

Российский Национальный Исследовательский
Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова
Кафедра микробиологии и вирусологии

Сравнительная геномика штаммов
Bifidobacterium longum, выделенных из
кишечника человека

Чаплин А. В.

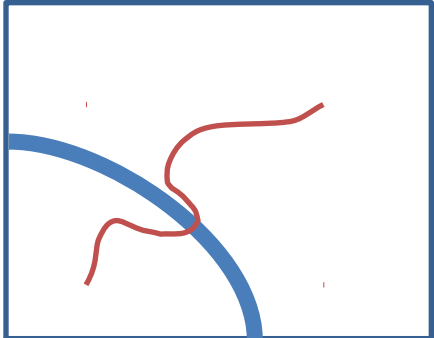
Научные руководители:
д. м. н., профессор Ефимов. Б. А.
к. м. н. Смянов В. В.

Москва, 2013 г.

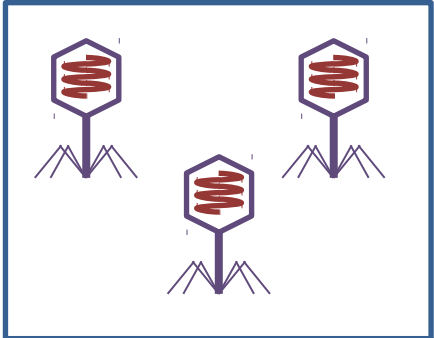
Изменчивость бактериального генома

- Основные движущие силы изменения генома бактерий:
 - Изменение существующих генов с помощью мутаций.
 - Появление генов с помощью дупликации с дивергенцией.
 - Потеря генов из-за делеций или превращения в псевдогены.
 - Горизонтальный перенос генов между бактериями.
- Горизонтальный перенос генов может происходить между сколь угодно далекими организмами, однако с наибольшей частотой он протекает внутри вида.
- Он может приводить как к *изменению последовательностей* имеющихся генов, так и к *приобретению* новых.

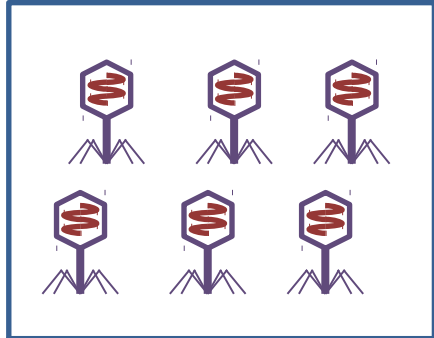
Пути горизонтального переноса генов



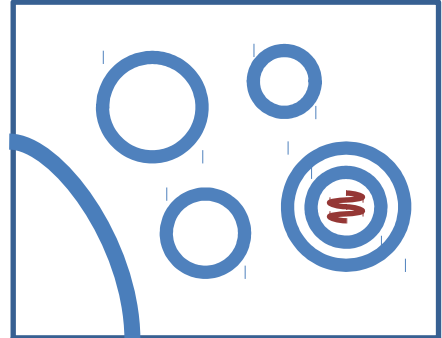
Трансформация



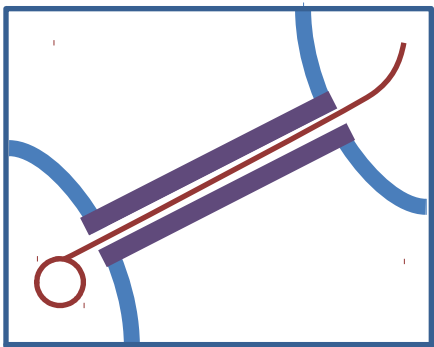
Трансдукция



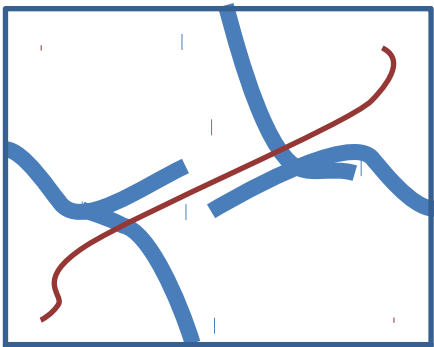
Агенты переноса генов



Мембранные везикулы



Конъюгация



Мембранные нанотрубки

Частота горизонтального переноса генов среди разных бактерий варьирует более чем в 1000 раз.

Bifidobacterium longum

- Представители рода *Bifidobacterium* – грам-положительные облигатно анаэробные неподвижные палочки.
- Составляют основную часть кишечной микрофлоры детей и около 3-6% микрофлоры взрослых.
- Специализируются на сбраживании широкого спектра олигосахаридов растительного и животного происхождения.
- Вид *Bifidobacterium longum* широко распространен среди людей:
 - Подвид *infantis* встречается только у грудных детей.
 - Подвид *longum* обнаруживается во всех возрастах.



Данные бактерии широко используются в составе пробиотиков.

