

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Пирожкова Дарья Сергеевна

**Структурно-функциональная организация генов
сапозин В-подобных белков у описторхид**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Катохин Алексей Вадимович

Новосибирск 2021

Оглавление

| | |
|---|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Общая характеристика описторхид | 12 |
| 1.1.1 Трематоды и вызываемые ими трематодозы | 12 |
| 1.1.2 Морфология и жизненный цикл представителей «описторхозной триады» | 13 |
| 1.1.3 Ареал «описторхозной триады» | 17 |
| 1.1.4 Патогенез описторхоза и клонорхоза | 17 |
| 1.2 Физиология печеночных сосальщиков «описторхозной триады» | 19 |
| 1.2.1 Взаимодействие между паразитом и хозяином | 19 |
| 1.2.2 Строение и функции тегумента трематод | 19 |
| 1.2.3 Экскреторно-секреторный продукт | 22 |
| 1.3 Сапозин-подобные белки | 24 |
| 1.3.1 Структура сапозин-подобных белков | 24 |
| 1.3.2 Функции и механизм действия SAPLIP | 26 |
| 1.3.3 SAP трематод | 29 |
| 1.4 Празиквантел | 30 |
| 1.4.1 Механизм действия | 30 |
| 1.4.2 Снижение чувствительности/устойчивость паразитов к противопаразитарным препаратам | 32 |
| 1.4.3 Чувствительность и устойчивость трематод к празиквантелу | 33 |
| 1.4.4 Гипотезы о влиянии празиквантела на экспрессию генов SAP описторхид | 34 |
| 1.5 Заключение | 35 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2 | МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 37 |
| 2.1 | Материалы | 37 |
| 2.1.1 | Готовые растворы и смеси: | 37 |
| 2.1.2 | Растворы: | 37 |
| 2.1.3 | Наборы | 38 |
| 2.1.4 | Реактивы | 38 |
| 2.2 | Оборудование | 38 |
| 2.3 | Методы | 39 |
| 2.3.1 | Работа с лабораторными животными и получение паразитов | 39 |
| 2.3.2 | Оценка чувствительности взрослых особей <i>Opisthorchis felineus</i> к празиквантелу <i>in vitro</i> | 39 |
| 2.3.3 | Оценка целостности тегумента | 40 |
| 2.3.4 | Выделение РНК | 40 |
| 2.3.5 | Обратная транскрипция | 41 |
| 2.3.6 | Праймеры для ПЦР | 41 |
| 2.3.7 | ПЦР | 42 |
| 2.3.8 | Очистка ампликонов с помощью электрофореза в GTG-агарозе | 43 |
| 2.3.9 | Секвенирование | 43 |
| 2.3.10 | ПЦР в реальном времени | 44 |
| 2.4 | Биоинформатический анализ | 45 |
| 3 | РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ | 47 |
| 3.1 | Поиск и анализ генов сапозин-подобных белков у описторхид | 47 |
| 3.1.1 | Поиск транскриптов белков с единственным доменом сапозин В в транскриптом <i>O. felineus</i> | 47 |
| 3.1.2 | Идентификация гомолога клонорпорина 1 у <i>O. felineus</i> | 49 |
| 3.1.3 | Альтернативный сплайсинг мРНК OfSAP1 | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.4 Сапозин В-подобные белки <i>Clonorchis sinensis</i> , <i>Opisthorchis viverrini</i> и <i>Metorchis orientalis</i> | 51 |
| 3.1.5 Экзон-интронная структура генов и доменная организация белков SAP описторхид | 53 |
| 3.2 Филогенетический анализ | 58 |
| 3.2.1 Филогенетические отношения сапозин-подобных белков описторхид и других трематод | 58 |
| 3.2.2 Консерватизм сайтов сплайсинга | 61 |
| 3.3 Стадиоспецифичность экспрессии генов сапозин В-подобных белков описторхид | 63 |
| 3.3.1 Экспрессия генов OfSAP1–3 на разных стадиях жизненного цикла | 64 |
| 3.3.2 Стадиоспецифичность экспрессии генов SAP у <i>C. sinensis</i> , <i>O. viverrini</i> и <i>Metorchis orientalis</i> | 65 |
| 3.4 Действие празиквантела на <i>O. felineus</i> | 68 |
| 3.4.1 Эффективность празиквантела <i>in vivo</i> | 68 |
| 3.4.2 Чувствительность взрослых особей <i>O. felineus</i> к празиквантелу <i>in vitro</i> | 69 |
| 3.4.3 Нарушение целостности тегумента <i>O. felineus</i> под действием празиквантела | 70 |
| 3.4.4 Влияние празиквантела на экспрессию генов SAP у взрослых особей <i>O. felineus</i> | 72 |
| 3.5 Возможные функции сапозин В-подобных белков описторхид | 78 |
| 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 80 |
| ВЫВОДЫ | 82 |
| Список сокращений | 83 |
| Список литературы | 84 |

Введение

Актуальность проблемы

Обь-Иртышский бассейн является самым крупным очагом описторхоза – гельминтоза, вызванного кошачьей двуусткой *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) (Беэр, 2005). *O. felineus* – 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 эпидемиологическую 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/клонорхоз вызывает 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). Основным препаратом, используемым для лечения описторхоза/клонорхоза и других гельминтозов, вызываемых трематодами, является празиквантел, однако точный механизм его действия не известен (Chai *et al.*, 2013). Кроме того существует потребность в совершенствовании лечения описторхоза (Байкова и др., 2017). Таким образом, исследования различных аспектов биологии описторхид, и в том числе, их генетики представляют несомненную актуальность.

Сапозин В – это белок и одноименный белковый домен, не имеющие ферментативной активности, способные связывать липидоподобные молекулы. Домен сапозин В очень распространен у эукариот: содержащие его белки обнаружены и у животных, и у растений, и у грибов, а также у некоторых простейших, эволюционно далеких друг от друга (Bruhn *et al.*, 2005). Такое всеобщее распространение указывает не только на его древность, но и на то, что он выполняет базовые физиологические функции с помощью механизмов, появившихся на ранних этапах эволюции. Домен состоит из примерно 80

аминокислотных остатков, формирующих 4-5 амфипатических α -спиралей, содержит 6 остатков цистеина, образующих 3 дисульфидных мостика. Эта специфическая укладка очень консервативна и обеспечивает способность связывать липиды и другие гидрофобные молекулы. В то же время аминокислотный состав домена может существенно различаться. Белки, содержащие домен сапозин В, объединяются в семейство сапозин-подобных белков (saposin-like proteins, SAPLIP) (Munford *et al.*, 1995).

