

На правах рукописи

**Пирожкова Дарья Сергеевна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ  
САПОЗИН В-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ У ОПИСТОРХИД**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в отделе генетики насекомых Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: Катохин Алексей Вадимович, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: Жигилева Оксана Николаевна, д.б.н., профессор кафедры экологии и генетики Института биологии ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», г. Тюмень

Лактионов Павел Петрович, к.б.н., главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной медицины ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск

Ведущая организация: ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года на заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 10.

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: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

д.б.н.

Хлебодарова Т.М.

## Общая характеристика работы

### Актуальность темы исследования

Обь-Иртышский бассейн является самым крупным очагом описторхоза – гельминтоза, вызванного кошачьей двуусткой *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) (Беэр, 2005). *O. felinus* – плоский червь, печеночный сосальщик класса Trematoda семейства Opisthorchiidae, паразитирующий в желчных протоках печени, желчном пузыре и поджелудочной железе рыбающих млекопитающих, в том числе человека. Еще бóльшую медицинскую значимость имеют два других вида семейства Opisthorchiidae, распространенные в Юго-восточной Азии и на Дальнем Востоке: *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), паразитирующие сходным образом (Mordvinov, Furman, 2012; Suwannatrai *et al.*, 2018). Обычно описторхоз и клонорхоз вызывают холангит, холецистит; при продолжительном заболевании возможно развитие фиброза и цирроза печени, гепатита, а также хирургических осложнений, таких как абсцессы и новообразования печени (Бражникова, Цхай, 2004). Печеночные сосальщики рода *Metorchis* семейства Opisthorchiidae тоже могут инфицировать человека (Gao *et al.*, 2018) и имеют много общего с возбудителями описторхоза и клонорхоза, в частности, жизненный цикл и специфичность в отношении второго промежуточного и окончательного хозяев (Mordvinov *et al.*, 2012). Актуальность исследования различных аспектов биологии описторхид, в том числе их генетики и молекулярной биологии, обусловлена их высокой медицинской значимостью, а также несовершенством методов диагностики и лечения вызываемых ими гельминтозов (Байкова и др., 2017).

Сапозин В – это белок и одноименный белковый домен, способные связывать липидоподобные молекулы. Домен сапозин В очень распространен у эволюционно далеких друг от друга эукариот: содержащие его белки обнаружены и у животных, и у растений, и у грибов, а также у некоторых простейших (Bruhn *et al.*, 2005). Такое всеобщее распространение указывает не только на его древность, но и на то, что он выполняет базовые физиологические функции, используя механизмы, появившиеся на ранних этапах эволюции. Белки, содержащие домен сапозин В, объединяются в семейство сапозин подобных белков (saposin-like proteins, SAPLIP) (Munford *et al.*, 1995).

Домен состоит из примерно 80 аминокислотных остатков, формирующих 4-5 амфипатических  $\alpha$ -спиралей, содержит 6 остатков цистеина, образующих 3 дисульфидных мостика (Ahn *et al.*, 2003). Эта специфическая укладка очень консервативна и обеспечивает способность связывать липиды и другие гидрофобные молекулы, в то же время аминокислотный состав домена может существенно различаться. Домен сапозин В может быть либо единственным доменом в белке, либо их может быть несколько; или же домен сапозин В может быть представлен в белке вместе с ферментативным доменом, катализирующим гидролиз (Bruhn *et al.*, 2005).

Значительное количество сапозин-подобных белков синтезируется в виде пробелка, содержащего один домен сапозин В и N-концевой сигнальный пептид. Наиболее изученными сапозин-подобными белками такого типа (*сапозин В-подобные белки, SAP*) являются эффекторный белок лейкоцитов человека гранулизин (Anderson *et al.*, 2003), а также пороформирующие белки дизентерийной амёбы (*Entamoeba histolytica*) амёбапоры А и В, способные вызывать повреждение мембран эукариотических и бактериальных клеток, оказывая цитолитическое и антибактериальное действие (Leippe, 1997). Белки с аналогичной структурой были обнаружены у паразитических плоских червей – печеночных сосальщиков рода *Fasciola* (Reed *et al.*, 2000; Grams *et al.*, 2006) и кровяных сосальщиков рода *Schistosoma* (Don *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2016). Известно, что некоторые SAP трематод обладают способностью разрушать мембраны клеток, что может выступать дополнительным фактором патогенности этих гельминтов (Espino, Hillyer, 2003; Don *et al.*, 2008).

К настоящему времени было известно только об одном сапозин-подобном белке описторхид – клонорпорине 1 *C. sinensis*, который по доменной организации, по-видимому, аналогичен эффекторным белкам лейкоцитов и амёбапорам, т.е. относится к подсемейству SAP, и подобно им оказывает цитолитическое действие (Lee *et al.*, 2002). Он был обнаружен в кишечном эпителии и содержимом кишечника взрослых паразитов; по-видимому, он входит в состав экскреторно-секреторного продукта (ЭСР) паразита и участвует во взаимодействии паразита и хозяина. Учитывая эволюционное родство медицински значимых описторхид, геномы двух других видов тоже с высокой вероятностью содержат не менее, чем по одному гену, кодирующему гомолог клонорпорина 1. Данные массового параллельного секвенирования позволяют оценить разнообразие SAP-транскриптов и особенности структуры кодирующих их генов для последующего детального исследования разнообразия функций SAP у паразитов и их роли во взаимоотношениях «паразит-хозяин». Сравнительно-эволюционный анализ особенностей строения и экспрессии генов SAP составляют необходимый первый этап при исследовании эволюции и диверсификации функций подсемейства белков SAP.

**Цель работы** – сравнительно-эволюционный анализ генов сапозин В-подобных белков (SAP) описторхид и изучение их экспрессии.

Следующие задачи были поставлены для достижения указанной цели:

1. Поиск генов SAP описторхид, анализ их экзон-интронной структуры, сайтов и особенностей сплайсинга, а также доменной организации соответствующих белков;
2. Реконструкция филогенетических связей SAP трематод;
3. Определение стадиоспецифичности экспрессии генов SAP;
4. Оценка влияния празиквантела, основного препарата для лечения описторхоза и клонорхоза, *in vivo* и *in vitro* на экспрессию генов SAP у взрослых червей *O. felineus*.

## Научная новизна работы

В работе выявлены, охарактеризованы и систематизированы три группы ортологичных генов сапозин В-подобных белков (SAP) описторхид *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, а также представлена их филогенетическая связь с гомологами других трематод. Впервые описаны транскрипт SAP2 *O. felineus* и кодирующий его ген, а также предсказаны последовательности транскриптов SAP3 *O. viverrini* и *C. sinensis*. Обнаружен высокий уровень специфичной для взрослых описторхид экспрессии генов SAP1 и SAP2. Показано, что экспрессия генов SAP3 присуща метацеркариям (или эксцистированным метацеркариям) описторхид, а в кодируемых ими белках обнаружен новый уникальный аминокислотный мотив со специфической пространственной организацией.

