

На правах рукописи

**Помазной Михаил Юрьевич**

**ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕМАТОДЫ  
*OPISTHORCHIS FELINEUS***

03.02.07 – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск 2015

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Научный руководитель: Мордвинов Вячеслав Алексеевич,  
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: Невинский Григорий Александрович,  
доктор химических наук, профессор,  
зав. лабораторией ферментов репарации  
Института химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН,  
г. Новосибирск

Белякин Степан Николаевич,  
кандидат биологических наук,  
зав. лабораторией геномики Института  
молекулярной и клеточной биологии  
СО РАН, г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:** Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_201 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:  
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090  
тел: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;  
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Описторхиды представляют собой семейство паразитических плоских червей (класса Трематод) включающее более 30 родов [1], среди которых есть представители с большой медицинской значимостью, такие как *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* [2]. Эти виды вызывают опасные хронические заболевания – описторхоз и клонорхоз, приводящие к повреждениям гепатобилиарной системы [3].

*O. viverrini* и *C. sinensis* распространены в таких странах как Китай, Тайланд, Лаос, Камбоджия и некоторые другие, и поэтому называются «азиатскими» печеночные сосальщиками. Случаи же заражения *O. felineus* в основном наблюдаются в России, Белоруссии, Казахстане, а особенно в бассейне сибирской реки Обь, где встречаемость заболевания может достигать 30% локальной популяции [4]. Менее часто встречаются случаи заражения им людей и домашних животных в западной Европе [5,6].

Описторхоз может протекать как асимптоматически, так и в тяжёлой форме. При отсутствии своевременного лечения инфекция чревата множественными осложнениями, которые включают повреждения печени и поджелудочной железы, холангит и образование камней в желчевыводящих путях [7]. Кроме того, *C. sinensis* и *O. viverrini* классифицированы как канцерогены класса 1: показано, что *O. viverrini* является одной из основных причин холангиокарциномы в Тайланде [8,9].

Не смотря на высокую медицинскую значимость этих паразитов, их диагностика и лечение представляют трудную медицинскую задачу. Для диагностики применяются такие методы, как копрологическое исследование и дуоденальное зондирование, которые, однако, являются низко чувствительными. Лечение же проводится в основном единственным препаратом – празиквантелом [10]. Массовое применение последнего может понизить эффективность лечения [11] и потенциально, привести к формированию лекарственной устойчивости, что делает разработку новых методик в лечении этих паразитозов приоритетной проблемой для некоторых регионов. Поиск новых методов фармакологического вмешательства против описторхид затруднен тем что они плохо изучены на молекулярно-биологическом уровне. Кроме того, из-за принадлежности описторхид к Лофотрохозоа [12] мы не располагаем хорошо изученным модельным организмом, удобным для сравнения и экстраполяции надежных молекулярных данных на это семейство.

### Разработанность темы исследования

Важной основой для молекулярно-биологических исследований трематод,

как и для других организмов, является наличие нуклеотидных последовательностей их геномов и транскриптомов. Такие данные в последнее время стали значительно более доступны в связи с бурным развитием технологий массового параллельного секвенирования и методов биоинформатики. Их применение позволило существенно продвинуться в изучении азиатских печеночных сосальщиков *O. viverrini* и *C. sinensis* – геномы обоих этих видов были секвенированы [13–15]. Соответствующих данных для *O. felineus* нет, что и являлось мотивацией для нашей работы характеризации транскриптома этого паразита.

Попутно методология этой работы была использована для исследования молекулярной биологии жизненного цикла описторхид. Все представители этого семейства обладают схожим развитием, включающим стадии, паразитирующие в окончательном хозяине и в двух промежуточных. Соответствующие жизненные формы сильно отличаются по морфологии и образу жизни, а значит, имеют и существенно различающиеся транскриптомные профили. Молекулярные основы различий между стадиями и процессы, ответственные за переходы между ними остаются во многом неизвестными. Полнотранскриптомный анализ метацеркарии описторхид может быть основой для исследования молекулярной биологии их жизненного цикла, но еще не был осуществлен ни на каком из представителей этого семейства.

## **Цели и задачи исследования**

В связи с актуальностью проблемы описторхоза мы поставили перед собой следующую цель исследования:

Полнотранскриптомный анализ мариты и метацеркарии *O. felineus*.

Для осуществления поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Определить последовательности белок-кодирующих мРНК транскриптомов мариты и метацеркарии *O. felineus*.
2. Провести биоинформатический анализ полученных транскриптов.
3. Провести сравнительный анализ транскриптомных профилей мариты и метацеркарии *O. felineus*.

