertoire of Wnt genes in the demosponge *Halisarca dujardini* // *BMC Evol Biol.* – 2016. – Vol. 16. – P. 123–527.

Bray N.L., Pimentel H., Melsted P., Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification // *Nature Biotechnology.* – 2016. – Vol. 34. – P. 525–527.

Leininger S., Adamski M., Bergum B., Guder C., Liu J., Laplante M., Bråte J., Hoffmann F., Fortunato S., Jordal S., Rapp H.T., Adamska M. Developmental gene expression provides clues to relationships between sponge and eumetazoan body plans // *Nature Communications.* – 2014. – Vol. 5. – No. 3905.

Pimentel H., Bray N.L., Puente S., Melsted P., Pachter L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty // *Nature Methods.* – 2017. – Vol. 14. – P. 687–690.