## Теоретическая и практическая значимость исследования

Данная работа вносит важный теоретический вклад в определение принципов структурно-функциональной ортологии сапозин-подобных белков и понимание их эволюционной функции и приспособительного значения структурных вариаций. Полученные результаты существенно дополняют сведения о структуре и функциях сапозин-подобных белках описторхид, и открывают новые перспективы для исследования функций белков этого класса, для выяснения их роли в паразитизме и патогенезе облигатных эндопаразитов класса Trematoda. Кроме того, предсказанные нами генные модели SAP описторхид указывают на высокую вероятность альтернативного сплайсинга соответствующих мРНК, что закладывает теоретическую основу для дальнейшего исследования роли альтернативного сплайсинга в обеспечении дополнительных механизмов посттранскрипционной регуляции экспрессии генов SAP, в частности, с помощью нонсенс-опосредованного распада транскриптов SAP или с участием микроРНК.

Полученные результаты могут служить основанием для выработки новых подходов и стратегий диагностики и лечения паразитарных заболеваний, в том числе, вызванных многоклеточными паразитами. В частности, в работе показано, что лечение празиквантелом – основным препаратом для лечения описторхоза и клонорхоза – вызывает увеличение экспрессии SAP2 у *O. felineus*, что может вызывать осложнения при лечении. Некоторые сапозин В-подобные белки описторхид, описанные в работе, могут быть рассмотрены в качестве потенциальных антигенов при разработке диагностических систем.

## Положения, выносимые на защиту:

1. Геномы описторхид *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. orientalis* содержат по три гена сапозин В-подобных белков (SAP), которые образуют три группы ортологов, высоко консервативные в пределах семейства. Мультипликация паралогов генов SAP произошла независимо в отрядах Opisthorchiida и Plagiorchiida.
2. Белки SAP3 описторхид содержат высоко консервативный белковый мотив из 18 аминокислотных остатков, представляющий собой участок  $\alpha$ -

спирали, одна сторона которой содержит пять остатков тирозина, а другая – кластер из четырех аминокислот с выраженными основными свойствами.

3. Гены SAP описторхид *O. felineus*, *C. sinensis* и *M. orientalis* специфически экспрессируются на разных стадиях жизненного цикла: экспрессия SAP1 и SAP2 характерна для взрослых особей, а SAP3 – для метацеркарий.

### **Апробация результатов**

Результаты исследования были представлены на 6-м съезде паразитологического общества (Санкт-Петербург, 15-19 октября 2018) и на 7-м съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященного 100-летию кафедры генетики СПбГУ (Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019).

### **Вклад автора**

Все молекулярно-генетические и биоинформатические исследования выполнены автором лично. Исследование влияния празиквантела *in vitro* на подвижность и целостность тегумента взрослых особей *O. felineus* выполнены совместно с д.б.н. Пахаруковой М.Ю. в лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов.

### **Объем и структура диссертации**

Материал диссертационного исследования изложен на 97 страницах, содержит 17 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 115 российских и зарубежных источников. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, описания методов, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературных источников.

## **Содержание работы**

### **Глава 1. Обзор литературы**

В обзоре литературы дана общая характеристика медицински значимых видов семейства Opisthorchiidae, входящих в так называемую «описторхозную триаду» – *O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini*:

1) морфология и жизненный цикл; 2) ареалы и 3) патогенез описторхоза и клонорхоза. Отдельно рассмотрены особенности этих трематод, по-видимому, играющие роль в взаимоотношениях «паразит-хозяин»: строение и функции тегумента, а также состав и значение экскреторно-секреторного продукта. Последнее обосновывает интерес к сапозин-подобным белкам, структура и функции которых описываются далее.

Описаны некоторые исследованные к настоящему моменту сапозин В-подобные белки (SAP) паразитических организмов: дизентерийной амебы *Entamoeba histolytica*, нематоды *Ancylostoma caninum* и некоторых трематод, в частности, кровяных сосальщиков семейства Schistosomatidae, печеночных сосальщиков семейства Fasciolidae, и единственный ранее описанный SAP печеночных сосальщиков семейства Opisthorchiidae – клонорпорин 1 *C. sinensis*. Выявленные функции SAPLIP (извлечение отдельных молекул липидов из мембран, нарушение целостности мембран, слияние мембран, связывание липофильных молекул, взаимодействие со специфическим

рецептором), по-видимому, играют важную приспособительную роль для паразитов.

В обзоре литературы обсуждается основной препарат, который используется для лечения трематодозов – празиквантел: приводятся различные данные, частично раскрывающие механизм его действия, и известные случаи снижения чувствительности к препарату. В конце раздела сформулированы гипотезы о связи действия празиквантела с функциями SAP описторхид и экспрессией соответствующих генов. SAP описторхид могут связывать празиквантел, который имеет определенное структурное сходство с соединениями, для которых была выявлена способность связываться с SAP у других организмов. Повышение экспрессии генов SAP *O. felineus* под действием празиквантела может свидетельствовать об участии SAP в метаболизме препарата. Однако SAP описторхид могут быть вовлечены в обновление поверхности тегумента, участвуя в слиянии мембранных везикул, содержащих компоненты гликокаликса, с наружной поверхностью тегумента. Снижение экспрессии генов SAP *O. felineus* под действием празиквантела могло бы приводить к наблюдаемому празиквантел-индуцируемому повреждению тегумента.

В заключении делается вывод об актуальности исследования генов SAP трематод и поиска структурно-функциональной ортологии SAP.

## **Глава 2. Методы**

**Животные.** В работе были использованы самки сирийских (золотистых) хомячков *Mesocricetus auratus*, предоставленные ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ИЦИГ СО РАН. Содержание и манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с протоколом, одобренным комиссией по биоэтике ИЦИГ СО РАН (протокол №20 от 11.03.2014).

Через 3 месяца после заражения хомячков подвергали эвтаназии методом ингаляции углекислым газом для извлечения из их печени взрослых особей *O. felineus*. В *in vivo* исследовании действия празиквантела через 145 дней после инфицирования препарат вводили хомячкам трехкратно перорально с интервалом 6 часов по 25 мг/кг веса животного (на один прием). Через 24 часа после первого введения празиквантела животных умерщвляли и извлекали из их печени червей.

**Действие празиквантела (PZQ).** Для оценки чувствительности взрослых особей *O. felineus* к празиквантелу *in vitro* червей инкубировали в культуральной среде с добавлением PZQ (0,1, 1, 10 или 50 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C, высокой влажности и 5% концентрации CO<sub>2</sub>. Через 24 часа среду с PZQ заменяли на среду без препарата и инкубировали червей еще 48 часов. Подвижность червей оценивали через 1 и 24 часа после начала инкубации, а также через 48 часов после удаления PZQ из среды. Для оценки эффекта празиквантела на тегумент червей инкубировали в культуральной среде с добавлением PZQ (10 мкг/мл) в течение 30 мин или 3 часов при 37°C, а за 20 мин до проведения микроскопии в среду добавляли краситель пропидий йодид.