## **Научная новизна**

Впервые отсекувенирован и аннотирован полный транскриптом трематоды *O. felineus* на стадии мариты и метацеркарии. Обнаружены особенности молекулярной биологии этого паразита в свете его образа жизни и специфики взаимодействия паразит-хозяин. В частности оказалось, что у данного вида редуцированы такие молекулярные системы, как синтез полиаминов и метаболизм метионина, полностью отсутствует молекулярный аппарат

формирования пероксисом. С другой стороны обнаруживается увеличенное число копий таких генов, как катепсины, кальмодулины и MD-2 домен содержащие белки. Также идентифицированы специфичные для *O. felineus* гранулиноподобные транскрипты.

Установлены филогенетические взаимоотношения внутри семейства описторхид с использованием рибосомальных белков, которые указывают на более близкое родство *C. sinensis* и *O. felineus* по отношению друг к другу, чем каждого из них к *O. viverrini*.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Транскриптом *O. felineus* отсековирован впервые. Также, впервые исследован полный транскриптом метацеркарии описторхид. Кроме того, обнаружены новые особенности генетической организации описторхид на примере *O. felineus*.

Архив с полученными последовательностями депонирован в DDBJ/EMBL/GenBank под номером GBJA00000000 и может быть использован паразитологическим сообществом для дальнейших молекулярно-биологических исследований *O. felineus*.

## **Методология и методы исследования**

В данной работе применялись методы массового параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq, а также конвенциональное секвенирование по Сэнгеру.

Для анализа полученных данных использовались биоинформатические методы, включающие сборку последовательностей с помощью графов де Брюйна, аннотацию с помощью поиска гомологии на уровне первичной структуры. Использовались сравнение с различными базами данных, содержащих аннотированные последовательности других видов. Также, для выявления особенностей транскриптома *O. felineus* применялись статистические методы.

## **Положения выносимые на защиту**

1. У *O. felineus* редуцированы молекулярные системы синтеза полиаминов и метаболизма метионина, а также отсутствует молекулярный аппарат формирования пероксисом.
2. У мариты *O. felineus* среди наиболее экспрессируемых идентифицированы гены катепсина F, миоглобина, белка оболочки яйца, глутатион трансферазы, HDM белка, а у метацеркарии – гены, кодирующие белки домашнего хозяйства, такие как рибосомальные белки и убиквитин.
3. Филогенетически *O. felineus* и *C. sinensis* ближе друг к другу, чем каждый из них к *O. viverrini*.

## **Личный вклад автора**

Лично автором диссертации была проведена пробоподготовка к секвенированию и долговременному хранению кДНК библиотеки, весь биоинформатический анализ данных и интерпретация результатов.

## **Степень достоверности и апробация результатов:**

Для проверки достоверности полученных последовательностей мРНК проводилось сравнение результатов, полученных на основании двух независимых методик приготовления библиотек и секвенирования, примененных в данной работе, а именно, секвенирование кДНК библиотеки по Сэнгеру и массовое параллельное секвенирование. Итоговые сборки хорошо согласовывались друг с другом качественно и количественно.

Также, ключевые результаты и выводы данной работы докладывались и обсуждались на 7-ой Международной конференции по биоинформатике, регуляции и структуре геномов и системной биологии (BGRS/SB'10, Новосибирск, 2010), международной конференции «Молекулярная диагностика 2010» (Москва, 2010) и конференции Open Bio 2014 (Кольцово, 2014).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Общая характеристика данных**

В работе использовались результаты секвенирования 4 тыс. клонов кДНК библиотеки по Сэнгеру а также около 150 млн прочтений тотальной РНК марты и метацеркарии *O. felineus*, полученных на платформе Illumina HiSeq, из которых 110 млн относятся к взрослой стадии и 40 млн относятся к метацеркарии.

В результате сборки транскриптома из последовательностей EST было получено 267 контигов, а сборка парных прочтений, полученных по технологии Illumina, дала в результате 12'665 траскриптов. Основная характеристика полученного транскриптома отображена в таблице 1.