Секвенирование геномных последовательностей

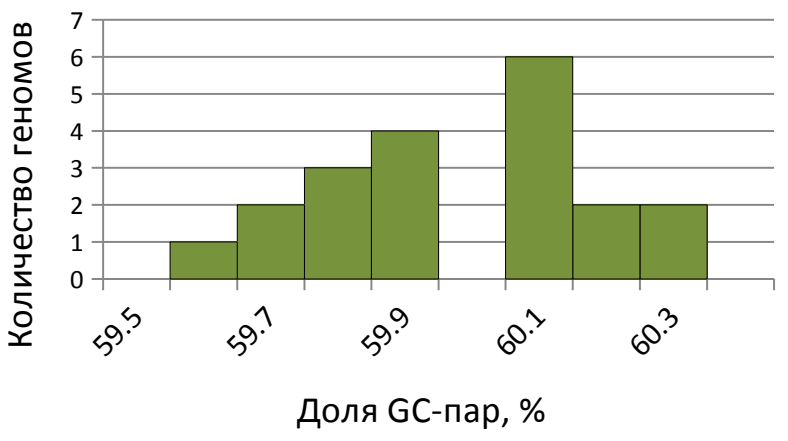
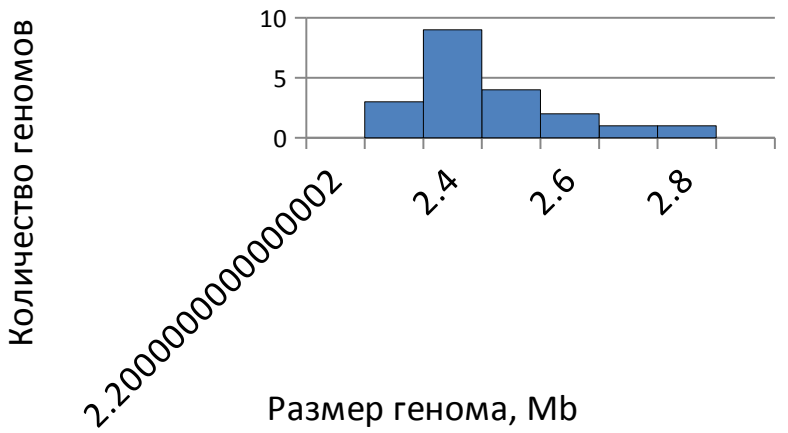
- В данном исследовании была просеквенирована *de novo* геномная ДНК 7 штаммов *Bifidobacterium longum*, выделенных от двух здоровых детей.

Название штамма	Платформа	Число контигов	Источник выделения
1-5B	Illumina HiSeq	29	Обследуемая А, возраст 1 год
1-6B	454 FLX	171	Обследуемая А, возраст 1 год
44B	Illumina HiSeq	54	Обследуемая А, возраст 6 лет
17-1B	Illumina HiSeq	24	Обследуемая А, возраст 11 лет
2-2B	454 FLX	141	Обследуемая Б, возраст 1 год
35B	454 FLX	131	Обследуемая Б, возраст 6 лет
7-1B	Illumina HiSeq	40	Обследуемая Б, возраст 11 лет