**Методы молекулярной биологии.** РНК из взрослых особей и метацеркарий *O. felineus* выделяли с помощью TRI Reagent и использовали для получения кДНК методом обратной транскрипции. Целевые фрагменты амплифицировали с помощью ПЦР, используя специфические праймеры, и секвенировали по методу Сэнгера. Экспрессию генов измеряли с помощью ПЦР в реальном времени с добавлением красителя SYBR Green. Измерения проводили в трех биологических повторах, с тремя техническими повторами каждой реакции.

**Биоинформатический анализ.** Поиск транскриптов в геномах и транскриптомах паразитов был проведен с помощью tBLASTn и BLASTn (NCBI). Для поиска консервативных белковых доменов использовали NCBI CD-Search, для предсказания сигнальных пептидов – SignalP 3.0 Server.

Вторичную структуру белков предсказывали с помощью JPred 4. Были использованы следующие базы данных последовательностей: NCBI EST, WormBaseParasite и NCBI SRA. Филогенетический анализ последовательностей домена сапозин В проводили с помощью программы MEGA7.

### Глава 3. Результаты и обсуждение

**Сбор данных.** BLAST-поиск содержащих сапозин В-доменов гомологов выявил в транскриптом *O. felineus* два транскрипта, кодирующих SAP, однако клонорпорин 1 *C. sinensis* не имел с ними близкой гомологии. Частичная последовательность, кодирующая гомолог клонорпорина 1, была найдена в базе данных EST *O. felineus*. С помощью ПЦР и секвенирования впервые была экспериментально получена полная кодирующая последовательность транскрипта клонорпорин 1-подобного белка *O. felineus* (Genbank MK360860). Таким образом, с помощью комплексного биоинформатически-экспериментального подхода мы выявили у *O. felineus* три транскрипта, кодирующих белки с одним сапозин В-доменом: OfSAP1 – GBJA01004791.1, OfSAP2 – MK360860 и OfSAP3 – GBJA01003581.1.

В библиотеках прочтений транскриптомов *C. sinensis*, *O. viverrini* и (SRX018024 и SRX018025) были обнаружены близкие гомологи OfSAP1 и OfSAP2, содержащие полноразмерные кодирующие последовательности (Таблица 1). Для транскрипта OfSAP3 были найдены только гомологи с частичным покрытием, хотя и высоким сходством, поэтому последовательности транскриптов SAP3 *C. sinensis* и *O. viverrini* были реконструированы из соответствующих геномов на основе генной модели OfSAP3 (Таблица 1). В транскриптом *M. orientalis* было обнаружено три транскрипта SAP, гомологичных OfSAP1-3 (Таблица 1).

**Экзон-интронная структура генов и доменная организация белков.** Для определения границ экзонов транскриптов OfSAP мы проанализировали выравнивание транскриптов на геномы *C. sinensis* и *O. viverrini*, поскольку во время выполнения работы сборка генома *O. felineus* не была опубликована. Для определения последовательностей сайтов сплайсинга генов SAP *O. felineus* была использована SRA-библиотека прочтений генома *O. felineus* (SRX3340664).



**Таблица 1.** Транскрипты *O. felineus*, *C. sinensis*, *O. viverrini* и *M. orientalis*, кодирующие сапозин В-подобные белки

|                      | SAP1                              | SAP2                                | SAP3  |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| <i>O. felineus</i>   | GBJA01004791.1                    | МК360860 – выявлен экспериментально | GBJA01003581.1                              |
| <i>C. sinensis</i>   | SRR040494.48124 (SRA: SRX018024)  | SRR040494.80725 (SRA: SRX018024)    | предсказание по последовательности в геноме |
| <i>O. viverrini</i>  | SRR040495.237435 (SRA: SRX018025) | SRR040495.484074 (SRA: SRX018025)   | предсказание по последовательности в геноме |
| <i>M. orientalis</i> | GFXB01004776.1                    | GFXB01006563.1                      | GGVK01091992.1                              |

Экзон-интронные структуры генов SAP *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, а также доменная организация белков (расположение домена сапозин В относительно экзонов) представлены на рисунке 1.

Видно, что OfSAP1, OfSAP2 и их ортологи имеют схожую структуру транскриптов и содержат по 6 экзонов, три из которых входят в состав домена сапозин В и один из оставшихся является микроэкзоном (Рисунок 1).

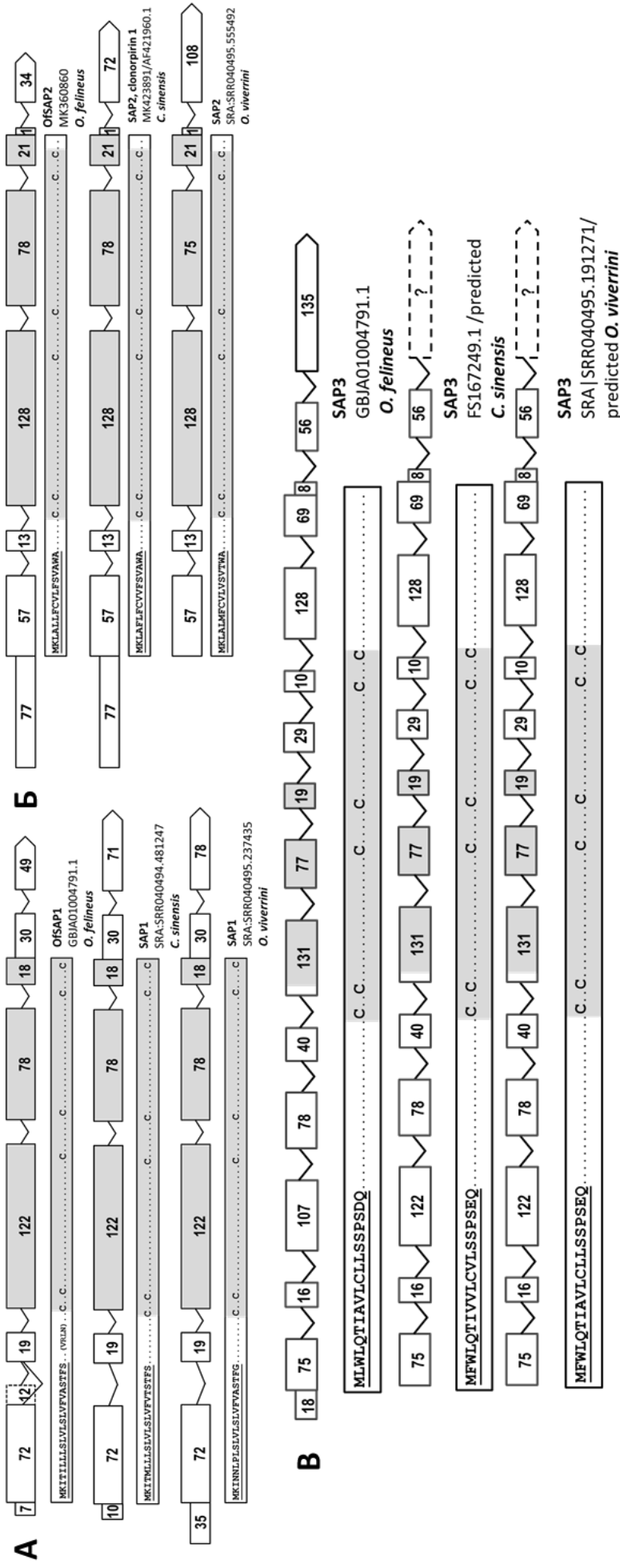
Транскрипты третьей группы – OfSAP3 и его ортологи – содержат по 14 экзонов, четыре из которых представлены микроэкзонами, а три – входят в состав домена сапозин В (Рисунок 1).