Таблица 1: Характеристики сборки транскриптома, полученной программой Trinity

Общее количество прочтений Illumina	150 млн
Общее количество полученных транскриптов	12'665
N50 полученных контигов	2781 нт
Медианная длина контигов	1591 нт
Средняя длина контига	1952 нт
Транскриптов со значимой гомологией против Nr	11'059 (87,3%)
Транскриптов со значимой гомологией против Swissprot	7'753 (61,2%)

При поиске гомологии с помощью BLASTx для 11'130 (87,8%) и 7'943 (62,7%) транскриптов были обнаружены гомологи в базах данных NCBI Nr и Swissprot соответственно. Существенное количество транскриптов (1533, 681 нт ± 505 нт) не обнаруживают статистически значимую гомологию и, возможно, представляют собой последовательности специфичные для *O. felineus*.

### Транскрипты с наибольшей экспрессией

Нами были определены гены с наибольшей экспрессией в различных стадиях развития паразита. Во взрослой стадии наибольшую экспрессию имели катепсин F, миоглобин, белок оболочки яйца и глутатион трансфераза. Однако, транскриптом с самым большим значением FPKM оказался гомолог HDM белка. Последний, как было показано в экспериментах на *F. hepatica* [16], обладает ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами. Всего в транскриптоме *O. felineus* нами было обнаружено четыре HDM белка, два из которых имели высокий уровень экспрессии в марите, а два в метацеркарии.

В метацеркарии в отличие от мариты наибольшую экспрессию имеют в основном гены домашнего хозяйства, такие как рибосомальные белки (11 из 20 самых экспрессируемых транскриптов) и убиквитин. Возможно, это отражает тот факт, что на данной стадии паразит находится в бездействии, ожидая когда он будет поглощен окончательным хозяином. Таким образом, низкие метаболические запросы приводят к низкой экспрессии специализированных генов. Исключениями является обнаруженные HDM белки, специфичные для метацеркарии и цистеиновая протеаза.

## Транскриптом *O. felineus* и консервативные гены эукариот

Мы сравнили имеющийся транскриптом с набором консервативных генов эукариот, представленном в работе Parra и соавторов [17], в которой они попытались найти набор генов эукариот, характерный для самых разнообразных таксонов. Причем эти гены должны отличаться достаточной консервативностью для легкости определения в немодельных организмах.

Для установления ортологии с этими генами был осуществлен поиск алгоритмом tBLASTn против человеческих белков из консервативного набора. Оказалось, что с пороговым значением  $E \leq 10^{-10}$  в полученных последовательностях транскриптома *O. felineus* были идентифицированы 445 из 456 консервативных генов, а 11 из них не были найдены. Номера доступа и описание соответствующих 11 человеческих белков отображены в таблице 2.

Таблица 2: Консервативные белки *H. sapiens* из CEGMA, отсутствующие в исследуемом транскриптомом *O. felineus*

Номер белка <i>H. sapiens</i>	Описание белка
NP_115661	Метилтиорибозо-1-фосфат изомераз
NP_955378	Профилин-4
NP_005099	Ксилулозо киназа
NP_057736	Crooked neck-like protein
NP_009111	Трегалаза
NP_001743	Каталаза
NP_003123	Спермидин синтаза
NP_002530	Орнитин декарбоксилаза изоформа 1
NP_001625	S-аденозилметионин декарбоксилаза изоформа 1
NP_036255	МТО1 гомолог

Анализ генов из таблицы 2 позволил обнаружить некоторые особенности молекулярно-генетической организации *O. felineus*. Во-первых у описторха отсутствует система синтеза полиаминов (три гена из таблицы имеют участники этого метаболического пути). Полиамины выполняют в эукариотах множество функций: регуляция клеточного роста и генной экспрессии, поддержание стабильности мембран, пост-трансляционная модификация фактора инициации транскрипции eIF5A и защита от окислительного стресса.

Кроме того эти гены позволили обнаружить редукцию пути метаболизма метионина.

Выше упомянутые свойства, в совокупности с отсутствием каталазы, указывают на черты анаэробного метаболизма у *O. felineus*, что связано со средой его обитания.

## Классификация предсказанных белков *O. felineus* терминах геной онтологии

Генная онтология (Gene Ontology; GO) представляет собой контролируемый словарь биологических терминов и иерархических связей между ними. Мы использовали программу Interproscan для классифицировать имеющиеся последовательности в терминах GO.