Геномика *Bifidobacterium longum*

Другие геномные последовательности, использованные для анализа

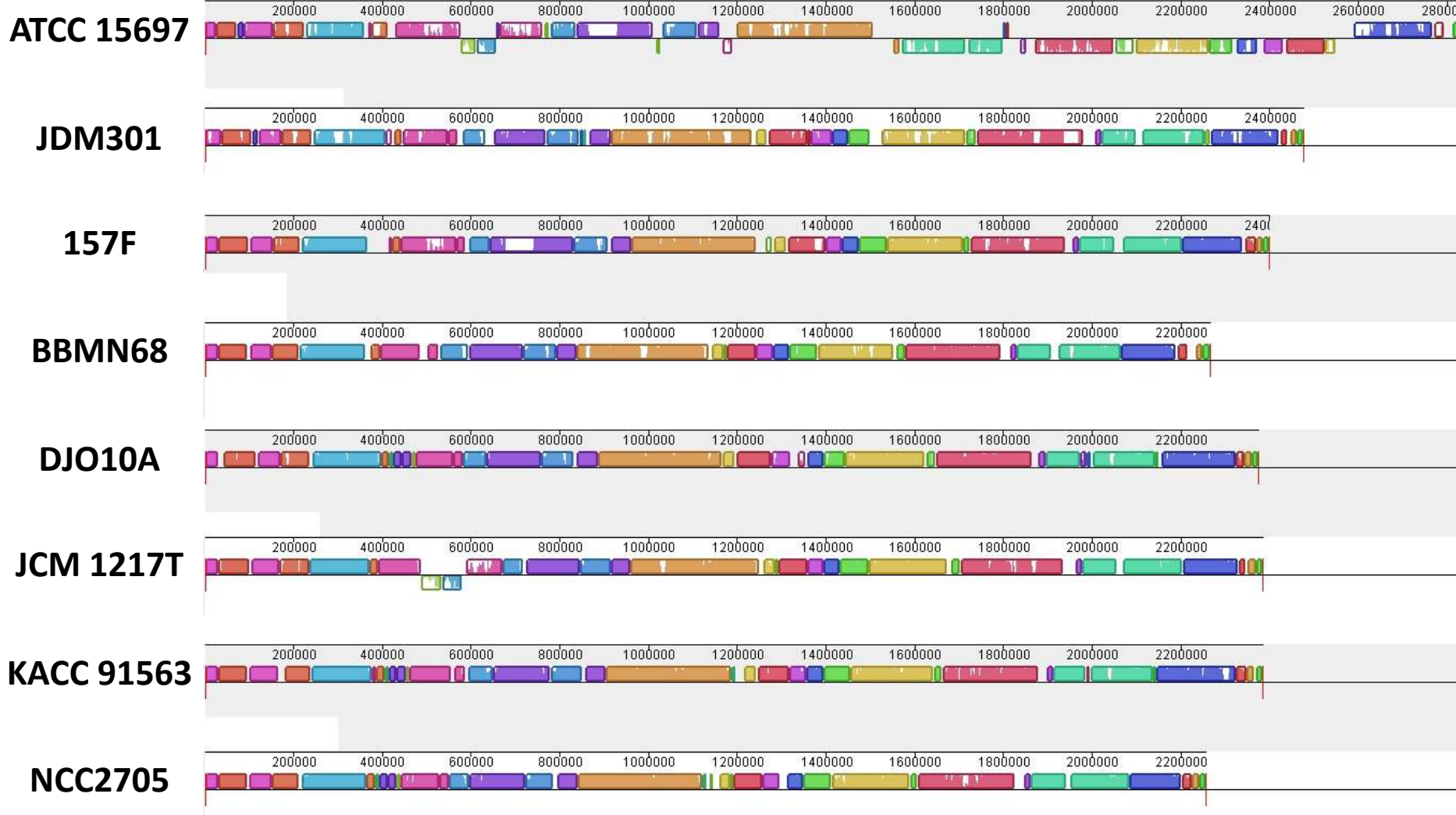
Название штамма	Число контигов
DJO10A	1
NCC2705	1
157F	1
ATCC 15697	1
BBMN68	1
JCM 1217T	1
JDM301	1
KACC 91563	1
F8	scaffold
CCUG 52486	22
AGR2137	49
12_1_47_BFAA	61
ATCC 55813	114



Методы анализа

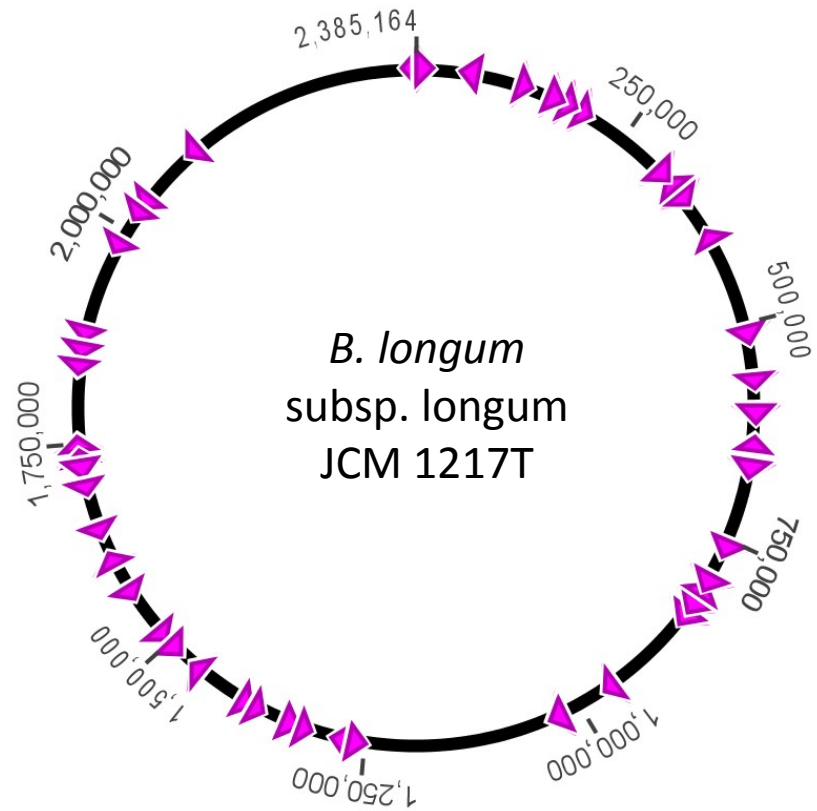
- Все геномные последовательности аннотировались с помощью системы **RAST**.
- Полногеномное выравнивание выполнялось в **Mauve 2.2.1**.
- Филогенетический анализ проводился в программе **ClonalFrame 1.1** со 100 000 итерациями MCMC.
- Гомологичные гены из разных штаммов были кластеризованы в группы генов с использованием **OrthoMCL 2.0.5**.
- Функциональная аннотация генов проводилась по базе данных **COG**.
- Филогенетический анализ, основанный на присутствии или отсутствии умеренно распространенных генов проводился по алгоритму “Wagner parsimony” с использованием пакета **PHYLIP 3.69**.

