УДК 594.38+ 571.27

РАЗНООБРАЗИЕ ТРАНСКРИПТОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ГЕМОЦИТАХ МОЛЛЮСКОВ *PLANORBARIUS CORNEUS* (GASTROPODA, PULMONATA), НЕ ЗАРАЖЁННЫХ И ЗАРАЖЁННЫХ ТРЕМАТОДАМИ *BILHARZIELLA POLONICA*

© 2024 г. А. В. Бобровская [a], Ю. А. Орлов [a], Е. Е. Прохорова [a,*]

[a]Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
кафедра зоологии и генетики, лаборатория экспериментальной зоологии,
наб. р. Мойки, д. 48, Санкт-Петербург, 191186 Россия
* e-mail: elenne@mail.ru

Поступила в редакцию 22.08.2023 г.
После доработки 20.11.2023 г.
Принята к публикации 01.12.2023 г.

Впервые получен и проанализирован транскриптом гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus.* В работе использованы незараженные особи и моллюски, зараженные в естественных условиях партенитами трематод *Bilharziella polonica* (сем. Schistosomatidae). Транскрипты, обнаруженные в сборках, кодируют все основные группы иммунных факторов, ранее описанные для других брюхоногих моллюсков. Наиболее разнообразной группой факторов иммунитета оказались молекулы распознавания патогенов. Выявлены толл-подобные рецепторы 11 типов. Не обнаружено различий в наборе толл-подобных рецепторов между заражёнными и незаражёнными моллюсками. Полученные данные расширяют знания об иммунных реакциях легочных моллюсков на трематодную инвазию и дают возможность рассматривать *Planorbarius corneus* как новый модельный организм для изучения защитных реакций моллюсков.

Ключевые слова: *Planorbarius corneus, Bilharziella polonica,* трематодная инвазия, транскрипты, толл-подобные рецепторы, патогенраспознающие рецепторы

DOI: 10.31857/S0031184724010046, **EDN:** SSDDNK

Моллюски *Planorbarius corneus* являются промежуточными хозяевами для трематод из различных семейств (Faltynkova et al., 2008; Brown et al., 2011). Особый интерес для исследователей представляет *Bilharziella polonica* (Kowalewski, 1895), которая, наряду с трематодами рода *Trichobilharzia*, вызывает церкариозный дерматит человека (Żbikowska, 2004). В связи с этим моллюски *Planorbarius corneus* являются одной из

разрабатываемых моделей для изучения паразит–хозяинных систем «трематоды–моллюск» и исследования иммунных реакций моллюсков на инвазию трематодами сем. Schistosomatidae. В последние десятилетия были получены обширные сведения о механизмах защитных реакций роговых катушек: изучен клеточный состав гемолимфы, механизмы клеточных реакций, проанализирована экспрессия некоторых генов иммунного ответа (Prokhorova et al., 2010; Прохорова и др., 2015; Ataev et al., 2016 и др.).

Благодаря расширению круга модельных видов пульмонат в последние годы была показана универсальность основных механизмов их иммунного ответа на заражение трематодами (см.: Adema, Loker, 2015; Атаев и др., 2020). Следующим шагом в раскрытии особенностей взаимодействия паразита и хозяина становится изучение молекулярных механизмов их взаимодействия.

Основными эффекторными элементами иммунных реакций пульмонат являются гемоциты. Нами был получен и проанализирован транскриптом гемоцитов моллюсков *P. corneus*, заражённых партенитами *Bilharziella polonica* (Orlov et al., 2023). Установлено, что в гемоцитах присутствуют транскрипты, кодирующие факторы врождённого иммунитета всех групп. В данной работе мы проанализировали репертуар транскриптов толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе исследованы моллюски *Planorbarius corneus* с размером раковины от 23 до 27 мм, собранные из озера Финское в окрестностях Санкт-Петербурга (60.082, 30.285). Среди этих моллюсков были особи, заражённые трематодами *Bilharziella polonica* (n = 10) и не зараженные (n =10). Гемолимфу забирали пипеткой Пастера из синуса в области головы улиток. Из гемоцитов, осажденных центрифугированием, выделили РНК с помощью Trizol (Invitrogen).