Функциональная классификация EST последовательностей кДНК библиотеки в терминах Gene Ontology была получена для 168 (63%) из 267 последовательностей EST. Аналогичный анализ данных РНК-секвенирования позволил выявить консервативные домены в 8998 транскриптах (71 %), при этом для 6684 из них (52,7%) были получены классификаторы GO. В этих транскриптах наиболее представленными категориями были метаболизм азот содержащих соединений (GO:0034641, эта категории в основном состоит из нуклеотидного метаболизма), транспорт (GO:0006810; в основном представленный мембранным транспортом), биосинтетический процесс и метаболизм малых молекул (GO:0044281, включает метаболизм аминокислот). Любопытно, что 475 обнаруженных транскриптов вовлечены в передачу сигнала (GO:0007165), многие из которых могут быть важными мишенями для разработки лекарственных препаратов, т.к. эти пути уязвимы для фармацевтического вмешательства. Также любопытно наличие молекул, принадлежащих к категории взаимодействия с иммунной системой (GO:0002376), таких как гомолог фактор связывания энхансера энтерлейкина, фактор ассоциированный с TNF-рецептором и два гомолога лектина.

В домене молекулярных функций основными группами GO были связывание ионов (GO:0043176), связывание ДНК (GO:0003677), киназная активность (GO:0016301), активность трансмембранных транспортеров (GO:0022857), пептидазная активность (GO:0008233), связывание РНК (GO:0003723), оксидоредуктазная активность (GO:0016491) и активность передачи сигнала (GO:0004871). Замечу, что аналогично с доменом биологических процессов, здесь в большом количестве представлены молекулярные функции передачи сигнала.

## Анализ метаболических путей с помощью KEGG

База данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.kegg.jp/>) содержит данные о молекулярно-биологических путях. Для 5816 белок-кодирующих транскриптов (46%) *O. felineus* была установлена KEGG ортология. Из них 3559 относились хотя бы к одному KEGG пути. Мы сравнили состав обнаруженных метаболических путей с шистосоматидами, а также с удаленными по отношению к трематодам таксонами, представленными видами *Homo sapiens* и *Caenorhabditis elegans*.

Анализ KEGG аннотации позволил для *O. felineus* подтвердить ранее обнаруженный на трематодах феномен редукции пероксисом [18], а также

наличия молекулярного аппарата выработки энергии из жирных кислот, к которым описторх имеет доступ в большом количестве, находясь в желчном протоке.

Также при исследовании биохимических путей было обнаружено многокопийное семейство белков, содержащих MD-2 домен. Ранее было показано, что некоторые белки с этим доменом вовлечены в транспорт холестерина из лизосом в другие органеллы и плазматическую мембрану человеческих клеток [19]. В работе [14] была выдвинута гипотеза, что эти белки возможно участвуют в транспорте стеролов, однако оказалось (по нашим данным), что они активно транскрибируются лишь во втором промежуточном хозяине, а экспрессия во взрослой стадии очень низка. Кроме того, к нашему удивлению, у *O. felineus* было обнаружено 52 таких белка. Для сравнения, большинство эукариот имеют только одну копию [14,20].

### **Транскриптом метацеркарии *O. felineus* – сравнение со взрослой стадией**

Используя количественную информацию об уровнях экспрессии генов, полученную из данных высокопроизводительного секвенирования, были выделены транскрипты, специфичные для той или другой стадии жизненного цикла. Некоторый транскрипт нами считался специфичным для взрослой стадии (метацеркарии), если его экспрессия (выраженная в количестве картированных фрагментов) была не равна нулю во взрослой стадии (метацеркарии) и равнялась нулю в метацеркарии (взрослой стадии). Следуя этой логике, было идентифицировано 895 транскриптов, специфичных для метацеркарии и 632 транскрипта, специфичных для взрослой стадии. Далее в каждой из этих двух подгрупп транскриптов был осуществлен поиск обогащенных терминов GO с помощью программы Cytoscape.

Подмножество транскриптов, специфичных только для взрослой стадии, было обогащено такими биологическими процессами как локализация липидов (GO:0010876), липидный транспорт (GO:0006869), процессы связанные с микротрубочками (GO:0007017), негативная регуляция эндопептидазной активности (GO:0010951) и регуляция протеолиза (GO:0030162). В свою очередь подмножество транскриптов, специфичных только для метацеркарии, существенно отличалось по обогащенным биологическим процессам и включало транскрипты, относящиеся к адгезии клетка-клетка (GO:0098609), G-белок связанным путям трансдукции сигнала (GO:0007186), путям сигнала через поверхностные клеточные рецепторы (GO:0007166), трансмембранному транспорту ионов (GO:0034220), биологической регуляции (GO:0065007), транспорту ионов металлов (GO:0030001), регуляции клеточных процессов (GO:0050794), протеолизу (GO:0006508), регуляции биологических процессов (GO:0050789), транспорту катионов (GO:0006812), транспорту нейротрансмиттеров (GO:0006836) и трансмембранному транспорту (GO:0055085). Эти находки указывают на

наличие в метацеркарии множества специфичных для этой стадии сигнальных молекул, в том числе, возможно, вовлеченных в процесс экцистирования и развития во взрослую стадию.