Домен сапозин В может быть либо единственным доменом в белке, либо их может быть несколько; или же сапозин В может быть представлен в белке вместе с ферментативным доменом, катализирующим гидролиз (Bruhn *et al.*, 2005). Наиболее известными представителями семейства SAPLIP являются одноименный белок сапозин В, эффекторный белок лейкоцитов гранулизин (Anderson *et al.*, 2003), а также пороформирующие белки дизентерийной амёбы *Entamoeba histolytica* амёбапоры А и В (Leippe, 1997). Белок сапозин В – это лизосомный белок, извлекающий молекулы липидов из мембраны, делая их доступными для ферментативного гидролиза. Сапозины А, С и D тоже являются лизосомными белками, содержат по одному домену сапозин В и вместе с белком сапозин В образуются при протеолитическом процессинге просапозина, содержащего несколько доменов сапозин В (O'Brien, Kishimoto, 1991). Сапозин С, помимо активации гидролиза мембранных липидов, участвует в слиянии мембран (Wang, *et al.*, 2003).

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 эффекторные белки лейкоцитов гранулизин и НК-лизин, а также пороформирующие белки дизентерийной амёбы (*E. 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* (Grams *et al.*, 2006) и кровяных сосальщиков рода *Schistosoma* (Liu *et al.*, 2016). Известно, что некоторые SAP обладают способностью разрушать мембраны клеток, что может выступать дополнительным фактором патогенности этих гельминтов.

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). По-видимому, он входит в состав экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) паразита и участвует во взаимодействии паразита и хозяина. Таким образом, есть основания полагать, что SAP играют важную роль во взаимодействии паразита и хозяина, что указывает на необходимость более пристального изучения этого белкового/генного подсемейства.

Данные массового параллельного секвенирования позволяют оценить разнообразие транскриптов SAP 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 α -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

По материалам диссертации опубликовано три статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций.

1. 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

2. **Pirozhkova D.**, Katokhin A. Saposin-like proteins in *Opisthorchis felineus* and related opisthorchids // Infection, Genetics and Evolution. 2020. V.78. 104-132
3. **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

Результаты исследования были представлены на двух конференциях и опубликованы в сборниках тезисов:

1. **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 VI Съезда Паразитологического общества. г. Санкт-Петербург, 15–19 октября 2018 г.
2. **Пирожкова Д.С.**, Катохин А.В. Транскрипт *Opisthorchis felineus*, кодирующий белок с автономным доменом saposin B. Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. г. Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г.

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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю – к.б.н. Катохину Алексею Вадимовичу за общее руководство и помощь на всех этапах выполнения диссертации. Автор благодарит д.б.н. Пахарукову М.Ю. за совместную работу и бесценный опыт. Автор также выражает глубокую признательность к.б.н. Помазному М.Ю. за его вдохновляющее исследование транскриптома *Opisthorchis felineus*. Автор благодарит академика РАН Колчанова Н.А. и д.б.н. Мордвинова В.А., как инициаторов исследований в ИЦиГ СО РАН возбудителя описторхоза. Автор благодарен лаборантам Голубевой Н.М. и Красовской Г.М. за помощь в работе с лабораторными животными. Автор искренне благодарит д.б.н. Захарова И.К., к.б.н. Березикова Е.В. и к.б.н. Шеховцова С.В. за рецензирование диссертации, а также д.б.н. Грунтенко Н.Е. за поддержку и помощь в подготовке автореферата диссертации и доклада.

1 Обзор литературы

1.1 Общая характеристика описторхид

1.1.1 Трематоды и вызываемые ими трематодозы

Трематодозами называют болезни человека и животных, вызываемые плоскими червями класса Trematoda, полностью представленного паразитическими видами. В составе класса выделяют 2 подкласса (или клады): дигенетические сосальщики – Digenea; и аспидогастреи – Aspidogastrea (Гинецинская, 1968).

Наибольший научный и медицинский интерес вызывают трематоды, способные инфицировать человека, среди которых стоит выделить несколько семейств подкласса Digenea: кровяных сосальщиков Schistosomatidae (отряд Strigeidida); печеночных сосальщиков Opisthorchiidae (отряд Opisthorchiida) и Fasciolidae (отряд Plagiorchiida); а также кишечных сосальщиков Echinostomatidae (отряд Plagiorchiida), взрослые особи которых паразитируют в кровеносных сосудах, печени и кишечнике окончательного хозяина, соответственно.

Представители рода *Schistosoma* семейства Schistosomatidae паразитируют в кровеносных сосудах, вызывая шистосомоз – острую или хроническую паразитарную болезнь, распространенную в тропических и субтропических районах (Weerakoon *et al.*, 2015).

Печеночные сосальщики рода *Fasciola* семейства Fasciolidae инфицируют преимущественно коров и овец, но заражение людей тоже возможно. В острой стадии фасциолёза происходит миграция ювенильных червей через брюшную полость и паренхиму печени, пока они не достигнут желчных протоков, где они и достигают половой зрелости (Lockart *et al.*, 2018).

Печеночные сосальщики рода *Opisthorchis* (и синонимичного рода *Clonorchis*) семейства Opisthorchiidae вызывают описторхоз и клонорхоз, соответственно, паразитируя в желчных протоках печени, желчном пузыре и протоках поджелудочной железы. Описторхиды, в отличие от фасциол,

мигрируют в протоки печени по проксимальным отделам желчевыводящей системы. Род *Opisthorchis* представлен видами *O. felineus* (Rivolta, 1884), *O. viverrini* (Poirier, 1886), а также *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), который ранее считался единственным видом рода *Clonorchis*, но современные исследователи тоже относят его к роду *Opisthorchis*, сохранив, однако, историческое название. Виды *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* образуют так называемую «описторхозную триаду» (Безр, 2005).

Печеночные сосальщики рода *Metorchis* семейства Opisthorchiidae имеют много общего с видами «описторхозной триады», в частности, жизненный цикл и специфичность в отношении второго промежуточного и окончательного хозяев (Mordvinov *et al.*, 2012). Известны случаи смешанной инфекции *O. felineus* и *Metorchis bilis* у людей (Брусенцов и др., 2010). *Metorchis orientalis* также может инфицировать человека (Gao *et al.*, 2018).

В жизненном цикле дигенетических сосальщиков всегда происходит смена хозяина, и первым промежуточным хозяином являются моллюски. Наиболее распространен триксенный жизненный цикл, в котором, помимо окончательного хозяина – позвоночного, и первого промежуточного хозяина - моллюска, есть второй промежуточный хозяин, относящийся к беспозвоночным (членистоногие, моллюски) или позвоночным (рыбы, амфибии) (Esch, 2002). Диксенный жизненный цикл – тоже не редкость, и реализуется, например, у представителей родов *Schistosoma* и *Fasciola*.

1.1.2 Морфология и жизненный цикл представителей «описторхозной триады»

Описторхиды характеризуются жизненным циклом со сменой трёх хозяев (Рисунок 1). Животные, питающиеся речной рыбой семейства карповых: лисицы, кошки, росوماхи, свиньи, а также человек, являются окончательными хозяевами.