Были обнаружены следующие особенности проанализированных транскриптов: 1) все транскрипты содержали микроэкзоны, что говорит о высокой вероятности альтернативного сплайсинга про-мРНК; 2) транскрипт OfSAP1 представлен двумя сплайсформами, образующимися в результате использования разных донорных сайтов первого интрона, причем у *C. sinensis* и *O. viverrini* сигналы для подобного альтернативного сплайсинга отсутствуют.

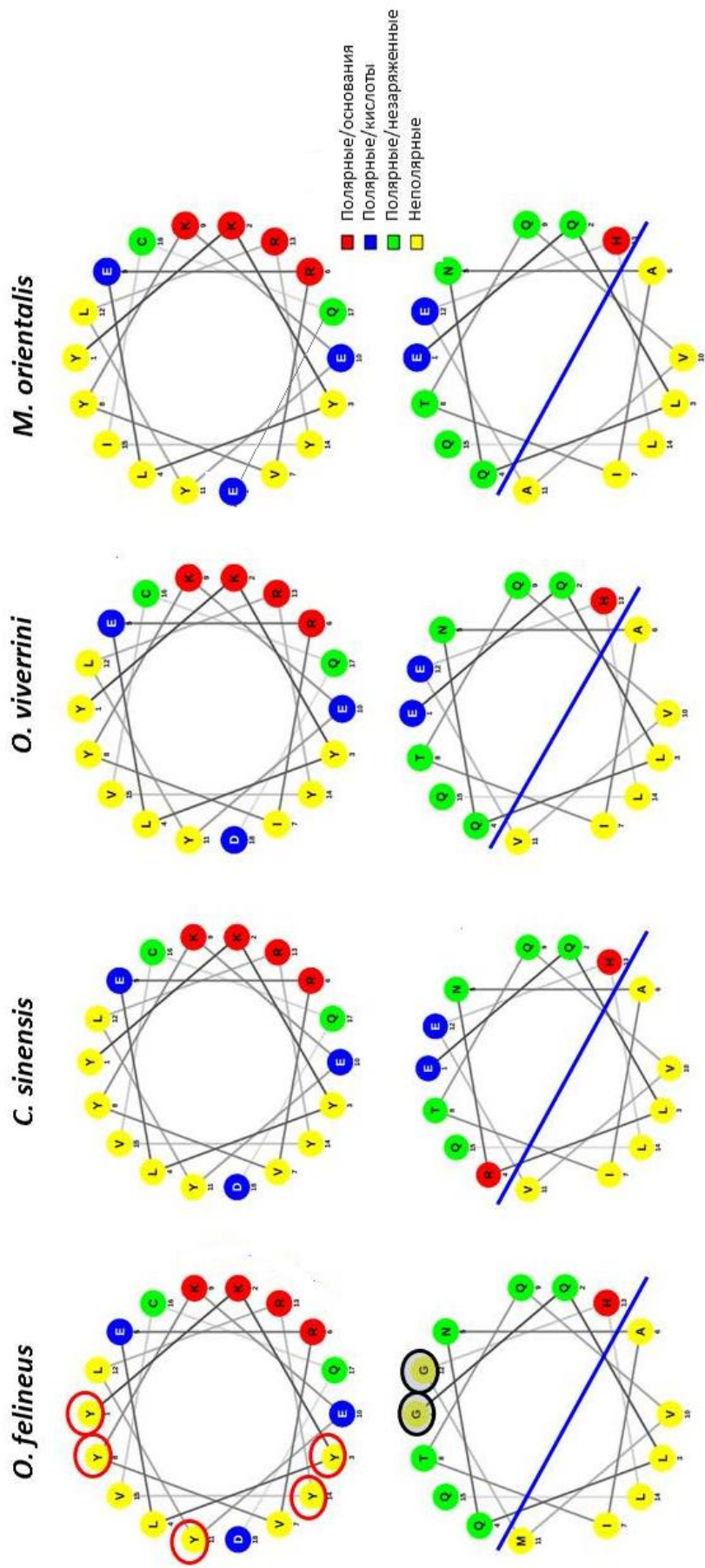
Кроме того, в С-концевой части белков SAP3 идентифицирован белковый мотив, представляющий собой два  $\alpha$ -спиральных участка. Первый  $\alpha$ -спиральный участок содержит пять остатков тирозина на одной стороне и кластер из четырех аминокислот с выраженными свойствами основания – на другой. Второй  $\alpha$ -спиральный участок имеет признаки амфипатичности (Рисунок 2).

Обнаружена специфическая структурная особенность домена сапозин В описторхид: присутствие остатка глицина в 18-ой позиции вместо гидрофильных аминокислотных остатков в аналогичном месте у других трематод.