Секвенирование, сборка и аннотация транскриптома гемоцитов *Planorbarius corneus* подробно описаны в статье (Orlov et al., 2023). Эталонный транскриптом гемоцитов *P. corneus* собрали с помощью *de novo* сборщика Trinity (Grabherr et al., 2011), используя прочтения от зараженных и незараженных моллюсков. Качество сборки, в которую вошли последовательности длиннее 200 п.н., оценили программами TransRate (Smith-Unna et al., 2016) и BUSCO (Seppey et al., 2019; используется odb10). Транскрипты, идентичные не менее чем на 95%, кластеризовали с помощью CD-HIT-EST (Fu et al., 2012), в них предсказали открытые рамки считывания (open reading frames, ORF) и транслировали их с помощью TransDecoder (https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki). Полученные полипептидные последовательности, идентичные не менее чем на 99%, кластеризовали и затем аннотировали с помощью BlastP(evalue<1e-5) и базы данных NCBI NR (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/, по состоянию на 02 августа 2021 г.), также в них предсказали белковые домены, используя InterProScan (IPS) (Jones et al., 2014) с настройками по умолчанию. Для поиска в полученном аннотированном транскриптоме белков с потенциальной иммунной функцией был написан скрипт на Python (https://github.com/AlexandraBobrovskaya/The-transcriptomic-analysis-of-Planorbarius-corneus-hemocytes-/tree/main). Критерием считали сход-

ство с ранее известными иммунными факторами по результатам BLASTP или содержание иммуноассоциированных доменов, предсказанных IPS. С целью обновления данных о предполагаемых транскриптах TLR была проведена дополнительная аннотация транскриптома с использованием программы diamond (Buchfink et al., 2021) в режиме BLASTp в базе данных NCBI NR (дата обращения 13.11.2023). Из полученных данных были отобраны предполагаемые последовательности TLR. Сопоставление их с предыдущей аннотацией (Orlov et al., 2023) не выявило новых вариантов транскриптов TLR. Выводы об относительной представленности транскриптов, кодирующих полноразмерные канонические TLR, у заражённых и незаражённых моллюсков делали на основе метрики TPM (transcripts per million), определенной для каждого транскрипта с помощью Salmon (Patro et al., 2017).

Кодирующие последовательности (coding sequences, CDS) транскриптов, кодирующие домены TLR, выравнивали, используя BioEdit (Hall, 1999) и онлайн-сервис BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Доменный состав предполагаемых аминокислотных последовательностей TLR был визуализирован с помощью ресурса аннотации белковых доменов SMART (http://smart.embl-heidelberg.de; Letunic et al., 2021) в нормальном режиме. Филогенетическая реконструкция с использованием аминокислотных последовательностей TIR-домена (домен TLR/интерлейкина-1) была выполнена в программе MEGA X (v. 7; Kumar et al., 2016) методом ближайшего соседа (Neighbor-Joining, NJ) с использованием модели числа различий (number of differences) (Nei, Kumar, 2000) и максимального правдоподобия (Maximum Likelyhood, ML) с использованием модели LG (Le, Gascuel, 2008). Бутстреп-поддержка была посчитана на основе 1000 реплик (Felsenstein, 1985). В качестве внешних групп использовали представленные в GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) последовательности TIR-доменов моллюсков *Biomphalaria glabrata* (KAI8779637.1, KAI8752658.1, KAI8748280), *B. pfeifferi* (KAK0066803.1, KAK0055051.1, KAK0055734.1), *Bulinus truncatus* (KAH9524503.1), *Oncomelania hupensis* (KY608728.1), *Aplysia californica* (XP 005110330.1), *Littorina littorea* (MT683583.1), *Elysia marginata* (GFS01774.1), *Plakobranchus ocellatus* (GFN83043.1); *Crassostrea gigas* (XP 011414273.2), *C. virginica* (XP 022335982.1), *Mytilus californianus* (XP 052073418.1), *M. galloprovincialis* (KC344672.1) и полихеты *Arenicola marina* (UCK81511.1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В собранном транскриптоме гемоцитов *Planorbarius corneus* были найдены транскрипты, соответствующие всем основным группам факторов врождённого иммунитета (Orlov et al., 2023). Самой представленной группой молекул, закодированных в исследованном транскриптоме, оказались PRR. По данным BLASTp, к группе PRR относятся 1776 из всех 2687 выявленных молекул с потенциальной иммунной функцией (Orlov et al., 2023). Среди PRR наиболее многочисленными оказались лектины, TLR, а также молекулы адгезии – интегрины (рис. 1). Полученные нами данные согласуются с результатами анализа транскриптомов моллюсков других видов, для которых также показано наибольшее разнообразие PRR среди всех иммунорелевантных молекул (Guillou et al., 2007; Seppälä et al., 2021; Schultz et al., 2020; Zhang et al., 2014).