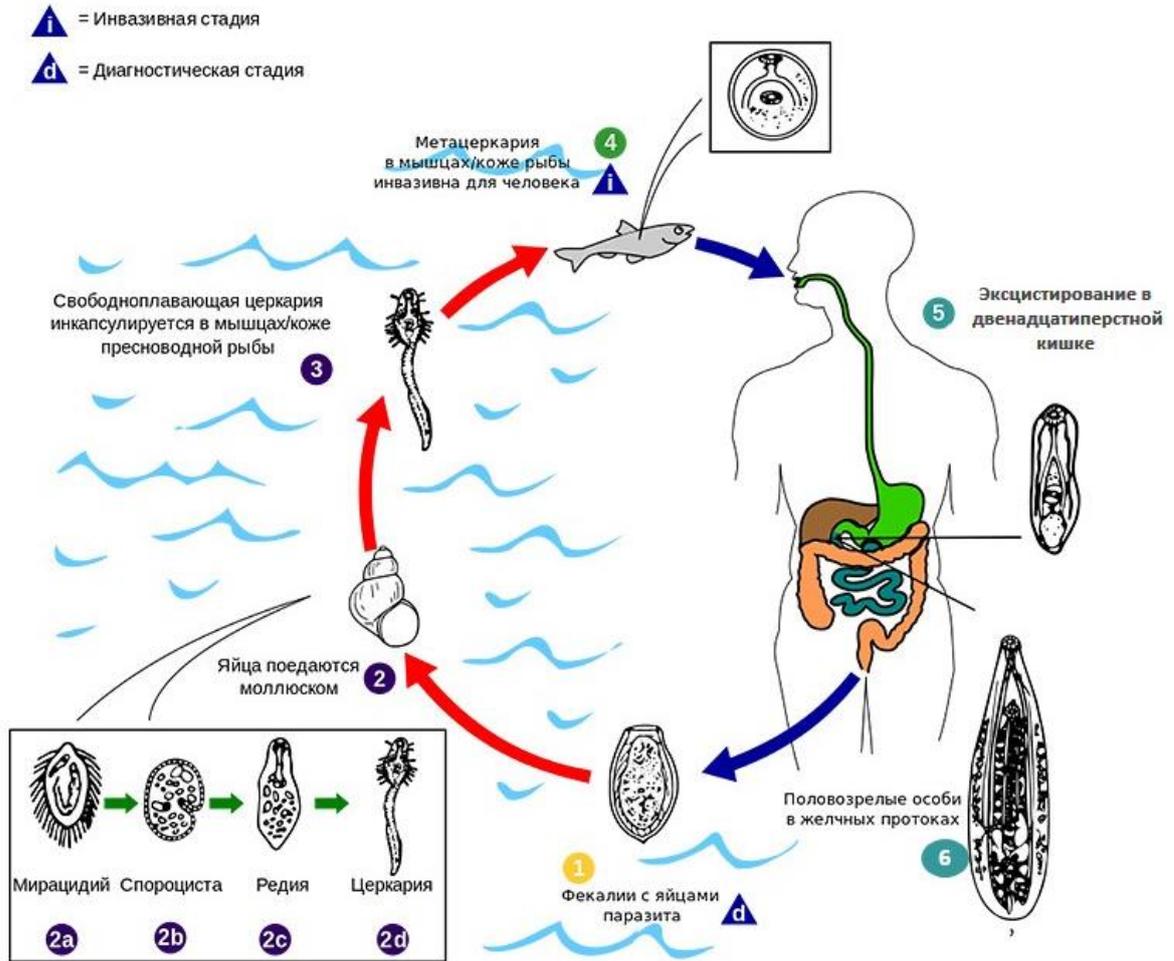


Рисунок 1. Жизненный цикл описторхид на примере *O. felinus* (адаптировано с <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Opisthorchiasis.htm>).

В желчных протоках окончательных хозяев развиваются взрослые паразиты – мариты, которые способны производить яйца. Мариты имеют листовидное плоское полупрозрачное тело длиной 4–13 мм и шириной 1–3,5 мм с заостренным передним концом. Мариты трёх видов, относящихся к описторхозной триаде, представлены на Рисунке 2А-В. Ротовая присоска располагается у переднего конца тела, в её глубине скрыто ротовое отверстие, ведущее в глотку, за которой следует пищевод, продолжающийся в два слепо заканчивающихся в конце тела кишечных ствола. Вторая присоска – брюшная – является средством прикрепления и представляет собой округлый замкнутый мышечный орган. Строение мариты *O. felinus* представлено на Рисунке 2Г.

Тело взрослого паразита покрыто тегументом, представляющим собой погруженный эпителий, в котором ядросодержащие части клеток – цитоны тегумента – погружены вглубь тела и соединяются с поверхностным синцитиальным слоем и между собой цитоплазматическими мостиками (подробнее в разделе 1.2.2).