Полногеномное выравнивание

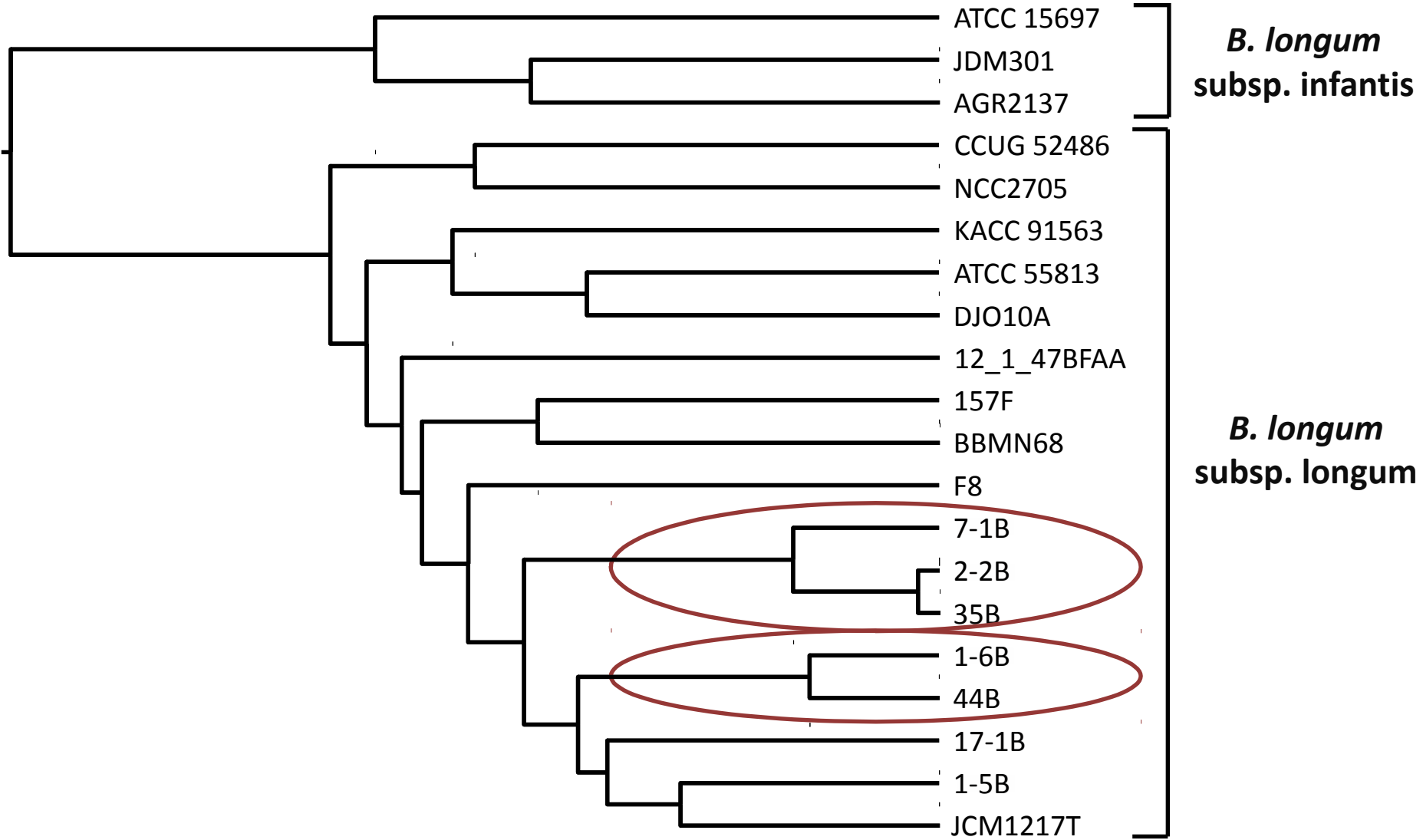


Набор генов «домашнего хозяйства»

- Для построения филогенетического дерева с учётом горизонтального переноса генов был использован набор из 45 генов «домашнего хозяйства», удаленных друг от друга не менее чем на 10 kb.