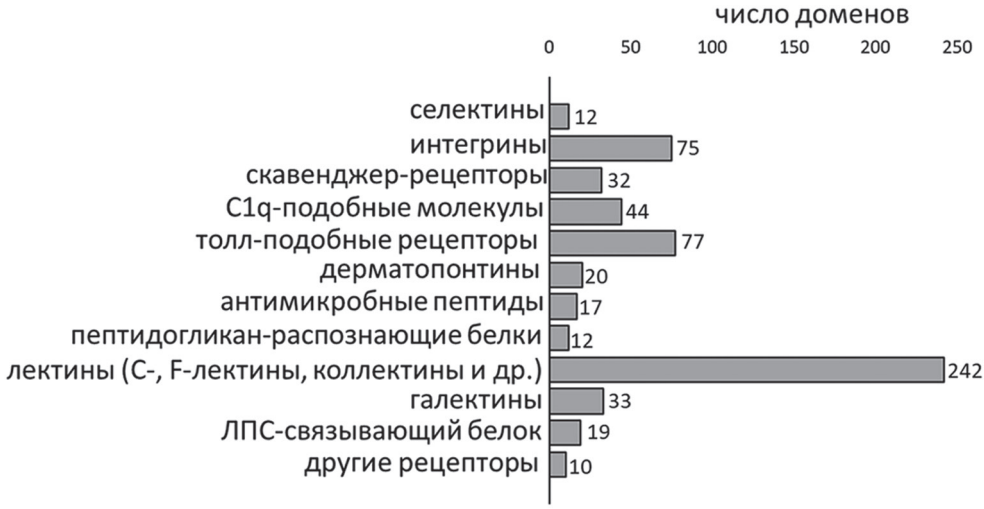

Рисунок 1. Число доменов патогенрапознающих рецепторов (PRR) и молекул адгезии в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* по данным BlastP (базы данных NCBI NR, e-value<1e-5).

Figure 1. The number of pathogen-recognizing receptors (PRR) and adhesion molecules domains in hemocytes of the mollusk *Planorbarius corneus* according to BlastP (databases NCBI NR, e-value<1e-5).

Распознание чужеродного – центральное событие врождённого иммунного ответа, определяющее его эффективность (Janeway, Medzhitov, 2002). Наличие конкретного набора PRR у моллюсков природных популяций рассматривается как видоспецифический признак, сформированный в ходе развития в среде с определённым набором патогенассоциированных молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular pattern, PAMP). Именно поэтому набор вариантов PRR у моллюсков разных видов и даже разных популяций одного вида моллюсков может существенно различаться (Tetreau, 2017; Wang et al., 2018; Gerdol et al., 2018). Изучение разнообразия PRR лежит в основе понимания работы системы врождённого иммунитета.

Одним из наиболее консервативных путей распознавания чужеродного считается распознавание через TLR (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996). TLR представляют собой трансмембранные белки, которые могут быть расположены как на поверхности клетки, так и на везикулах в цитоплазме. Внеклеточный домен TLR содержит богатые лейцином повторы (leucine rich repeats, LRR), количество которых значительно варьирует. Именно этот домен отвечает за способность распознавать определённые PAMP. Внутриклеточный домен TIR, в свою очередь, передаёт сигнал внутрь клетки через адаптерные белки (Bowie, O'Neill, 2000). Именно TIR домен

является наиболее консервативной частью молекулы, поэтому его последовательности чаще всего используют для классификации TLR.

В транскриптоме гемоцитов моллюсков *P. corneus* нами было выявлено 369 транскриптов, содержащих LRR. Из этих транскриптов 139 содержали также TIR домен. Из 40 полноразмерных транскриптов с данными доменами только 11 уникальных транскриптов были идентифицированы как TLR, одновременно кодирующие оба домена и имеющие трансмембранную область.