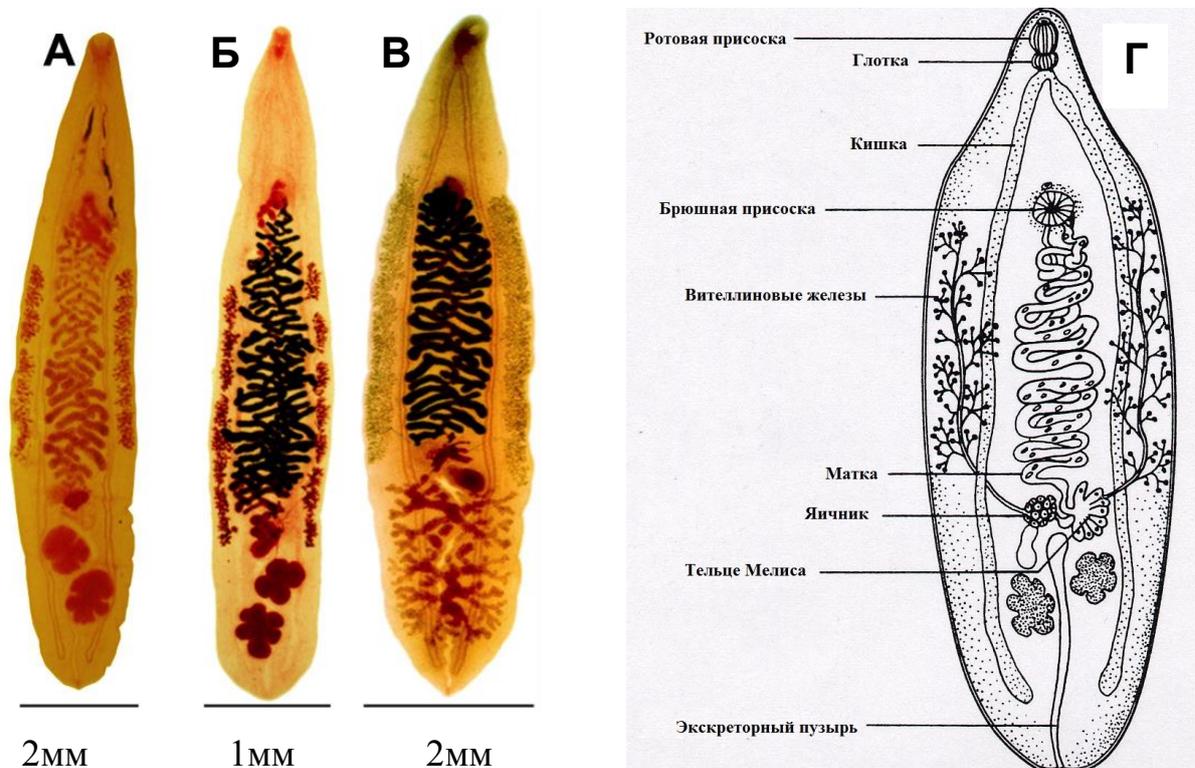


Рисунок 2. Взрослые особи представителей описторхозной триады. А-Г: Паразиты, окрашенные гематоксилин-эозином: А – *O. felinus*, Б – *O. viverrini*, В – *Clonorchis sinensis*; Г: Строение мариты *O. felinus* (Bogitsh et al., 2019).

Описторхиды, в отличие от шистосом, которые раздельнополы, являются облигатными гермафродитами. Матка открывается генитальным отверстием рядом с брюшной присоской и занимает значительную часть организма. Яичник посредством яйцевода соединен с оотипом, в котором происходит оплодотворение и формирование яиц. В него же открываются протоки, идущие от от желточных клеток, расположенных группами латерально от стволов кишечника, а также от тельца Мелиса, выделяющего жидкость, облегчающую продвижение яиц по половым путям. Мужская часть половой системы состоит из двух семенников, имеющих лопастное строение у описторхов и разветвленное – у клонорха (Рисунок 2А-В). От семенников отходят семявыносящие каналы,

идушие вперёд до брюшной присоски и объединяющиеся в семяпровод, который открывается генитальным отверстием возле брюшной присоски. Хотя близкое расположение генитальных отверстий матки и семяпровода повышает вероятность самооплодотворения, анализ гаплотипов митохондриального гена цитохромоксидазы I (COI) и транскрибируемого спейсера ядерного рибисомального кластера (ITS2) *O. felineus* указывает на предпочтительность перекрестного оплодотворения у этого вида (Катохин и др., 2008).

Оплодотворенные яйца покидают тело паразита через генитальное отверстие и с током желчи попадают в кишечник, откуда выводятся наружу с калом. Для продолжения жизненного цикла яйцо должно попасть в водоем, где его должен съесть брюхоногий моллюск семейства Vithyniidae. В кишечнике улитки из яйца выходит подвижная личинка – мирацидий, которая мигрирует через стенку кишечника в полость тела моллюска, где претерпевает регрессивный метаморфоз, превращаясь в материнскую спороцисту, состоящую из зародышевых клеток и экскреторной системы, представленной парой мерцательных клеток. Внутри спороцисты после партеногенетического размножения формируются редии. В задней части тела редии из генеративных клеток путем партеногенеза развивается следующее личиночное поколение – церкарии.

Церкарии покидают тело улитки и после непродолжительного свободного плавания проникают в покровы карповых рыб. Церкарии имеют мускулистый хвост, обеспечивающий подвижность, ротовую присоску, соединённую с глоткой, и слабо развитую брюшную присоску. Вокруг ротовой присоски расположены шипы и железы проникновения. Проникнув под кожу рыбы, церкария отбрасывает хвост и инцистируется, превращаясь в метацеркарию – инвазивную личинку паразита.

Будучи съеденной вместе с рыбой, в желудке окончательного хозяина метацеркария начинает эксцистироваться. Освободившись от оболочки, ювенильные черви проникают в желчный пузырь через ампулу дуоденального

сосочка и мигрируют в более дистальные отделы желчевыводящих путей, где растут и примерно через три недели достигают половой зрелости (Беэр, 2005).

1.1.3 Ареал «описторхозной триады»

Виды, относящиеся к «описторхозной триаде», имеют разные ареалы. Территории, эндемичные по *O. viverrini* – это Вьетнам, Лаос, Таиланд и Камбоджа, а *C. sinensis* распространен в Китае, Тайване, Корее, Японии, в северной части Вьетнама и в дальневосточной части России. *O. felineus* распространен преимущественно на территории Западной Сибири – в России и Казахстане, и в некоторых странах Восточной Европы. Кроме того, известны случаи заражения людей на территории Западной Европы. Количество людей, зараженных печеночными сосальщиками этих трех видов, составляет не менее 46 млн человек, из которых 35 млн инфицированы *C. sinensis*, и только около 1,5 млн – *O. felineus* (Keiser, Utzinger, 2010; Saijuntha *et al.*, 2019). Ареалы *O. viverrini* и *C. sinensis* характеризуются наличием особо плотно заселенных зон, поэтому количество зараженных людей значительно превосходит число больных описторхозом, вызванным *O. felineus*. Следует отметить, что человек (и животные-компаньоны) не является фактором распространения *O. felineus*, в то время как для *O. viverrini* и *C. sinensis* антропогенное распространение является основным (Petney *et al.*, 2013).

M. orientalis распространен в Китае и Корее, инфицирует диких и домашних птиц, а также млекопитающих, включая человека (Gao *et al.*, 2018).

1.1.4 Патогенез описторхоза и клонорхоза

Присутствие и жизнедеятельность паразитов в протоках печени (и поджелудочной железы) вызывает значительные патологические изменения пораженного органа и организма в целом.

Острый описторхоз/клонорхоз может наблюдаться после заражения и длится до 3 месяцев. Как правило, основными симптомами являются повышенная

температура, интоксикация, гепатобилиарный синдром (Матвеева, Офицеров, 2018).

Хронический описторхоз проявляет себя менее очевидно, а симптомы неспецифичны. Обычно описторхоз/клонорхоз вызывает 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).

Возникновение патологий инфицированного органа связано с механическими повреждениями стенок протоков и с воздействием компонентов экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) паразита (Sripa, 2003). Компоненты ЭСП могут либо оказывать прямое действие на окружающие ткани, либо способствовать развитию воспаления. Многие белки, найденные в ЭСП трематод, обладают митогенным или иммуномодулирующим действием. Так, гранулины, секретируемые *O. viverrini*, оказывают митогенное действие на клетки млекопитающих (Smout *et al.*, 2009). Митогенный эффект оказывает и 28кДа глутатион-S-трансфераза *O. viverrini* (Daogueang *et al.*, 2012). Протеазы ЭСП могут вызывать гидролиз белков хозяина, способствуя развитию воспаления (Berasaín *et al.*, 2015).