Для дальнейшего поиска межстадийных различий мы использовали точный тест Фишера чтобы выявить пути, обогащенные дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ). В итоге было обнаружено семь биохимических путей статистически значимо обогащенных ДЭГ ( $P < 10^{-2}$ , таблица 3). Особенно выделялся путь лизосом (map04142), включавший 94 дифференциально экспрессирующихся гена. Более подробное рассмотрение показало, что существенным источником межстадийных различий в случае лизосом являлись катепсины. Из 56 идентифицированных транскриптов катепсинов, 24 дифференциально экспрессировались, что указывает на высокую специализацию пептидазного репертуара в зависимости от стадии развития. Такой паттерн экспрессии лизосомальных белков вместе с большим количеством дифференциально экспрессирующихся генов в таких путях как метаболизм аргинина и пролина (map00330) и фагосома (map04145) указывают на существенные метаболические различия между стадиями.

Также стоит упомянуть различия в системе сигналинга посредством фосфатидилинозитола (map 04070, не показано в таблице 3, значение  $P$  также достаточно низко и равно 0,013) и взаимодействие нейромедиаторных лигандов и рецепторов (map04080), так как эти пути затрагивают системы межклеточной передачи сигнала. Более подробное рассмотрение пути №04070 выявило 26 транскриптов различных кальмодулинов, большая часть которых экспрессировалась в метацеркарии.

Таблица 3: KEGG пути, обогащенные дифференциально экспрессирующимися генами (ДЭГ) согласно точному тесту Фишера.

Номер KEGG пути	Описание	Значение $P$ обогащенности ДЭГ	Количество генов <i>O. felinus</i> входящих в путь	Количество ДЭГ, входящих в путь
04142	Lysosome	3.46E-23	173	76
04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	3.45E-08	73	29
04145	Phagosome	7.45E-06	91	29
00740	Riboflavin metabolism	3.15E-03	12	6
04512	ECM-receptor interaction	4.26E-03	29	10
00350	Tyrosine metabolism	7.84E-03	18	7
00330	Arginine and proline metabolism	8.49E-03	27	9

Итоговая иллюстрация, включающая межстадийные различия на уровне транскриптома, обсуждаемые в тексте диссертации, изображена на рисунке 1



Рисунок 1. Сравнение исследованных стадий *O. felineus* на молекулярном уровне.

## Рибосомальные белки и филогения описторхид

Для выяснения филогенетических взаимоотношений внутри семейства описторхид мы решили использовать рибосомальные белки. Для этого мы построили набор ортологов рибосомальных белков с доступными в NCBI последовательностями для *C. sinensis*, *O. viverrini*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *F. gigantica*, и *F. hepatica*. Полученный конкатемер 32 аминокислотных последовательностей был проанализирован методами максимальной парсимонии и максимального правдоподобия. Обоими методами была установлена одна и та же топология при которой *C. sinensis* и *O. felineus* ближе друг к другу, чем каждый из них к *O. viverrini*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые проведено транскриптомное исследование важного паразита человека и животных *O. felineus*. Для получения данных о транскрипционно активных генах нами были использованы методы секвенирования кДНК по Сэнгеру и методы массового параллельного секвенирования. Транскриптомное профилирование проводилось на двух стадиях жизненного цикла: исследовалась взрослая стадия, обитающая в желчных протоках млекопитающего (окончательного хозяина), а также инвазивная стадия – метацеркария, обитающая в коже и мышцах рыбы (промежуточного хозяина).

### **Выводы:**

1. Среди наиболее экспрессируемых генов во взрослой стадии *O. felineus* идентифицированы гены катепсина F, миоглобина, белка оболочки яйца, глутатион трансферазы, а также HDM белка. В метацеркарии же, среди генов с наибольшей экспрессией представлены те, которые кодируют белки домашнего хозяйства: рибосомальные белки и убиквитин.
2. *O. felineus* не экспрессирует гены синтеза полиаминов, большинство ферментов метаболизма метионина и PEX белки, участвующие в формировании пероксисом.
3. Обнаружены новые гранулиноподобные белки, не имеющие ортологов у родственных описторхид.
4. При анализе экспрессии полученных транскриптов были идентифицированы 11'114 генов, экспрессирующихся в обеих стадиях и 903 и 648 гена, экспрессирующихся только в марите или метацеркарии соответственно
5. В результате анализа рибосомальных белков выявлено, что *O. felineus* и *S. sinensis* филогенетически ближе друг к другу, чем каждый из них к *O. viverrini*.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A. V, Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felineus*. // *Parasitol. Int.* 2015.

2. Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Guselnikov S., Vasiliev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. Adult *Opisthorchis felineus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*. // *Exp. Parasitol.* 2013. Т. 135. № 2. P. 297–306.

3. Pomaznoy M., Tatkov S., Brusentsov I., Sivkov A., Nayakshin A., Guselnikov S., Brenner E., Vasilev G., Katokhin A., Mordvinov V. Search of potential targets for diagnostics of parasite *Opisthorchis felineus* // *Molecular Diagnostics* 2010. , 2010. P. 120–1.

4. Tatkov S., Brusentsov I., Pomaznoy M., Nosareva O., Nayakshin A.M., Guselnikov S. V, Brenner E. V, Vasiliev G. V, Katokhin A. V, Mordvinov V.A. Investigation of *Opisthorchis felineus* transcription profile by direct sequencing cDNA library's clones // 7th International conference on bioinformatics of genome regulation and structure\system biology (BGRS/SB'2010). , 2010.

5. Помазной М., Логачева М., Катохин А., Мордвинов В. Полнотранскриптомный анализ возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus* методом RNA-seq // *Open Bio. Koltsovo:* , 2014. P. 131–2.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. King S., Scholz T. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. // *Korean J. Parasitol.* 2001. Т. 39. № 3. P. 209–21.

2. Hung N.M., Madsen H., Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans. // *Acta Parasitol.* 2013. Т. 58. № 3. P. 231–58.

3. Hong S.-T., Fang Y. *Clonorchis sinensis* and clonorchiasis, an update. // *Parasitol. Int.* 2012. Т. 61. № 1. P. 17–24.

4. Mordvinov V. a et al. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. // *Parasitol. Int.* 2012. Т. 61. № 1. P. 25–31.

5. Armignacco O. et al. Cryptic and asymptomatic *Opisthorchis felineus* infections. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013. Т. 88. № 2. P. 364–6.

6. Pozio E. et al. *Opisthorchis felineus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. // *Acta Trop.* 2013. Т. 126. № 1. P. 54–62.

7. Kaewpitoon N. et al. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke // *World J Gastroenterol.* 2008. Т. 14. № 5. P. 666–674.

8. Sripa B. et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. // *PLoS Med.* 2007. Т.

4. № 7. P. e201.

9. Sripa B. et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* - multiple pathways to cancer. // *Trends Parasitol.* 2012. T. 28. № 10. P. 395–407.

10. Chai J.-Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. // *Infect. Chemother.* 2013. T. 45. № 1. P. 32–43.

11. Soukhathammavong P. et al. Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, tribendimidine, and praziquantel in patients with *Opisthorchis viverrini*: a randomised, exploratory, open-label, phase 2 trial. // *Lancet Infect. Dis.* 2011. T. 11. № 2. P. 110–8.

12. Olson P.D., Tkach V. V. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. // *Adv. Parasitol.* 2005. T. 60. P. 165–243.

13. Wang X. et al. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis*. // *Genome Biol.* 2011. T. 12. № 10. P. R107.

14. Young N.D. et al. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. // *Nat. Commun.* 2014. T. 5. P. 4378.

15. Young N.D. et al. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010. T. 4. № 6. P. e719.

16. Robinson M.W., Donnelly S., Dalton J.P. Helminth defence molecules-immunomodulators designed by parasites! // *Front. Microbiol.* 2013. T. 4. № October. P. 296.

17. Parra G., Bradnam K., Korf I. CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. // *Bioinformatics.* 2007. T. 23. № 9. P. 1061–7.

18. Hahn C., Fromm B., Bachmann L. Comparative genomics of flatworms (platyhelminthes) reveals shared genomic features of ecto- and endoparasitic neodermata. // *Genome Biol. Evol.* 2014. T. 6. № 5. P. 1105–17.

19. Infante R.E. et al. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. T. 105. № 40. P. 15287–92.

20. Inohara N., Nuñez G. ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. // *Trends Biochem. Sci.* 2002. T. 27. № 5. P. 219–21.