Филогенетическое дерево

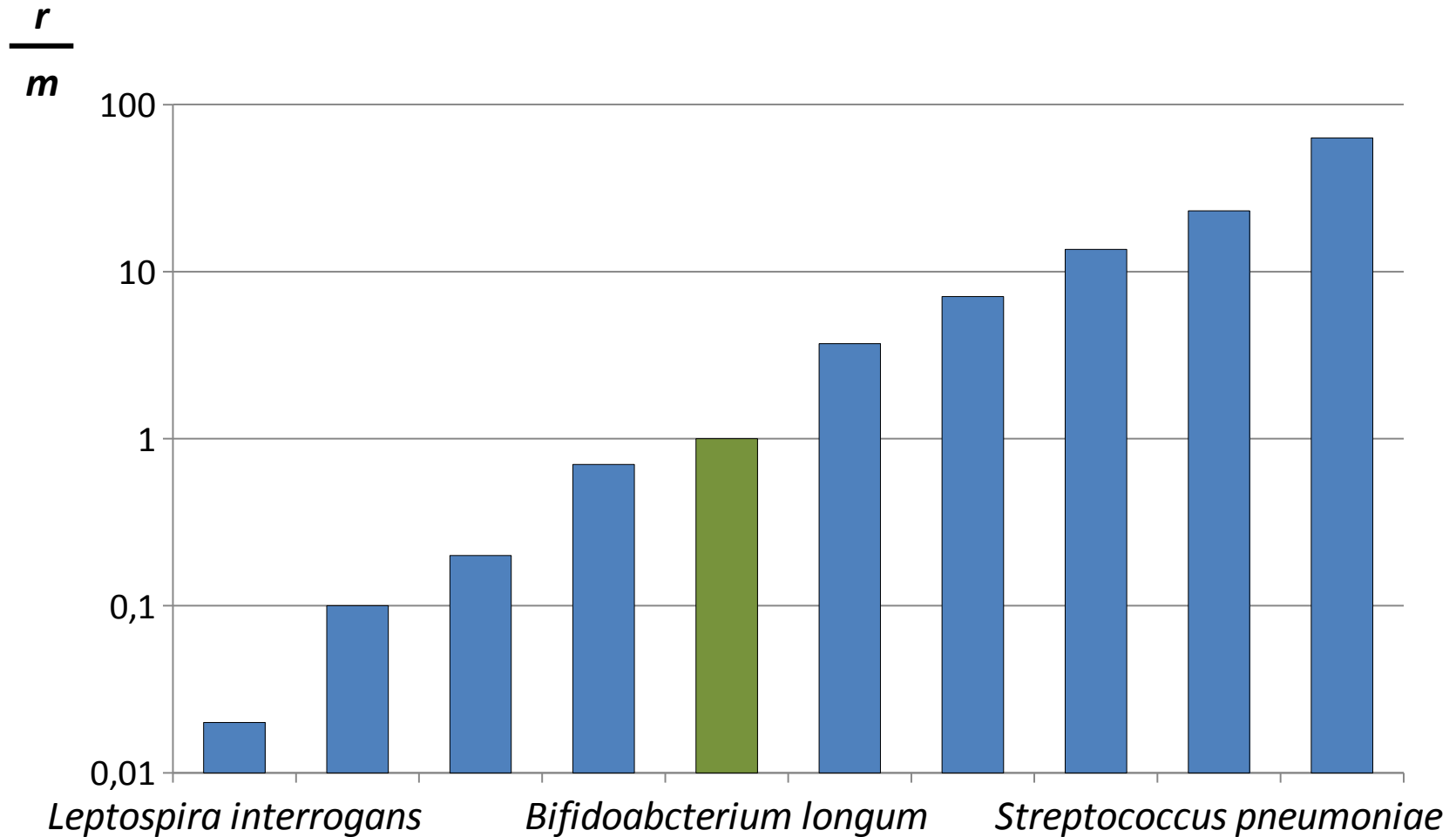


Изменения генов горизонтальным переносом

Параметр	Значение	95% доверительный интервал
$\frac{\rho}{\vartheta} = \frac{\text{Частота горизонтальных переносов}}{\text{Частота точковых мутаций}}$	0,090	0,071 – 0,114
$\frac{r}{m} = \frac{\text{Вероятность, что отдельный нуклеотид будет изменен горизонтальным переносом}}{\text{Вероятность точковой мутации}}$	1,06	0,83 – 1,310

- Вклад горизонтального переноса генов в изменчивость последовательности генов «домашнего хозяйства» сравним со вкладом точковых мутаций.
- Нет значимых барьеров между подвидами *longum* и *infantis*.