Еще один важный фактор – это значительное количество яиц, которые производят паразиты. При проникновении яйца в перидуктальные ткани или паренхиму печени возникает гранулема (Kaewpitoon *et al.*, 2008).

Трематодозы, вызванные *O. viverrini* и *C. sinensis*, относят к биологическим канцерогенам 1-ой группы при хронической инфекции (IARC, 2012). Кроме того, есть данные о канцерогенном потенциале *O. felineus* в модели описторхоза на сирийских хомячках (Maksimova *et al.*, 2017), и обнаружена некоторая корреляция между описторхозом и развитием холангиокарциномы в эндемичных районах Российской Федерации (Fedorova *et al.*, 2017).

1.2 Физиология печеночных сосальщиков «описторхозной триады»

1.2.1 Взаимодействие между паразитом и хозяином

Взрослые описторхи и клонорхи обитают преимущественно во внутривнутрипеченочных желчных протоках. Паразиты удерживаются в просвете протока и перемещаются по нему, удерживаясь на стенке с помощью ротовой и брюшной присосок, которые травмируют эпителий. Считается, что взрослые особи *O. felineus* и *C. sinensis* наряду с другими доступными источниками питательных веществ используют кровь, для получения которой паразит должен добраться до соединительнотканной оболочки протока (Lvova *et al.*, 2016). В содержимом кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* были обнаружены кристаллы гемозоина, представляющего собой продукт полимеризации гема – железосодержащей простетической группы гемоглобина (Lvova *et al.*, 2016). Гем токсичен, и у паразитов, питающихся кровью, эта проблема решается преимущественно путем полимеризации гема с образованием нерастворимого гемозоина (Oliveira *et al.*, 2000; Pisciotta *et al.*, 2005). Сосальщики имеют замкнутую пищеварительную систему, т.е. непереваренные остатки пищи вместе с кристаллами гемозоина удаляются из кишечника через ротовое отверстие, и, вероятно, могут попадать не только в просвет желчного протока, но и в соединительно-тканную оболочку и кровоток.

1.2.2 Строение и функции тегумента трематод

Важную роль во взаимодействии между паразитом и хозяином играет специфическая по структуре покровная ткань паразитов – тегумент.

Тегумент представляет собой погруженный эпителий, т.е. апикальные части клеток образуют над базальной мембраной синцитий, а базальные части клеток (цитоны) расположены под базальной мембраной и мышечным слоем и сохраняют индивидуальность (Рисунок 3). С внешней стороны поверхность тегумента несёт микроворсинки с большим количеством митохондрий внутри и в

их основании. Это указывает на высокую физиологическую активность тегумента, заключающуюся во всасывании питательных веществ, а также в противодействии проникновению токсичных веществ извне (Apinhasmit *et al.*, 1994). Наружная поверхность тегумента несет гликокаликс, у ювенильных паразитов он толще, чем у взрослых. Внутренняя мембрана тегумента, обращенная к мышечным слоям, также имеет инвагинации, увеличивающие ее поверхность, и, по-видимому, вовлечена в регуляцию водно-солевого баланса, подобно клеткам почек позвоночных (Faghiri *et al.*, 2010). Синцитиальный слой тегумента отделен от мышечного слоя базальной мембраной (Sobhon, Apinhasmit, 1995; Gobert *et al.*, 2003).

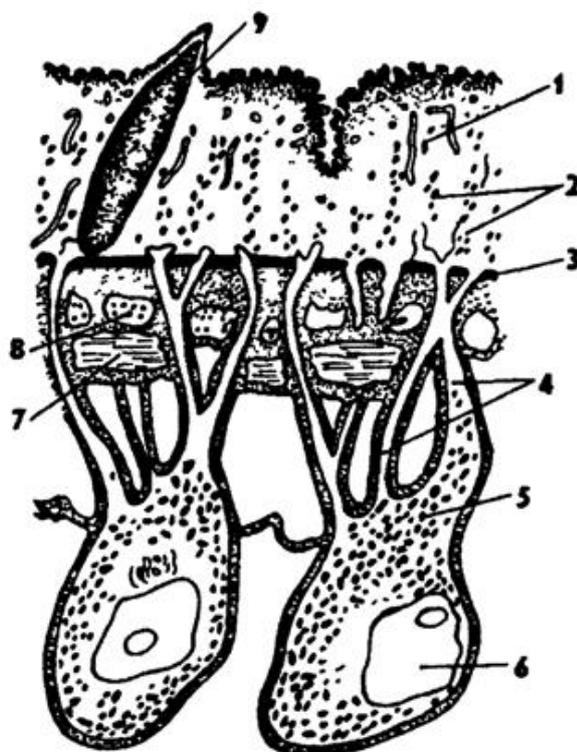


Рисунок 3. Схема строения покровов трематод: 1 - тегумент, 2 - митохондрии, 3 - базальная мембрана, 4 - цитоплазматические тяжи, 5 - цитон, 6 - ядро, 7 - продольные мышцы, 8 - кольцевые мышцы, 9 - кутикулярный шипик (Threadgold, 1963).

Цитоны тегумента синтезируют различные вещества, присутствующие в нем в виде секреторных гранул. У взрослых червей *O. viverrini* цитоплазма тегумента наполнена гранулами четырех типов: сферические или дисковидные, плотные или светлые. Плотные гранулы обоих типов покрыты билипидной

мембраной; они сливаются с внешней мембраной, и их содержимое покрывает внешнюю поверхность тегумента. Считается, что за счет этих гранул происходит обновление наружной мембраны тегумента, а именно, ее липидных и белковых компонентов (Apinhasmit *et al.*, 1994). Содержимое плотных гранул окрашивается вместе с гликокаликсом, что подтверждает эту гипотезу (Apinhasmit *et al.*, 2000). Содержимое светлых гранул – филаментозное – также ограничено билипидной мембраной. Вероятно, что они переносят компоненты цитоскелета, поскольку их мембраны разрушаются в цитоплазме, а содержимое изливается в цитоплазму (Apinhasmit *et al.*, 1994). Развитый цитоскелет из микротрубочек обеспечивает транспорт гранул к поверхности тегумента, обуславливая его секреторную активность и непрерывное обновление (Sobhon, Apinhasmit, 1995). Значительное количество белков идентифицируется и в тегументе, и в ЭСП.