Длина последовательности 11 полных кДНК TLR *P. corneus* (PcTLR) варьирует от 1180 до 2688 п.н., а длина кодируемых ими полипептидов – от 360 до 896 аминокислот. Предсказанные TIR-домены включают от 137 до 191 аминокислоты (табл. 1). Сходство между выявленными последовательностями TLR составляет от 22 до 31% (в среднем 27%). Предсказанные полипептиды были обозначены как PcTLR 1–11. По структуре все PcTLR можно отнести к шести группам. На рис. 2 представлена их доменная структура.

Таблица 1. Характеристика транскриптов TLR рецепторов *Planorbarius corneus*
Table 1. Characteristics of *Planorbarius corneus* TLR receptor transcripts

Номер в Trinity	Тип TLR	Длина TIR домена, амк	Гомология по данным BlastP	Длина TIR домена, амк	% сходства TIR домена
123979	PcTLR1	157	*Biomphalaria glabrata*, TLR2	157	76.03
31321	PcTLR2	191	*Bulinus truncatus*, TLR 2	194	74.74
231876	PcTLR3	160	*Biomphalaria glabrata*, TLR13	160	71.25
4720	PcTLR5	157	*Aplysia californica*, TLR4	142	45.22
168161	PcTLR6	137	*Elysia marginata*, TLR-like	134	56
611	PcTLR7	153	*Biomphalaria pfeifferi*, TLR7	152	49.77
40385	PcTLR8	137	*Plakobranchus ocellatus*, TLR2	147	46
45105	PcTLR9	153	*Biomphalaria pfeifferi*, TLR 4	153	49.27
46334	PcTLR4	151	*Oncomelania hupensis*, TLR 10	161	36.17
5341	PcTLR10	171	*Arenicola marina*, TLR12	155	32.21
85615	PcTLR11	174	*Mizuhopecten yessoensis*, TLR3	170	30.92
			Crassostrea virginica, TLR7	174	30.27
			Crassostrea gigas, TLR15	165	30.22