**Филогенетический анализ** аминокислотных последовательностей домена сапозин В в SAP представителей отрядов Plagiorchiida (печеночные сосальщики – *F. hepatica*, *F. gigantica*, кишечные – *Echinostoma caproni*, легочные – *Paragonimus westermani*) и Opisthorchiida (печеночные

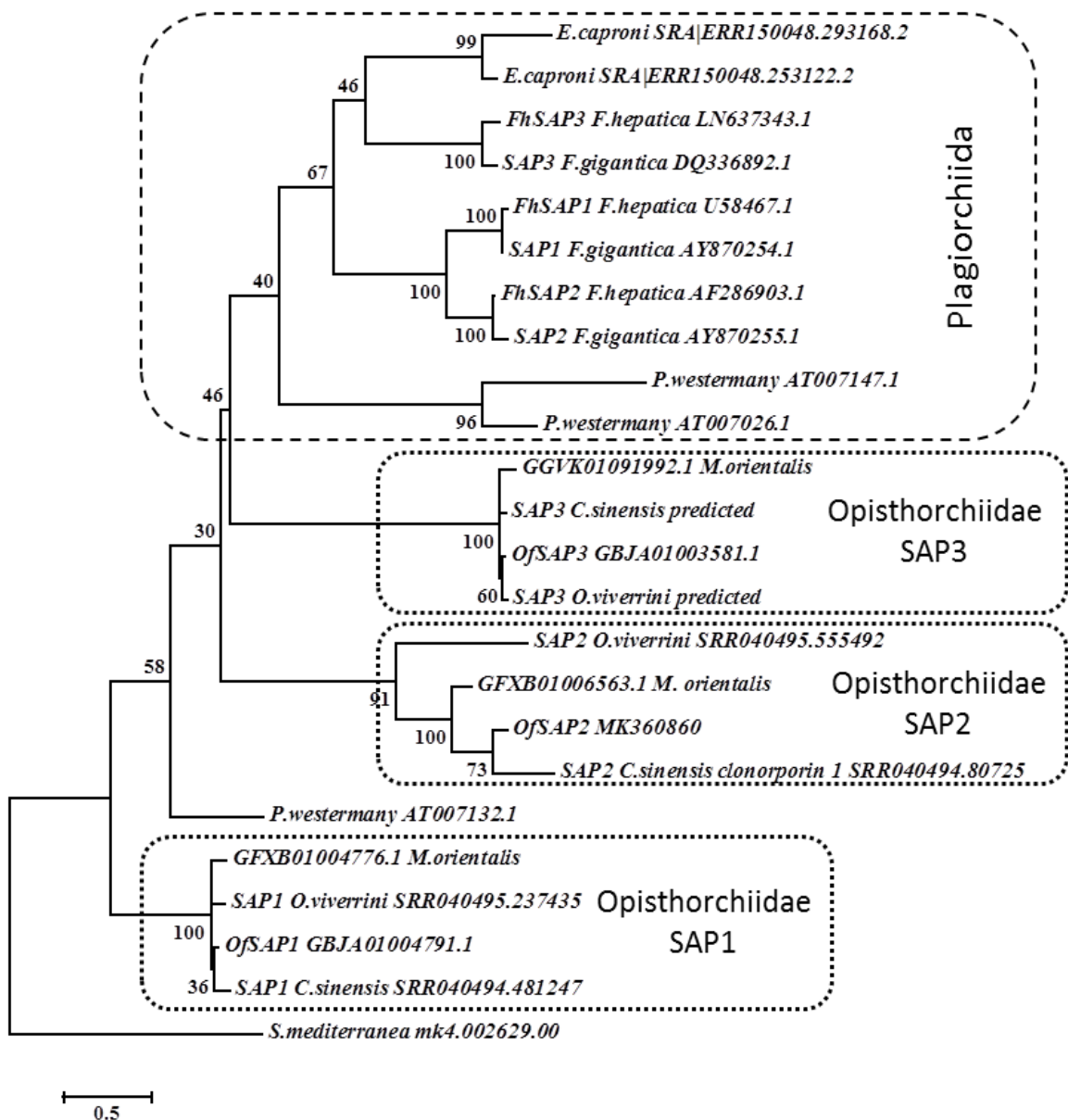


**Рисунок 1.** Экзон-интронная структура генов SAP описторхид. А: OfSAP1 и его ортологи; Б: OfSAP2 и его ортологи; В: OfSAP3 и его ортологи. Серым закрашены участки, соответствующие домену сапозин В; подчеркиванием отмечены аминокислотные последовательности сигнального пептида; С – цистеин. Знаком «?» отмечены 14-е экзоны SAP3 *C. sinensis* и *O. viverrini*, предсказанные на основе геномной модели *O. felinus*. У *C. sinensis* и *O. viverrini* замена G/C на 3' конце последнего интрона нарушает акцепторный сайт, указывая на различия в 3'-концах транскриптов SAP3 разных видов описторхид. Поскольку 14-ый экзон не относится к кодирующей области, это не сказывается на аминокислотной последовательности белка.



**Рисунок 2.** Проекция  $\alpha$ -спиральных участков C-концевых фрагментов OfSAP3 и его ортологов. Верхний ряд: OfSAP3 215–232, *C. sinensis* SAP3 220–237 и *O. viverrini* SAP3 220–237, *M. orientalis* SAP3 220–237 нижний ряд: OfSAP3 241–254, *C. sinensis* SAP3 245–259 и *O. viverrini* SAP3 246–260, *M. orientalis* SAP3 245–259. Красным эллипсом отмечены остатки тирозина, синим эллипсом отмечены остатки глицина (G), которые у трех других видов заменены на остатки глутаминовой кислоты (E). Синяя черта отделяет гидрофобную сторону  $\alpha$ -спирали. Пептиды, представленные в верхнем ряду, представляют собой уникальный тирозин-богатый мотив.

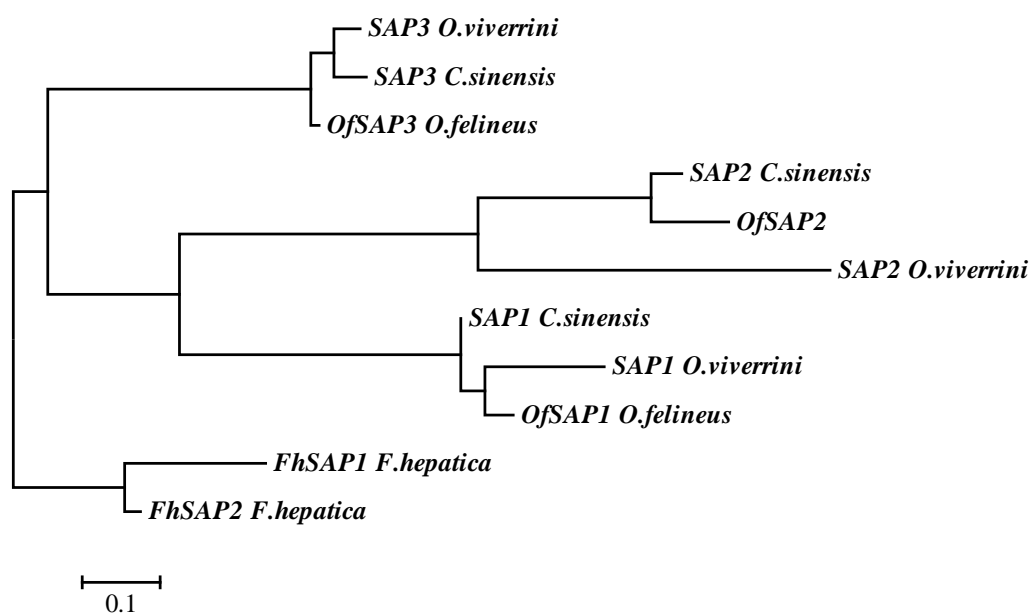
сосальщикои *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*) подтвердил наличие сходных ортологичных групп SAP описторхид, сходных со сформированными по экзон-интронной структуре, и указал на независимое расхождение паралогов внутри каждого отряда (Рисунок 3). В транскриптом четвертого представителя семейства Opisthorchiidae – *Metorchis orientalis* – нами также обнаружены три паралога SAP, которые вместе с SAP представителей «описторхозной триады», формируют три ортологичные группы.