Одной из основных функций тегумента является защита паразитов от воздействия хозяина: непрерывное обновление поверхности тегумента позволяет паразитам уходить от воздействия иммунной системы хозяина, сбрасывая образовавшиеся на поверхности тела иммунные комплексы и заменяя их новыми функциональными белками. Этот механизм особенно важен для кровяных сосальщиков, обитающих в крови и постоянно атакуемых иммунной системой хозяина (Abath, Werkhauser, 1996).

Другая сторона защитных механизмов паразита – секреция биологически активных белков и метаболитов. Компоненты ЭСП оказывают иммуномодулирующее действие, стимулируют пролиферацию клеток или нарушают целостность мембран клеток.

Не менее важная функция тегумента – это питание. В состав желчи, помимо желчных кислот/солей, входят холестерол, фосфолипиды, глюкоза, аминокислоты, которые могут быть использованы печеночным сосальщиком как источник энергии (Dalton *et al.*, 2004).

Желчные мицеллы являются источником холестерола и жирных кислот, которые трематоды не способны синтезировать самостоятельно (Wang *et al.*, 2011,

Young *et al.*, 2014). Анализ генома *O. viverrini* позволил предсказать механизмы специфического транспорта холестерина и фосфолипидов из просвета желчного протока в клетки паразита (Young *et al.*, 2014). Компоненты желчи, так или иначе проникающие внутрь через поверхность тегумента, могут быть использованы и как источник энергии. В геноме *O. viverrini* были найдены гены, кодирующие ферменты, необходимые для бета-окисления жирных кислот и окисления аминокислот с разветвленными боковыми цепями (Young *et al.*, 2014). Гены, относящиеся к этим метаболическим путям, были обнаружены также у *C. sinensis* (Wang *et al.*, 2011) и у *O. felineus* (Pomaznoy *et al.*, 2016). Показательно и то, что у кровяных сосальщиков эти пути редуцированы, что подтверждает приспособительное значение этих путей для обитания описторхид в окружении желчи, богатой холестерином, его производными и фосфолипидами (Pomaznoy *et al.*, 2016).

1.2.3 Экскреторно-секреторный продукт

Многие компоненты экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) являются результатом непрерывного обновления поверхности тегумента, а не целенаправленно секретлируемыми продуктами. Часть секретлируемых продуктов представляет собой содержимое кишечника, и эти продукты могут воздействовать на организм хозяина так же, как и выделяемые тегументом.

В ЭСП *O. felineus* были обнаружены белки цитоскелета, антиоксидантные белки, некоторые ферменты метаболизма (преимущественно ассоциированные с метаболизмом сахаров), а также протеолитические ферменты (Львова и др., 2014).

Прирост питательных веществ, которые можно всасывать через тегумент, вероятно, может осуществляться с помощью разрушения клеток хозяина протеолитическими и липолитическими ферментами. Известно, что *C. sinensis* секретрует фосфолипазу A2 (PLA2), которая вызывает разрушение мицелл и, возможно, клеточных мембран (Hu *et al.*, 2009). В геноме *O. viverrini* были идентифицированы гены, кодирующие фосфолипазы и другие ферменты, необходимые для деградации мицелл (Young *et al.*, 2014).

Некоторые компоненты ЭСП секретируются в виде экзосом – специфических внеклеточных везикул, содержащих различные компоненты для межклеточной коммуникации. Экзосомы, выделяемые паразитами *O. viverrini*, захватываются человеческими холангиоцитами, вызывают их пролиферацию и активируют сигнальные пути, связанные с репарацией и канцерогенезом (Chaiyadet *et al.*, 2015).

У кровяного сосальщика *S. mansoni* был исследован белковый состав экзосом (Sotillo *et al.*, 2016), и было обнаружено, что в наибольшем количестве в них представлен сапозин-подобный белок Smp_194910 (XP_018652438.1, CCD79834.1), который авторы ассоциируют с гематофагией. Однако, гомологичный белок отсутствовал в экзосомах *O. viverrini*, *Fasciola hepatica*, *Echinostoma caproni* и *Dicrocoelium dendriticum*.

Протеомный анализ ЭСП *F. hepatica* (Jefferies *et al.*, 2001) с помощью хроматографии и масс-спектрометрии не выявил сапозин-подобные белки, однако их присутствие в ЭСП было доказано с помощью иммунологических методов (Reed *et al.*, 2000; Espino, Hillyer, 2003), а позднее подтверждено в протеомном исследовании (Di Maggio *et al.*, 2016). Аналогично, ни один сапозин-подобный белок не был обнаружен при протеомном анализе ЭСП *C. sinensis* (Zheng *et al.*, 2011; 2013), однако антитела к сапозин-подобному белку клонорпорин 1 присутствуют в сыворотках крови людей, больных клонорхозом (Lee *et al.*, 2002). Протеомный анализ ЭСП *O. felineus* не выявил сапозин-подобных белков в его составе (Львова и др., 2014).

Как и многие другие белки ЭСП, сапозин-подобные белки иммуногенны и являются факторами взаимодействия «паразит-хозяин». В ряде работ сапозин-подобные белки были протестированы как антигены для иммунодиагностики и вакцинопрофилактики (Espino *et al.*, 2005; 2010; Figueroa-Santiago *et al.*, 2011; Gottstein *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

1.3 Сапозин-подобные белки

1.3.1 Структура сапозин-подобных белков

Сапозин В – это белок и одноименный белковый домен, которые обладают способностью связывать липиды, но не имеют ферментативной активности. Название «saposin» является акронимом Sphingolipid Activator PrO[S]teINs, и первые представители семейства сапозин-подобных белков были найдены в лизосомах: сапозины В и С экстрагировали гликофинголипиды из мембран, делая их доступными для ферментативного гидролиза в растворе (Vaccaro *et al.*, 1999).

Белковый домен сапозин В состоит примерно из 80 а.о., формирующих 4-5 амфипатических α -спиралей, содержит 6 остатков цистеина, образующих 3 дисульфидных мостика (Рисунок 4). Домен сапозин В очень распространен у эукариот: содержащие его белки обнаружены и у животных, и у растений, и у грибов, а также у некоторых простейших, эволюционно далеких друг от друга (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).



Рисунок 4. Первичная и вторичная структура домена сапозин В в белках: сапозин В человека (вверху); НК-лизин свиньи (снизу). Цветные цилиндры соответствуют альфа-спиральным участкам отмечены, черными линиями показаны дисульфидные связи, красным цветом выделены остатки цистеина (C) (адаптировано из Ahn *et al.*, 2003).

Домен сапозин В может быть представлен в белках индивидуально или в комбинациях с другим доменом сапозин В или ферментативным доменом. Кроме

того, зрелые белки могут появляться в результате протеолитического расщепления предшественника – просапозина (Munford *et al.*, 1995).