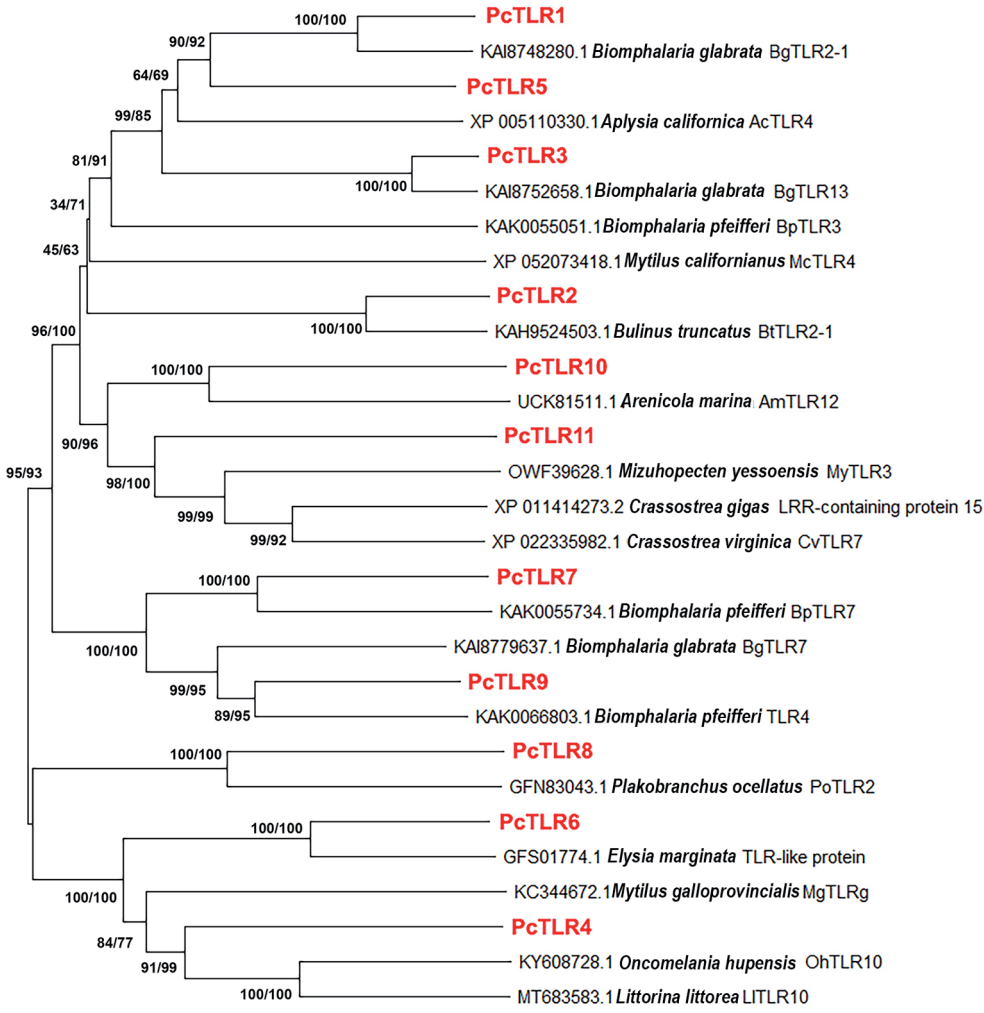

Рисунок 2. Филогенетическая реконструкция на основе аминокислотных последовательностей TIR-домена TLR моллюсков *Planornarius corneus* (PcTLR), выполненная методом присоединения ближайшего соседа (NJ). Дерево, полученное методом максимального правдоподобия (ML), имело такую же топологию. Обозначены бутстрепные поддержки для 1000 реплик для NJ/ML.
Указаны номера использованных последовательностей в GenBank.

Figure 2. Phylogenetic reconstruction based on amino-acid sequences of TLR TIR-domain in the mollusc *Planornarius corneus* (PcTLR), performed by the neighbor joining method (NJ). A tree obtained by the maximum likelihood estimation method (ML) demonstrated similar topology. Bootstrep supports of 1000 replicas for NJ/ML are designated.
Numbers of the used sequences in GenBank are indicated.

На основе предсказанных аминокислотных последовательностей TIR-доменов была выполнена филогенетическая реконструкция. Бóльшая часть выявленных PcTLR кластеризуется с последовательностями TIR доменов других пульмонат – *Biomphalaria*

glabrata, *B. pfeifferi*, *Aplysia californica* и *Bulinus truncatus*. Аминокислотные последовательности TIR-доменов PcTLR идентичны TIR-доменам этих моллюсков на 49.27–70.03%. Однако часть последовательностей оказалась ближе к TLR прозобранхий, двустворчатых моллюсков и полихет. Идентичность последовательностей роговой катушки с ними составляет 30.22–45.22%.

Полученные результаты показывают значительное разнообразие структуры PcTLR гемоцитов (рис. 3*А*). Следует отметить, что выявленные варианты PcTLR являются результатами поиска рецепторов с каноничной структурой. По данным исследований геномов, у моллюсков могут присутствовать нетипичные варианты TLR (Kron, 2022). Так, у устриц из более чем 100 описанных TLR менее четверти имеют типичную доменную структуру (Kanzok et al., 2004), у аплизий 4 из 17 вариантов TLR имеют уникальную конфигурацию доменов (Kron, 2022). Также показано возможное участие в распознавании и иммунном ответе молекул с LRR, но не содержащих TIR домен (Zhao et al., 2018). Вопрос о том, возможно ли включение этих молекул в группу TLR, остаётся открытым.