Сравнение с другими бактериальными видами



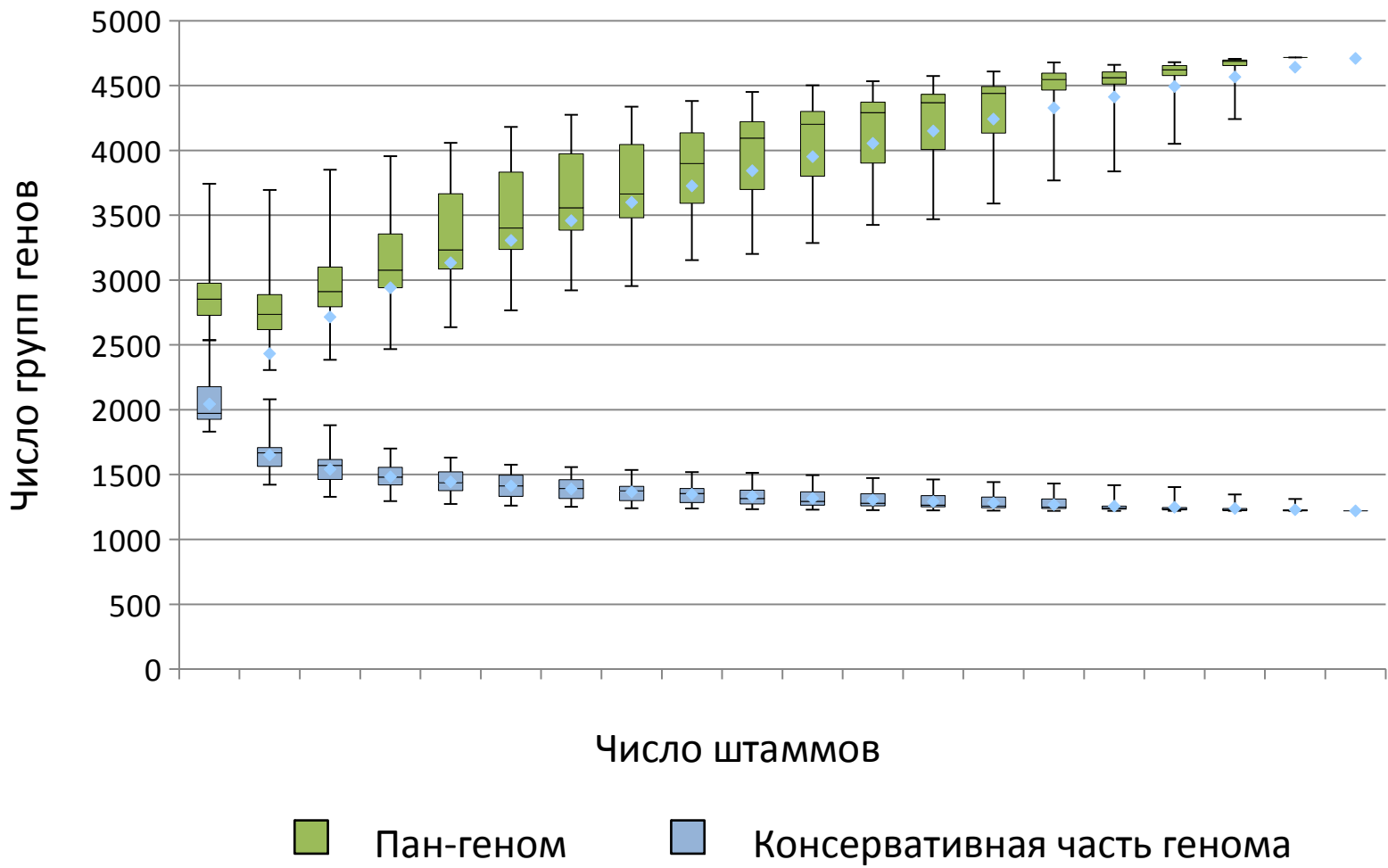
Концепция распределенного генома

Пан-геном
(совокупность всех генов
бактериального вида).