Бывает, что вновь синтезированный белок состоит только из домена сапозин В и N-концевого сигнального пептида, который отщепляется при процессинге. К таким белкам с автономным доменом сапозин В или **сапозин В-подобным белкам (SAP)** относятся пороформирующие белки амёб – амebaпоры А, В и С (Leippe *et al.*, 1994), эффекторные белки лейкоцитов млекопитающих – НК-лизин и гранулизин, и др. В некоторых белках с одним доменом сапозин В есть протяженный N- или С-конец, не содержащие известных функциональных доменов (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/>).

Просапозин – это предшественник зрелых белков, а именно, сапозинов типа А, В, С и D, содержащих по одному домену сапозин В. В предшественнике белки расположены друг за другом, разделены спейсерами различного размера, по концам полипептида расположено по одному домену сапозин А, на N-конце находится также сигнальный пептид. Сходство названий приводит к путанице, например, белок сапозин А не содержит одноименный домен, а домены сапозин А отщепляются при гидролизе и не входят в состав зрелых белков (Leonova *et al.*, 1996). Известно, что просапозин вызывает эффекты нейротрофного фактора, способствуя росту аксонов в культуре мышечной нейробластомы (NS20Y) и увеличивая активность холин-ацетилтрансферазы в клетках нейробластомы человека (SK-N-MC). Аналогичными эффектами обладает и сапозин С – один из продуктов протеолитического процессинга просапозина. В обоих случаях это связывают с взаимодействием сапозина со специфическим рецептором (O'Brien *et al.*, 1994). Однако детали этого взаимодействия не раскрыты, и существуют другие объяснения наблюдаемых физиологических эффектов.

Многие зрелые белки с одним доменом сапозин В функционируют в виде димеров, как собственно сапозин В (Ahn *et al.*, 2003), амebaпор А (Gutsmann *et al.*, 2003) и др.

Другой вариант доменной организации зрелых SAPLIP – это белки с двумя и более не идентичными доменами сапозин В. Пороформирующие белки *Naegleria fowleri* неглериапоры А и В, содержащие 3 и 4 домена сапозин В, соответственно, ассоциируют с патогенностью этого возбудителя амёбного менингоэнцефалита (Zysset-Burri *et al.*, 2014). Аналогично, упомянутые выше амёбапоры, имеющие только один домен сапозин В, связывают с вирулентностью дизентерийной амёбы (Bracha *et al.*, 2002).

1.3.2 Функции и механизм действия SAPLIP

При отсутствии домена, катализирующего гидролиз, SAPLIP выполняют одну из следующих функций:

- 1) Извлечение из мембран отдельных молекул липидов, не приводящее к нарушению целостности мембраны;
- 2) Нарушение целостности мембран;
- 3) Слияние мембран;
- 4) Связывание липофильных молекул;
- 5) Взаимодействие со специфическим рецептором.

Однако сведения о связи доменной организации с функциями отсутствуют.

Известно, что выполнение первой функции связано преимущественно с лизосомным гидролизом, и в него вовлечены белки сапозин А, В, С и D, специфически связывающие разные молекулы липидов (Fürst, Sandhoff, 1992; Garrido-Arandia *et al.*, 2018). Дефицит сапозина С, вызванный мутацией в гене просапозина человека, в редких случаях является причиной болезни Гоше (Motta *et al.*, 2014). При недостатке сапозина С происходит нарушение гидролиза глюкозилцерамида и его накопление, как и в более распространенном варианте болезни Гоше, вызванном дефицитом глюкозилцерамидазы. Селективное связывание липидов, характерное для сапозинов, являющихся продуктами процессинга просапозина, было описано также для инвапорина – сапозин В-подобного белка *Entamoeba invadens* (Michalek, Leippe, 2015).

Нарушение целостности мембран под действием SAPLIP может происходить разными способами. Пороформирующий белок дизентерийной амебы *Entamoeba histolytica* амёбапор А в активном состоянии, возникающем при низких значениях рН, представлен димером (Necht *et al.*, 2004). При формировании мембранной поры три димера образуют гексамерное кольцо, в котором их гидрофобные поверхности обращены в мембрану, а гидрофильные – в просвет поры (Gutsmann *et al.*, 2003).

Иначе происходит нарушение целостности мембраны под действием гранулизина – эффекторного белка лимфоцитов человека, который первоначально контактирует с мембраной посредством электростатического взаимодействия, после чего свободная часть переворачивается внутрь, и белок разрушает мембрану, как ножницы (Anderson *et al.*, 2003).

Сапозин-подобный белок нематоды *Ancylostoma caninum* Ac-SLP-1 в растворе образует димеры, что позволяет скрыть гидрофобную часть. Взаимодействие с мембраной начинается с бокового радикала триптофана, находящегося между второй и третьей спиралью каждого из двух мономеров. После внедрения триптофана в мембрану возникает электростатический контакт между ней и Ac-SLP-1, что приводит к разворачиванию димера и появлению полости, обеспечивающей транспорт молекул из мембраны в жидкую среду (Willis *et al.*, 2011).

Большой ассортимент SAPLIP обнаружен у свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*. Нокдаун одного из генов – *caenopore-5* – с помощью РНК-интерференции показал, что функцией белка *caenopore-5*, содержащего один домен сапозин В, является разрушение бактериальных клеток (Roeder *et al.*, 2010).

Участие в слиянии мембран основывается на способности причастных сапозин-подобных белков к образованию димеров. Благодаря димеризации реализуется фьюзогенная способность сапозина С (Wang *et al.*, 2003). У *E. histolytica* помимо амёбапоров А, В и С было обнаружено еще 16 SAPLIP с единственным доменом сапозин В, и было показано, что SAPLIP3, подобно

сапозину С, проявляет фьюзогенную активность при низких значениях рН (Winkelman *et al.*, 2006).

Еще одно свойство SAPLIP – способность связывать липофильные молекулы. Известно, что сапозин В человека может связывать и переносить жирорастворимый коэнзим Q10 (убихинон) (Jin *et al.*, 2008). Определенное структурное сходство препарата против малярии хлорохина с коэнзимом Q10 (Рисунок 5) позволило предположить, а затем подтвердить, что сапозин В связывает и его (Huta *et al.*, 2016). Следуя этой логике, мы предположили, что некоторые сапозин В-подобные белки могут связывать и празиквантел – основной препарат для лечения трематодозов (Рисунок 5) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

Взаимодействие со специфическим рецептором описано для просапозина и сапозина С. Оба белка являются нейротрофными факторами, и в результате этого взаимодействия происходит фосфорилирование ряда белков для внутриклеточной передачи сигнала (O'Brien *et al.*, 1994).