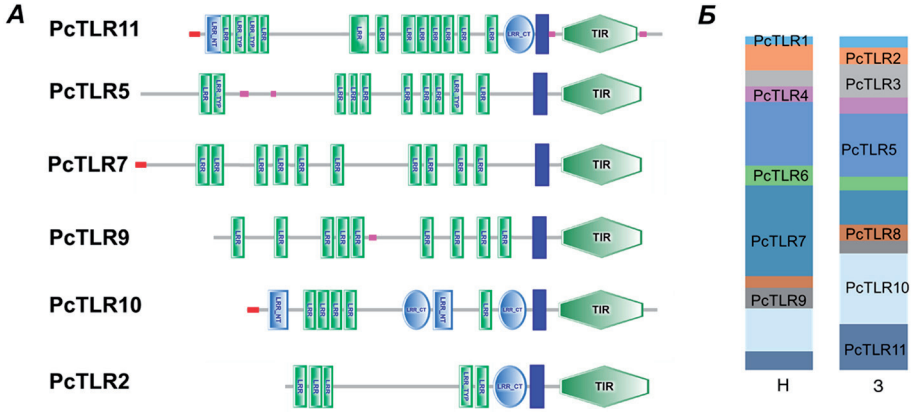

Рисунок 3. Варианты предсказанной доменной структуры TLR гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (*А*) и относительная представленность транскриптов TLR у заражённых и незаражённых моллюсков (*Б*), выраженная в TPM. Горизонтальные красные полоски – сигнальный пептид; горизонтальные розовые – область низкой сложности; вертикальные синие полоски – трансмембранная область; LRR – богатый лейцином повтор; LRR_TYP – богатый лейцином повтор типичного домена подсемейства; LRR_CT – богатый лейцином С-концевой домен повтора; LRR_NT – богатый лейцином N-концевой домен повтора; TIR – TIR-домен; Н – незаражённые моллюски; З – заражённые *Bilharziella polonica* моллюски.

Figure 3. Variants of the predicted TLR domain structure in hemocytes of the molluscs *Planorbarius corneus* (*A*) and relative representation of TLR transcripts in infected and uninfected molluscs (*Б*), expressed in TPM. Horizontal rep stripes – a signal peptide, horizontal pink stripes – the low complexity area; vertical blue stripes – transmembrane area; LRR – rich in leucine repetition; LRR_TYP – rich in leucine repetition ща the typical subfamily domain; LRR_CT – rich in leucine C-terminal repetition domain; LRR NT– rich in leucine N-terminal repetition domain; TIR – TIR-domain; H – uninfected molluscs; З – molluscs infected by *Bilharziella polonica*.

В исследованных выборках выявлен одинаковый набор TLR. Однако представленность транскриптов части PcTLR различна у заражённых *Bilharziella polonica* и незаражённых моллюсков. В частности, относительное число транскриптов PcTLR2 и PcTLR7 выше в гемоцитах незаражённых улиток, а PcTLR3, PcTLR10 и PcTLR11 – выше в гемоцитах заражённых моллюсков (рис. 3*Б*). При этом нами не были обнаружены достоверные различия в экспрессии генов TLR и других групп PRR между заражёнными и незаражёнными моллюсками. В то же время, для других факторов такие различия нами обнаружены (Orlov et al., 2023). Ряд авторов описывают усиление экспрессии TLR у моллюсков при трематодной инвазии. Однако увеличение экспрессии имеет четкую временну́ю динамику (Wang et al., 2019; Ren et al., 2021; Chen et al., 2022). При работе с природнозаражёнными моллюсками точные сроки инвазии неизвестны. TLR обеспечивают распознавание паразита, поэтому повышения активности генов, соответствующих TLR, возможно, следует ожидать в начале инвазии. В то же время, у моллюсков *Biomphalaria glabrata* резистентных линий показан более высокий конститутивный уровень экспрессии TLR, по сравнению с таковым у особей из чувствительных к заражению линий. Заражение трематодами *Schistosoma mansoni* приводит к 27-кратному повышению экспрессии TLR только у резистентных особей, тогда как экспрессия TLR у особей из чувствительных линий не возрастает (Pila et al., 2016).

Разнообразие TLR моллюсков может отражать приспособленность к взаимодействию с разным набором патогенов. В целом среди беспозвоночных наблюдается большее разнообразие PRR, по сравнению с позвоночными (Wang et al., 2018; Saco et al., 2023). При отсутствии специфических антигенраспознающих молекул расширение репертуара распознаваемых лигандов достигается за счёт увеличения количества вариантов PRR. Исходя из этого, генотипически заданный репертуар TLR может рассматриваться как один из факторов, определяющих совместимость в паразит–хозяинной системе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-20057) и гранта Санкт-Петербургского научного фонда (проекта № 49/2022).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Атаев Г.Л., Прохорова Е.Е., Токмакова А.С. 2020. Защитные реакции лёгочных моллюсков при паразитарной инвазии. Паразитология 54 (2): 371–401. [Ataev N.V., Prokhorova G.L., Tsymbalenko E.E. 2020. Defense reactions of pulmonate molluscs during parasitic invasion. Parazitologiya 54 (2): 371–401. (In Russian)]. https://doi.org/10.31857/S1234567806050028.