**Рисунок 3.** Филогенетическое дерево, полученное на основе выравнивания аминокислотных последовательностей домена сапозин В представителей отрядов Plagiorchiida и Opisthorchiida. В качестве внешней последовательности использована последовательность домена сапозин В одного из SAPLIP плоского червя - планарии *Schmidtea mediterranea* (mk4.002629.00).

Рисунок 3 демонстрирует отсутствие непосредственных эволюционных связей между SAP представителей разных отрядов, что свидетельствует о независимой специализации их функций в ходе эволюции. По-видимому, структурные вариации в паралогичных группах SAP у разных трематод могут отражать результаты приспособления паразитов к выживанию в разных тканях хозяев.

**Анализ сайтов сплайсинга** выявил их высокий консерватизм в SAP1 и SAP3 описторхид, и значительно меньший – в ортологах SAP2. Филогенетический анализ конкатенированных последовательностей концов интронов в генах SAP1 и SAP2, содержащих по 6 экзонов, и концов 4-8 интронов SAP3 не выявил эволюционных аномалий. Последовательности кластеризуются аналогично тому, как они расположены на филогенетическом дереве, построенном по последовательностям домена сапозин В из разных белков, т.е. формируют те же ортологичные группы (Рисунок 4). Сайты сплайсинга генов FhSAP1 и FhSAP2 (*F. hepatica*) образуют отдельную кладу, еще раз указывая на независимую мультипликацию гена SAP у Plagiorchiida и Opisthorchiida (Рисунок 4).

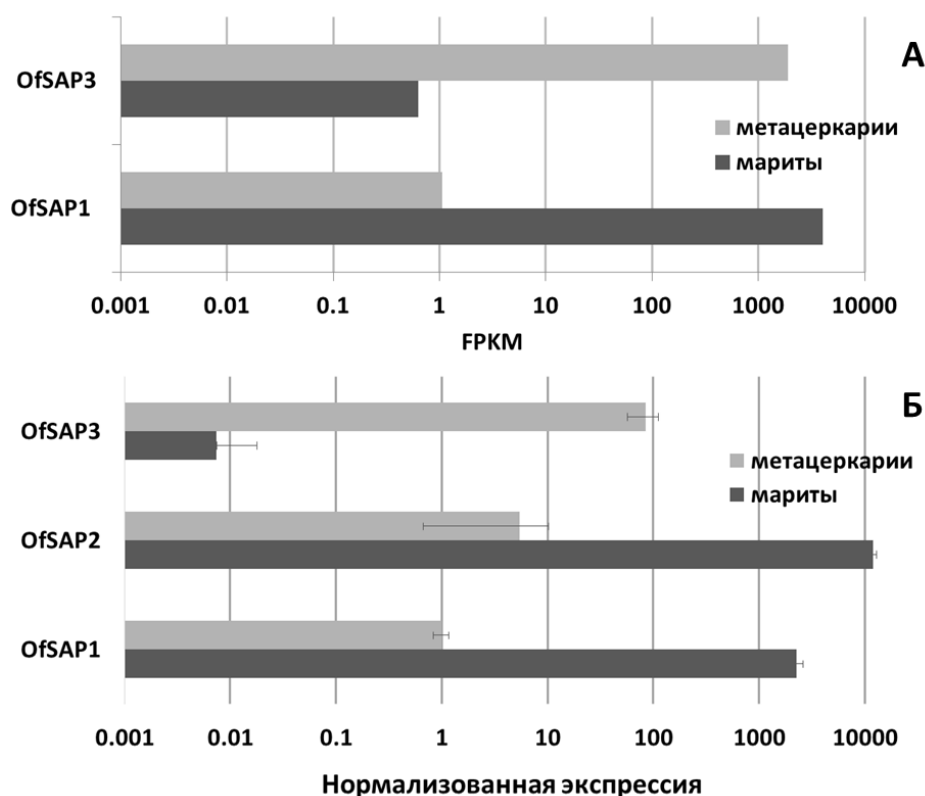


**Рисунок 4.** Филогенетическое дерево, построенное для конкатенированных последовательностей концов интронов двух генов SAP *F. hepatica* и 9 генов SAP описторхид.

**Стадиоспецифичность экспрессии OfSAP.** Сравнение уровней экспрессии генов OfSAP1 и OfSAP3 на разных стадиях жизненного цикла, основанное на данных литературы (Pomaznou *et al.*, 2016), показало, что экспрессия OfSAP1 присуща взрослым паразитам (занимает 20-е место при ранжировании генов по экспрессии во взрослых червях), в то время как экспрессия OfSAP3 является специфичной для метацеркарий (Рисунок 5А). Присутствие уникального структурного мотива в белках SAP3 описторхид (Рисунок 2) и стадиоспецифичность экспрессии OfSAP3 предполагают приспособительное значение белков этой группы.

OfSAP2 впервые описывается в данной работе, и для оценки его экспрессии на разных стадиях жизненного цикла был использован метод ПЦР в реальном времени. В качестве нормализующего был использован ген GAPDH (глицеральдегид- 3- фосфатдегидрогеназа, GBJA01012155.1), экспрессия которого не различается у взрослых описторхов и метацеркарий (Pomaznou *et al.*, 2016). Для сравнения содержания транскриптов OfSAP2 и OfSAP1 экспрессия последнего была измерена тем же методом (Рисунок 5Б).

Очевидно, что экспрессия гена OfSAP2 приблизительно в 4 раза выше, чем OfSAP1, у взрослых *O. felineus* этот ген является наиболее экспрессированным геном SAP и входит в 5 наиболее представленных транскриптов.



**Рисунок 5.** Экспрессия генов OfSAP на разных стадиях жизненного цикла (А) на основе данных литературы, (Б) по данным ПЦР в реальном времени. Данные представлены как lg FPKM (А) или нормализованная экспрессия (Б).

Для сравнения полученных нами данных о стадиоспецифичности экспрессии генов SAP у *O. felineus* с данными об экспрессии их ортологов у других описторхид были проанализированы доступные транскриптомные данные. По результатам секвенирования библиотеки EST взрослых особей *C. sinensis* было показано, что SAP2 (клонорпорин 1) занимает 14-ое место в рейтинге представленности транскриптов, и на его долю приходится 0,34% прочтений (Yoo *et al.*, 2011). По данным Ю и др. экспрессия гена SAP1 на взрослой стадии *C. sinensis* несколько ниже, ему соответствует 0,2% прочтений. Последовательности, соответствующие SAP3, не были обнаружены среди транскриптов взрослых особей *C. sinensis* (ни в

библиотеке NGS-прочтений транскриптома, ни в библиотеке EST), однако SAP3 был найден в библиотеке EST метацеркарий *C. sinensis*, где ему соответствует 0,013% прочтений.