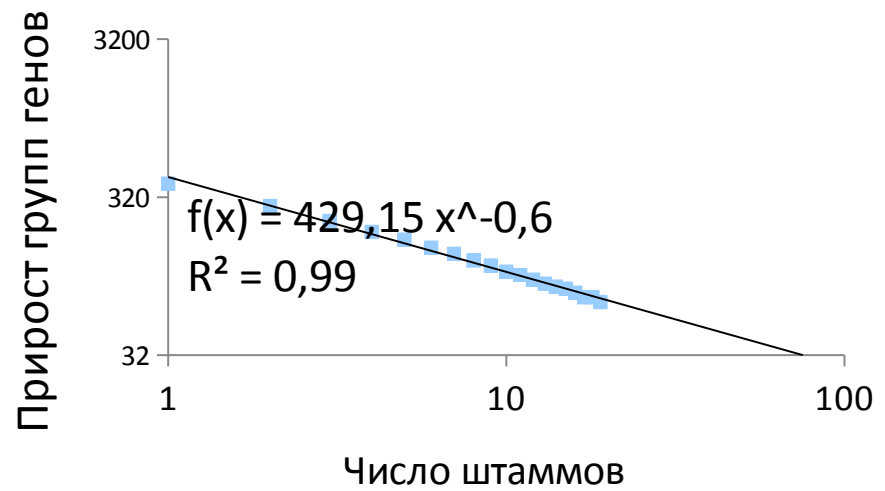
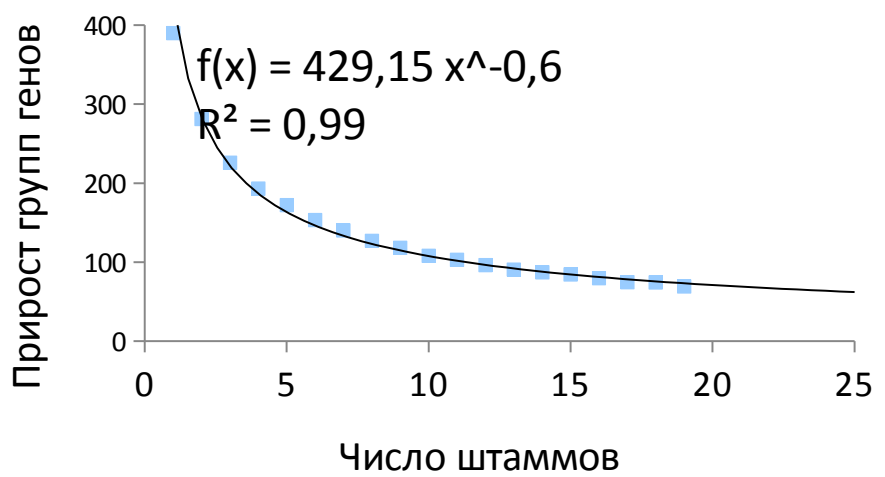
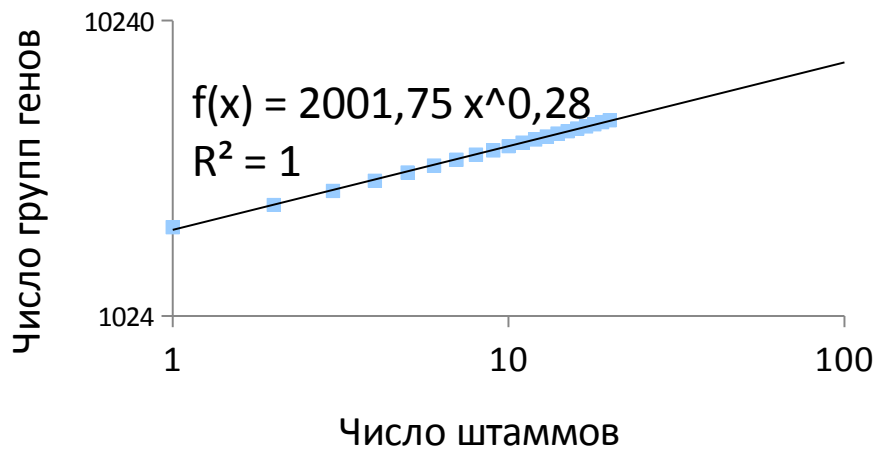
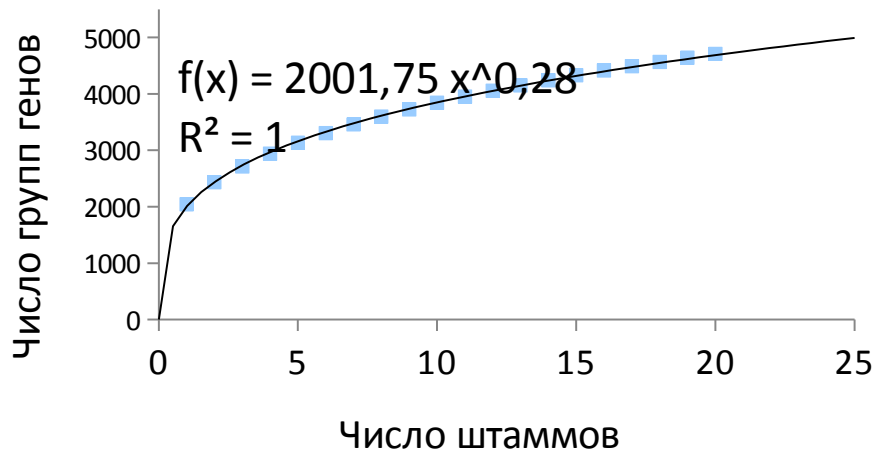
Часто он значительно
больше отдельного
генома.