Прохорова Е.Е., Токмакова А.С., Атаев Г.Л. 2015. Реакция гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* на ксенотрансплантат. Паразитология 49 (2): 128–132. [Prokhorova E.E., Tsymbalenko N.V., Ataev G.L. 2015. Reaction of haemocytes of the mollusk *Planorbarius corneus* to a xenotransplant. Parazitologiya 49 (2): 128–132. (In Russian)].

Adema C.M., Loker E.S. 2015. Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. Developmental & Comparative Immunology 48 (2): 275–283. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.06.014

Ataev G.L., Prokhorova E.E., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V. 2016. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). Invertebrate Survival Journal 13: 164–171. https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v13i1.164-171

Bowie A., O'Neill L.A. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. Journal of Leukocyte Biology 67: 508–514. https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.508

Brown R., Soldanova M., Barrett J., Kostadinova A. 2011. Small-scale to large-scale and back: larval trematodes in *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* in Central Europe. Parasitology Research 108: 137–150. https://doi.org/10.1007/s00436-010-2047-z

Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. 2021. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. Nat Methods 18 (4): 366–368. https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x

Chen H., Cai X., Li R., Wu Y., Qiu H., Zheng J., Zhou D., Fang J., Wu X. 2022. A novel toll-like receptor from *Crassostrea gigas* is involved in innate immune response to *Vibrio alginolyticus*. Infection, Genetics and Evolution. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 97 (January): 105159. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105159

Faltynkova A., Nasincova V., Kablaskova L. 2008. Larval trematodes (Digenea) of planorbid snails (Gastropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. Systematic Parasitology 69: 155–178. https://doi.org/10.1007/s11230-007-9127-1

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791. https://doi.org/10.1111/j.15585646.1985.tb00420.x

Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics 28 (23): 3150–3152. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565

Gerdol M., Gomez-Chiarri M., Castillo M.G., Figueras A., Fiorito G., Moreira R., Novoa B., Pallavicini A., Ponte G., Roumbedakis K., Venier P., Vastaet G.V. 2018. Immunity in Molluscs: Recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia. In: Cooper E.L. (ed.). Advances in Comparative Immunology. Cham, Switzerland, Springer International Publishing, 225–341. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768–0_11

Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit , I. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. Nature Biotechnology. 29: 644–652. https://doi.org/10.1038/nbt.1883.

Guillou F., Mitta G., Galinier R., Coustau C. 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. Developmental and Comparative Immunology 31: 657–671. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.10.001

Hall T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.

Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 52: 269–279.

Janeway C.A.Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. Annual Review of Immunology 20: 197–216. https://doi.org/ 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Jones P., Binns D., Chang H. Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A. F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S. Y., Lopez R., Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. Bioinformatics 30 (9): 1236–1240. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031

Kanzok S. M., Hoa N. T., Bonizzoni M., Luna C., Huang Y., Malacrida A. R., Zheng L. 2004. Origin of Toll-like receptor-mediated innate immunity. Journal of Molecular Evolution 58: 442–448. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110265

Kron N.S. 2022. In search of the *Aplysia* immunome: an in silico study. BMC Genomics 23 (1): 1–29. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08780-6

Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33 (7): 1870–1874. ttps://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Le S.Q., Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. Molecular Biology and Evolution 25 (7): 1307–1320. https://doi.org/10.1093/molbev/msn067

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.-M., Hoffman J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 86: 973–983. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5

Letunic I., Khedkar S., Bork P. 2021. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. Nucleic acids research 49 (1): 458–460. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937

Nei M., Kumar S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York, Oxford University Press, 358 pp.

Orlov I.A., Ataev G.L., Gourbal B., Tokmakova A.S., Bobrovskaya A.V., Prokhorova E.E. 2023. The transcriptomic analysis of *Planorbarius corneus* hemocytes (Gastropoda) naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae). Developmental and Comparative Immunology 140. https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104607

Patro R., Duggal G., Love M.I., Irizarry R.A., Kingsford C. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. Nature Methods 14: 417–419. http s://doi.org/10.1038/nmeth.4197

Pila E.A., Tarrabain M., Kabore A.L., Hanington P.C. 2016. A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. PLoS Pathogens 12 (3): 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005513

Prokhorova E.E., Tsymbalenko N.V., Ataev G.L. 2010. Expression of genes encoding defence factors in the snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata) infested with trematodes. Parazitologiya 44: 310–325.

