دراسة جينومية ومظاهر التنو ع في طفيليات الأمعاء من جنس انتاميبا في منطقة مكة المكرمة

إعداد

داليا عبداللطيف ابوالجدايل

تحت إشراف

أ.د. احمد بهي الدين محمد **أ.د. جمال صابر محمد صابر**

أ.د. نيل هال

المستخلص

يعتبر استخدام التكرارات القصيرة والمتتابعة (STR) داخل جين الحمض النووي الناقل (tRNA) في جينوم الانتاميبا من اكثر الطرق شيوعا في تعريف السلالات الخاصة بأنواع Entamoeba حتى الآن. في هذه الدراسة ، تم تطويرطريقة موثوق بها وسهلة وسريعة تعتمد على استخدام وسيلة جزيئية جديدة لتعريف الأنواع والسلالات. وقد تم عزل الحمض النووي من عينات البراز التي تم جمعها من المرضى المصابين في منطقة مكة المكرمة قي المملكة العربية السعودية. وتم تصميم نوعين من البواديء للمقارنة حيث أن الأولى تستهدف مناطق التكرارت القصيرة المتتابعة STR سالفة الذكر ، في حين تم تصميم الثانية بعد عمل عدة مقارنات لعدة مناطق من الجينوم لنوعي الـ histolytica & dispar باستخدام برنامج نيوسمار(NUCmer) في المناطق المتناظرة بنسبة تشابه كبيرة)حوالي ٩٠٪(والاختلاف لا يتجاوز ~٩٠ قاعدة نيتروجينة. كما أن الطريقة الجزيئية المستخدمة تراعي أن يتم ارتباط البواديء المصممة في مناطق محددة ومتجانسة يتراوح حجمها بين ٢٠٠ -٥٠٠ نيوكليوتيده في الحمض النووي لجينوم كلا النوعين) انتاميبا هستوليتكا وانتاميبا ديسبر(باستثناء وجود indels - مناطق حذف أو اضافه) والتي ينتج عنها اختلاف حجم القطع الجينية داخل النوعين . وكشفت الدراسة أن الانماط التي تم الحصول عليها بالطريقة الأولى عن وجود العديد من التكرارت او القطع الجينية المختلفة مما يجعلنا نتوقع أنه من الممكن أن البواديء قد ارتبطت بمناطق غير مستهدفة على جينوم الإنتاميبا ولا نستبعد أن تكون قد ارتبطت مع انواع اخرى غير الأنتاميبا تتواجد داخل عينات البراز. والنتائج لا تلغي استخدام الطريقة الأولى ماعدا في كونها اخفقت في تحديد الاصابة المزدوجة بالنوعين. عموماً فإن الطريقة الجديدة في هذا البحث قد تكون مفيدة على مستوى تعريف النوع بينما نجد أن استخدام الطريقة الأولى جيدة لتعريف السلالات. علاوة على ذلك ، أشارت نتائج الفطريات إلى أن تنوع العينات قد تغير قليلاً بسبب وجود الطقيل . كما أشارت شجرة القرابة dendrogram التي توضع العلاقات إلى أن أكثر أنواع الشعب التقسيمية شيوعًا في الأمعاء البشرية هي Ascomycota , Basidiomycotaو الZygomycota استنادًا إلى وفرة الأنواع التابعة لها ، كما تم العثور على الأنواع *Pichia kudriavzevii*و *Candida glabrata* و *Saccharomyces cerevisiae* من فئة Ascomycotaبينما *Rhodotorula mucilaginosa* تتبع شعبة Basidiomycota. كما أدى التحليل القائم على مسافات التنوع أحادي الكتلة (unifrac diversity) إلى الفصل التام بين المجموعتين المصابة والغير مصابة (الكونترول).ايضا أشارت نتائج الوفرة التفاضلية إلى أن عددًا من أربعة شعب و ٦ عائلات وتسعة أجناس وعشرة أنواع أظهرت تغيرات كبيرة في انواع الفطريات المتواجدة داخل الأمعاء داخل الأفراد المصابة وفيما بينها. بشكل عام، أظهرت الأنواع غير المصنفة من جنس *Malassezia* من عائلة Basidiomycota وفرة عالية في الأفراد المصابة مقارنة مع الأفرادةالأصحاء ، في حين أن العائلات Saccharomycetaceae من جنس *Saccharomyces*ونوع *S. cerevisiae* أظهرت نتائج عكسية. أشار حجم تأثير التحليل الخطي التمييز or) (LEFSE) (LDAإلى أن عائلة الساكروميسيتاسيا ، والتي يعتبر الساكروميسيس سيريزيسيا من الأنواع المندرجة منها، أنه من الممكن أن تكون علامة بيولوجية داخل الأفراد الأصحاء ويمكن اعتبارها علامة بيولوجية سلبية للإصابة بداء الأميبات. في الختام ، تقدم الدراسة طريقة جديدة يمكن أن تكون مفيدة على مستوى تمييز الأنواع ،