Анализ библиотек NGS-прочтений транскриптомов *O. viverrini* и *M. orientalis* показал, что у обоих видов гены SAP1 и SAP2 экспрессируются на взрослой стадии, причем экспрессия SAP2 выше экспрессии SAP1. Кроме того, была обнаружена экспрессия SAP3 у метацеркарий *M. orientalis*.

Таким образом, стадиоспецифичность экспрессии ортологов SAP1-3 в основном воспроизводится у всех четырех видов описторхид: экспрессия генов SAP1 и SAP2 характерна для взрослых паразитов, в то время как SAP3 специфически экспрессируется у метацеркарий.

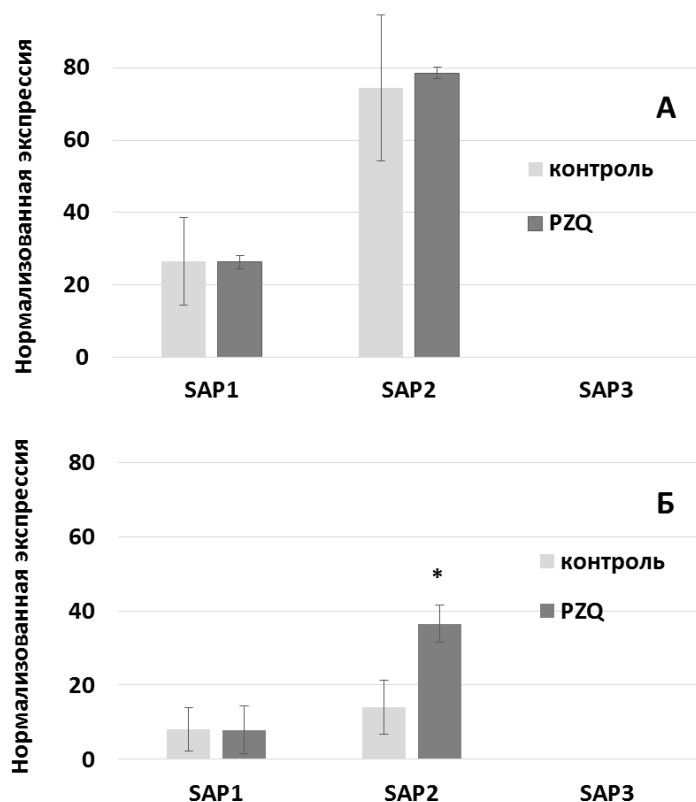
**Влияние празиквантела (PZQ) на взрослых особей *O. felineus*.** При заражении хомячков 100 метацеркариями в печени животных контрольной группы (n=3) было обнаружено в среднем 35 взрослых паразитов, а лечение животных (n=6) празиквантелом вызывает уменьшение этого числа до 17 шт. Исследование влияния разных доз празиквантела на взрослых червей *in vitro* показало, что даже при дозе 50 мкг/мл небольшая доля паразитов восстанавливает жизнеспособность и подвижность после удаления препарата из среды.

Пропидиум йодид не проникает через поверхность тела червей и не окрашивает тегумент червей, не подвергавшихся действию празиквантела. Однако краситель обнаруживается в тегументе червей, подвергшихся действию 10 мкг/мл празиквантела. Полученные результаты согласуются с реакцией на празиквантел других трематод, но причина нарушения целостности тегумента под действием празиквантела до сих пор не выяснена (Apinhasmit, Sobhon, 1996; Cupit, Cunningham, 2015).

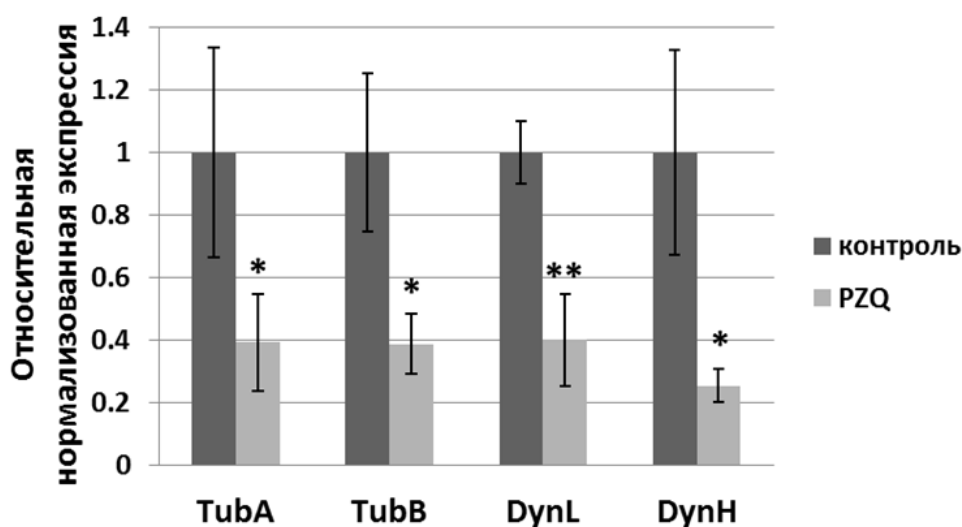
Было обнаружено, что добавление празиквантела при инкубации червей *in vitro* не влияет на экспрессию генов OfSAP (Рисунок 6А). В то же время празиквантел *in vivo* вызывает повышение экспрессии гена OfSAP2 через 24 часа после начала лечения, но не влияет на экспрессию OfSAP1 (Рисунок 6Б). Данные были нормализованы на экспрессию генов GAPDH и SDHB (субъединица В сукцинатдегидрогеназы митохондрий, GBJA01011183.1). Сравнение результатов исследования влияния PZQ *in vivo* и *in vitro* указывают на то, что инкубация червей вне хозяина сама по себе способствует увеличению экспрессии тех генов OfSAP, экспрессия которых специфична для взрослых особей. Таким образом, экспрессия гена OfSAP2 возрастает в ответ на PZQ, а также в ответ на инкубацию *in vitro*, а экспрессия OfSAP1 увеличивается только в ответ на содержание червей вне хозяина.

Мы проверили корегуляцию экспрессии гена OfSAP2 и генов, продукты которых, как мы предполагаем, могут участвовать в транспорте везикул к поверхности тегумента в процессе его обновления/репарации. В то время как экспрессия OfSAP2 увеличивается в ответ на празиквантел *in vivo*, экспрессия нескольких генов, вовлеченных в транспорт по микротрубочкам, уменьшается. В частности, было обнаружено снижение экспрессии генов

структурных белков микротрубочек тубулина  $\alpha$  и тубулина  $\beta$ , а также легкой и тяжелой цепей моторного белка динеина, что может объяснить прогрессирующее нарушение целостности тегумента при продолжительном воздействии празиквантела (Рисунок 7).