Распределенный геном *Bifidobacterium longum*

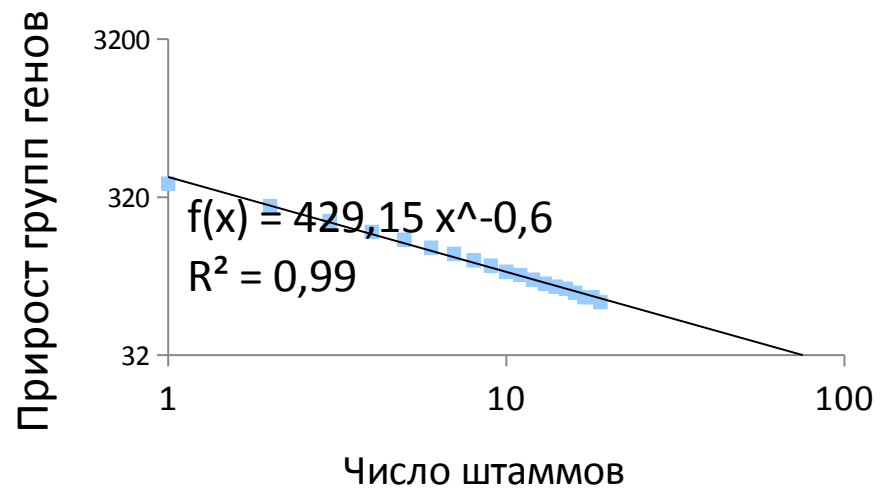
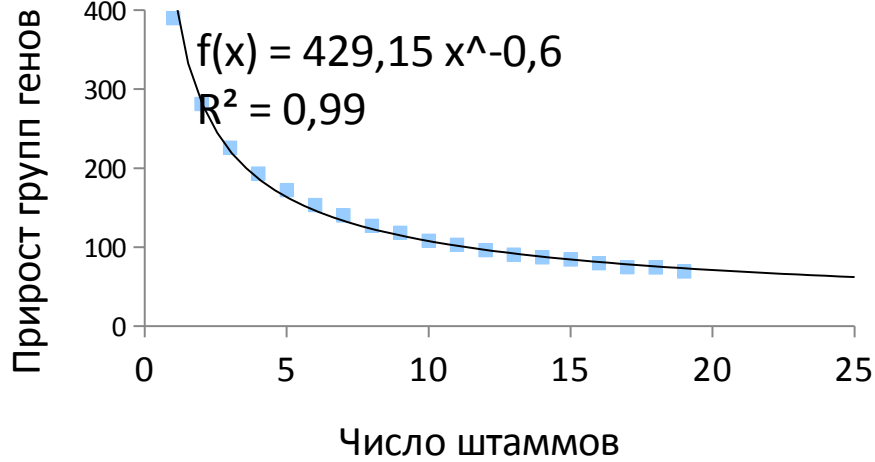
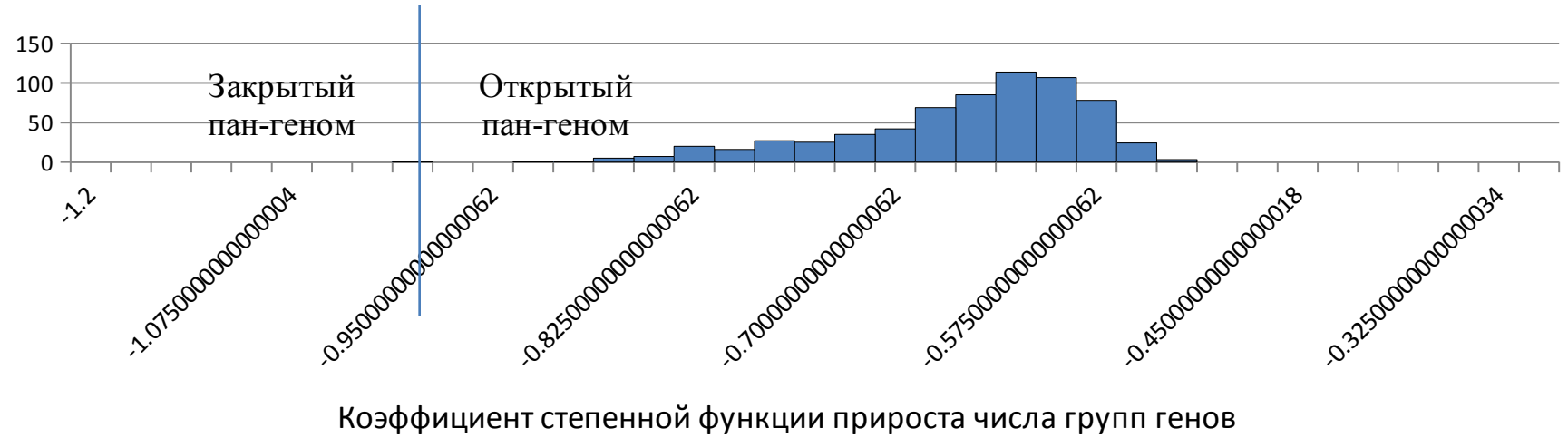


Математическая характеристика пан-генома



Математическая характеристика пан-генома

Результаты при процедуре Jackknife





Репликация
рекомбинация и
репарация

Защитные механизмы

Метаболизм углеводов

Транскрипция

Метаболизм аминокислот

Метаболизм нуклеотидов

Трансляция

Посттрансляционная
модификация, фолдинг

Выводы

- Горизонтальный перенос генов играет значительную роль в формировании геномного разнообразия *Bifidobacterium longum*.
- Влияние горизонтального переноса генов на последовательность генов «домашнего хозяйства» сопоставимо с влиянием точковых мутаций.
- Пан-геном *Bifidobacterium longum* является открытым, его состав отражает специализацию на сбраживании широкого спектра углеводов.
- Показана возможность долговременной персистенции представителей узкой внутривидовой группы штаммов *Bifidobacterium longum* в микрофлоре кишечника человека.

Спасибо за внимание!