في حين أن نهج STR المرتبط بالحمض النووي الريبوسومي الناقل يمكن أن يكون اختيارًا جيدًا على مستوى السلالات. كما توفر الدراسة رؤى جديدة حول الاستخدام المحتمل للسكرومايسيس كبروبيوتيك ضد داء الأميبات.

Genomic studies and diversity profiling of intestine Entamoeba parasite in Makkah region

By

Dalia Abdulatif Hussain Abuljadayel

Supervised by

Prof. Dr. Ahmed Bahieldin **Prof. Dr. Jamal S. M. Sabir**

Prof. Dr. Neil Hall

Abstract

Amebiasis caused by *Entamoeba histolytica* parasite is among the worst gut diseases worldwide. The most commonly used approach for *Entamoeba* species typing up to date is the tRNA-linked Short Tandem Repeat (STR) regions of the parasite's genome. In the present study, a new reliable, fast and easy molecular tool for species typing was developed. Also, detection of gut mycobiome signature of infected subjects in a trial is require to improve the ability to diagnose and treat this disease. DNA was isolated from fecal samples collected from infected subjects in Saudi Arabia. Two types of primer sets were compared in which the first targeted tRNA-linked STR regions, while the second was designed after multiple contig alignment of the two genomes of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*, using NUCmer program in aligned areas with high similarity (~90%) and difference between of ~90 bp. The selection criteria secure that designed primers should pair with both EH and ED contig sequences at homologous regions of 200-500 bp of both species except for the presence of indels that result in the recovery of amplicons of two species with different sizes. Banding patterns in the tRNA-linked STR region resulted in the occurrence of several common amplicons. We speculate that primers mismatch with regions other than the specified STR arrays of *Entamoeba* or with organisms other than *Entamoeba* existed in the fecal sample. However, the STR-based approach looked very useful in studying strain typing and parasite diversity. The results for the new approach complemented those of the STR-based approach, except that the latter failed to detect coinfected subjects. Moreover, the mycobiome results indicated that diversity of samples slightly changed due to the infection. The dendrogram tree indicated that the most common phyla in the human gut are Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota. Based on operational taxonomic unit (OTU) abundance, the species *Pichia kudriavzevii*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* of phylum Ascomycota and *Rhodotorula mucilaginosa* of phylum Basidiomycota were found highly abundant. Analysis based on weighted unifrac diversity distances resulted in complete separation between the two groups. The results of differential abundance indicated that a number of four phyla, six families, nine genera and ten species showed considerable changes in gut mycobiome signatures within and among groups. Overall, unclassified species of the genus *Malassezia* (phylum Basidiomycota) showed high abundance in infected subjects as compared with healthy subjects, while families Saccharomycetaceae and Trichocomaceae, genus *Saccharomyces* and species *S. cerevisiae* (phylum Ascomycota) showed opposite results. Linear discriminant analysis effect size (LEFSE) or (LDA) indicated that the family Saccharomycetaceae, of which *Saccharomyces cerevisiae* is a downstream taxon, can be a biomarker of healthy subjects that can be considered as a negative biomarker for amebiasis. In conclusion, the study provides a

new approach which can be useful at the species level, while the tRNA-linked STR approach can still be a good choice for strain typing. Also, the study provides new insights into the possible use of *Saccharomyces* as a probiotic against amebiasis.

Keywords: Amebiasis, encystation, yeast, Crabtree effect, oxidative stress, chitin formation **S**pecies typing, strain typing, STR, amplicon, NUCmer, contig.