**Рисунок 6.** Нормализованная экспрессия генов SAP1, SAP2 и SAP3 у взрослых особей *O. felinus*: (А) после 24 ч. инкубации *in vitro* в среде, содержащей празиквантел; (Б) после обработки празиквантелом *in vivo*; \*  $p < 0,01$ .



**Рисунок 7.** Относительная нормализованная экспрессия генов TubA, TubB, DynL и DynH; \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ .



Таким образом, участие SAP *O. felineus* в репарации тегумента представляется маловероятным. Более вероятно, что он играет важную роль в процессе питания взрослых паразитов. Необходимо отметить, что белок клонорпорин 1 *C. sinensis*, являющийся ортологом OfSAP2, не был обнаружен при анализе состава ЭСП с помощью хроматографии и масс-спектрометрии (Zheng *et al.*, 2011; 2013), однако наличие антител к этому белку в сыворотках крови больных клонорхозом указывает на его присутствие в ЭСП (Lee *et al.*, 2002).

Филогенетический анализ выявил, что в SAP2 *O. viverrini* аминокислотная последовательность домена сапозин В значительно отличается от двух других видов описторхид (Рисунок 3 и 4). Эти различия заметны и в суммарном заряде домена сапозин В в SAP2 у разных видов описторхид: в то время как *O. felineus* и *C. sinensis* домен заряжен положительно, у *O. viverrini* он имеет отрицательный заряд.

Хотя представители «описторхозной триады» весьма схожи между собой по строению и образу жизни, известно, что *O. viverrini*, в отличие от двух других видов, не использует кровь в качестве источника питания, и характеризуется меньшей патогенностью по сравнению с *O. felineus* (Lvova *et al.*, 2012; 2016). Это косвенно подтверждает предположение об участии SAP2 в разрушении клеток при гематофагии.

#### **Глава 4. Заключение**

В геномах каждого из трех видов, относящихся к «описторхозной триаде» обнаружено по три паралога SAP. В транскриптом *M. orientalis* – четвертого представителя семейства Opisthorchiidae – также обнаружено три паралога SAP, которые вместе с SAP трематод «описторхозной триады», формируют три ортологичные группы.

Филогенетический анализ, основанный на аминокислотных последовательностях домена сапозин В, выявил независимое увеличение количества паралогичных генов в отрядах Opisthorchiida и Plagiorchiida. С учетом значительных различий в способах паразитизма у представителей разных отрядов (паразитирование в печени, тонком кишечнике, легких), это может свидетельствовать о важном приспособительном значении SAP, в том числе для паразитизма.

Анализ экспрессии генов SAP *O. felineus* показал, что она меняется при изменении условий среды, связанных с питанием паразитов: при отсутствии доступа к клеткам и желчи хозяина увеличивается экспрессия генов OfSAP1 и OfSAP2, однако, если доступ к желчи не прекращается, экспрессия OfSAP1 не меняется. Свидетельства структурно-функциональной ортологии генов SAP описторхид, выявленные в настоящей работе, позволяют нам предположить, что белки SAP2 участвуют в разрушении клеточных мембран в процессе питания паразитов и играют важную роль во взаимоотношениях паразита и хозяина.

Белки группы SAP3 содержат уникальный структурный мотив, определение функций которого представляется актуальной задачей будущих исследований.

Данная работа существенно дополняет структурно-функциональные данные о сапозин-подобных белках описторхид, создает общее системное представление о SAP описторхид, особенностях структуры этих белков и кодирующих их генов, а также филогенетических связях друг с другом и другими SAP у трематод отряда Plagiorchiida. Тем самым открываются новые перспективы для исследования функций сапозин-подобных белков, для выяснения их роли в паразитизме и патогенезе трематод.

### Выводы

1. В геномах четырех представителей семейства Opisthorchiidae (*Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* и *Metorchis orientalis*) обнаружено по три гена, кодирующих сапозин В-подобные белки (SAP). Анализ экзон-интронной структуры этих генов, доменной организации предсказанных белков и филогенетическая реконструкция продемонстрировали наличие трех групп ортологов, высоко консервативных в пределах семейства.
2. Обнаружено независимое увеличение числа паралогов генов SAP в разных отрядах трематод с последующей дивергенцией паралогов.
3. Впервые показано, что гены SAP описторхид *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. orientalis* специфически экспрессируются на разных стадиях жизненного цикла: экспрессия SAP1 и SAP2 характерна для взрослых паразитов, а SAP3 является преобладающим паралогом на стадии метацеркарии.
4. В белках SAP3 *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* и *M. orientalis* впервые обнаружен высоко консервативный белковый мотив, представляющий собой участок  $\alpha$ -спирали, одна сторона которой содержит пять остатков тирозина, а другая – кластер из четырех аминокислот с выраженными свойствами основания.
5. Впервые показано, что в условиях *in vivo* противогельминтный препарат празиквантел вызывает увеличение экспрессии гена SAP2 у *O. felineus*. При этом культивирование взрослых особей *O. felineus in vitro* вызывает повышение экспрессии гена SAP2 как в присутствии, так и в отсутствие празиквантела, что может быть вызвано прекращением поступления клеток крови и/или эпителия желчных протоков в кишечник паразита, и косвенно указывает на участие белка SAP2 в разрушении клеточных мембран.

### Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. **Pirozhkova D.**, Katokhin A. *Opisthorchis felineus* genes differentially expressed under praziquantel shed light on the nature of tegument disruption and indicate the adaptive role of cGMP-dependent protein kinase // Parasitology Research. 2020. V.119. P. 2695–2702
2. **Pirozhkova D.**, Katokhin A. Saposin-like proteins in *Opisthorchis felineus* and related opisthorchids // Infection, Genetics and Evolution. 2020. V.78. 104132

3. Pakharukova M., Shilov A., **Pirozhkova D.**, Katokhin A., Mordvinov V. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda) // International Journal of Antimicrobial Agents. 2015. V.46. № 1. P. 94-100

**Список тезисов, опубликованных по теме диссертации:**

1. **Пирожкова Д.С.**, Катохин А.В. Транскрипт *Opisthorchis felineus*, кодирующий белок с автономным доменом sarosin B. Сборник тезисов 7-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г.), стр. 718

2. **Пирожкова Д.С.**, Помазной М.Ю., Катохин А.В. Поиск генов печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*, экспрессия которых изменяется в ответ на празиквантел *in vivo*. Современная паразитология — основные тренды и вызовы. Материалы 6-го Съезда Паразитологического общества (Санкт-Петербург, 15–19 октября 2018 г.), стр. 184