Ren Y., Liu H., Fu S., Dong W., Pan B., Bu W. 2021. Transcriptome-wide identification and characterization of toll-like receptors response to *Vibrio anguillarum* infection in *Manila clam* (*Ruditapes philippinarum*). Fish and Shellfish Immunology 111: 49–58. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.01.007

Saco A., Novoa B., Greco S., Gerdol M., Figueras A. 2023. Bivalves present the largest and most diversified repertoire of toll-like receptors in the animal kingdom, suggesting broad-spectrum pathogen recognition in marine waters. Molecular Biology and Evolution 40 (6): msad133. https://doi.org/10.1093/molbev/msad133

Schultz J.H., Bu L., Kamel B., Adema C.M. 2020. RNA-seq: the early response of the snail *Physella acuta* to the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. Journal of Parasitology 106: 490–505. https://doi.org/10.1645/19–36

Seppälä O., Walser J.C., Cereghetti T., Seppälä K., Salo T., Adema C.M. 2021. Transcriptome profiling of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) for ecoimmunological research. BMC Genomics 22 (1): 144. https://doi.org/10.1186/s12864-021-07428-1

Seppey M., Manni M., Zdobnov E.M. 2019. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. Methods in Molecular Biology 1962: 227–245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14

Smith-Unna R., Boursnell C., Patro R., Hibberd J.M., Kelly S. 2016. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. Genome Research 26 (8): 1134–1144. https://doi.org/10.1101/gr.196469.115

Tetreau G., Pinaud S., Portet A., Galinier R., Gourbal B., Duval D. 2017. Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. Frontiers in Immunology 8: 1249. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01249

Wang P., Zhang Z., Xu Z., Guo B., Liao Z., Qi P. 2019. A novel invertebrate toll-like receptor with broad recognition spectrum from thick shell mussel *Mytilus coruscus.* Fish and Shellfish Immunology 89: 132–140. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.059

Wang W., Song X., Wang L., Song L. 2018. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense. International journal of molecular sciences 19 (721): 1–20. https://doi.org/10.3390/ijms19030721

Żbikowska E. 2004. Infection of snails with bird schistosomes and the threat of swimmer's itch in selected Polish lakes. Parasitology Research 92: 30–35. https://doi.org/10.1007/s00436-003-0997-0

Zhang L., Li L., Zhu Y., Zhang G., Guo X. 2014. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Marine biotechnology (New York, N.Y.) 16 (1): 17–33. https://doi.org/10.1007/s10126-013-9526-z

Zhao Q.P., Gao Q., Zhang Y., Li Y.W., Huang W.L., Tang C., Dong H.F. 2018. Identification of Toll-like receptor family members in *Oncomelania hupensis* and their role in defense against *Schistosoma japonicum*. Acta Tropica 181: 69–78. http s://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.008

DIVERSITY OF TRANSCRIPTS OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN HEMOCYTES OF *PLANORBARIUS CORNEUS* MOLLUSCS (GASTROPODA, PULMONATA) UNINFECTED AND INFECTED WITH *BILHARZIELLA POLONICA* TREMATODES

A. V. Bobrovskaya , I. A. Orlov, E. E. Prokhorova

Keywords: *Planorbarius corneus, Bilharziella polonica,* trematode invasion, transcriptome, toll-like receptors, pathogen-recognizing receptors

SUMMARY

Transcriptome of hemocytes from uninfected *Planorbarius corneus* snails and snails naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) was obtained and analyzed. Transcripts encoding all groups of immune factors previously described for other gastropods were found. Pathogen recognition molecules are the most diverse group of transcripts encoding immunity factors. Toll-like receptors of 11 types were identified. No differences in the set of toll-like receptors between infected and uninfected molluscs were found. The data obtained expand our knowledge on immune reactions of snails to trematode invasion and make it possible to consider *Planorbarius corneus* as a new model for studying molluscs immune reactions.