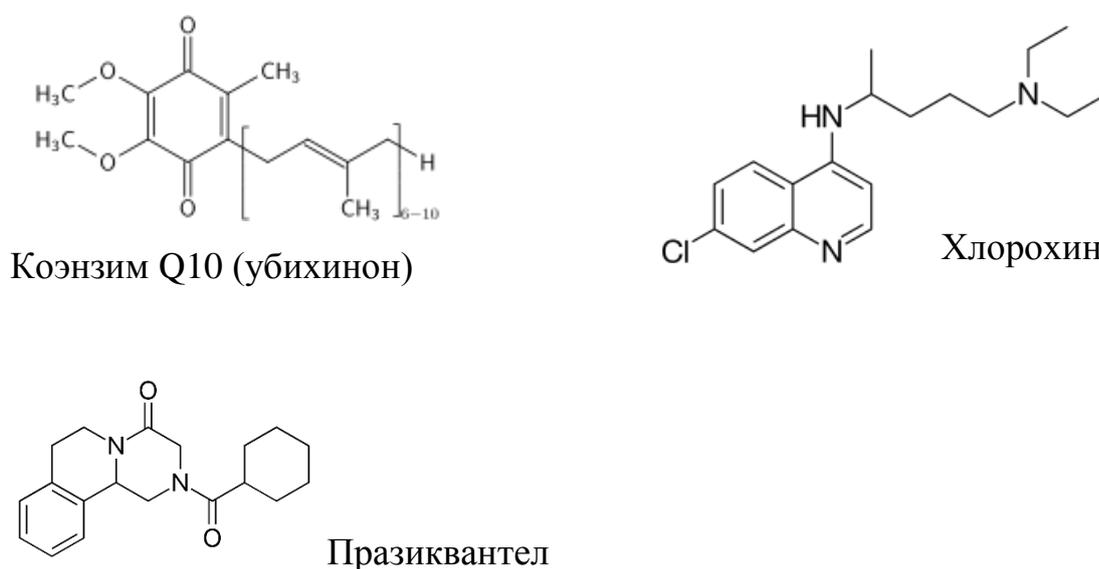


Рисунок 5. Химическая структура коэнзима Q10, хлорохина и празиквантела.

1.3.3 SAP трематод

У больших печеночных сосальщиков *F. gigantica* (отряд Plagiorchiida, семейство Fasciolidae) описано три сапозин В-подобных белка: SAP1, SAP2 и SAP3. Они были обнаружены в кишечном эпителии паразитов и в ЭСП. Известно, что SAP1 *F. gigantica* является основным SAP у ювенильных паразитов, в то время как SAP2 преобладает у взрослых червей (Grams *et al.*, 2006). Три транскрипта, кодирующих SAP, найдено у *F. hepatica*: FhSAP-1, FhSAP-2 и FhSAP-3. Все три белка, которые они кодируют, присутствуют у взрослых паразитов, однако, FhSAP-1 является преобладающим паралогами у ювенильных паразитов, аналогично SAP1 *F. gigantica* (Reed *et al.*, 2000; Di Maggio *et al.*, 2016). Кроме того, показано, что FhSAP-2 обнаруживается преимущественно в гастродермисе взрослых паразитов (Cabán-Hernández, Espino, 2013) и оказывает гемолитическое действие (Espino, Hillyer, 2003). Перечисленные сапозин В-подобные белки фасциол несут N-концевой сигнальный пептид.

У печеночного сосальщика *C. sinensis* (отряд Opisthorchiida, семейство Opisthorchiidae) идентифицирован сапозин В-подобный белок клонорпорин 1, уже упоминавшийся в разделе 1.2.4. Было показано, что он находится в кишечном эпителии и содержимом кишечника взрослых паразитов. Рекомбинантный клонорпорин 1 способен вызывать гемолиз (Lee *et al.*, 2002). В работе, посвященной определению состава ЭСП *C. sinensis*, этот белок не был обнаружен (Zheng *et al.*, 2011; 2013), однако, указанием на его присутствие в ЭСП является то, что он был найден путем селекции экспрессионной библиотеки кДНК *C. sinensis* с использованием сывороток крови людей, больных клонорхозом (Lee *et al.*, 2002).

Большее разнообразие сапозин-подобных белков, по-видимому, наблюдается у кровяных сосальщиков *Schistosoma* (отряд Strigeidida, семейство Schistosomatidae). Десять и более паралогами SAP обнаружено у *S. japonicum* и *S. mansoni*. Кроме того, *S. japonicum* имеет два белка, содержащих по два домена

сапозин В, и один с четырьмя доменами, т.е. просапозин. Все они начинаются сигнальным пептидом (Liu *et al.*, 2016).

Сапозин-подобные белки трематод обладают антигенными свойствами, поэтому существует ряд работ, в которых они изучены в качестве антигенов для серодиагностики и/или вакцинопрофилактики. Можно предположить, что для серодиагностики подходят как белки ЭСП, так и поверхностные белки тегумента, в то время как для разработки вакцин – только последние.

Иммунизация кроликов белком FhSAP2 обеспечила 81-процентный протективный эффект (Espino *et al.*, 2005), иммунизация мышей уменьшила зараженность только на 60% или 83%, в зависимости от способа доставки антигена: в виде рекомбинантного белка или ДНК-вакцины (Espino *et al.*, 2010).

Ортолог белка Smp_194910, который был обнаружен в экзосомах *S. mansoni* (Sotillo *et al.*, 2016), у *S. japonicum* является наиболее представленным белком этого подсемейства, и кроме того, обладает выраженными антигенными свойствами, поскольку детектируется сыворотками инфицированных кроликов, мышей и людей (Liu *et al.*, 2016). Этот белок был локализован в кишечнике взрослых паразитов *S. japonicum*. Однако он оказался не лучшим кандидатом для серодиагностики шистосомоза, поскольку два других белка, один из которых содержал два домена сапозин В, а другой – протяженный N-конец и один домен сапозин В, показали большую чувствительность.

1.4 Празиквантел

Основным препаратом, применяемым для лечения трематодозов, вызванных паразитами семейств Opisthorchiidae и Schistosomatidae, является празиквантел (Chai *et al.*, 2013).

1.4.1 Механизм действия

Большинство исследований действия празиквантела на паразитов сделано на червях рода *Schistosoma*. Механизм действия празиквантела исследован не исчерпывающе, но известно, что он инициирует приток кальция в клетки, что

приводит к генерализованному мышечному сокращению и параличу. Кроме того, празиквантел вызывает нарушение целостности тегумента, что делает паразитов уязвимыми для иммунной системы хозяина (Cupit, Cunningham, 2015). Внешне повреждение тегумента проявляется как вакуолизация и отделение от него фрагментов и называется блеббинг (англ. «blebbing») (Apinhasmit, Sobhon, 1996). Кроме того, паралич, вызванный празиквантелом, приводит к ослаблению связи паразитов со стенками протоков, что для видов, являющихся гематофагами (*O. felineus* и *C. sinensis*), означает затруднение доступа к крови (Lvova *et al.*, 2016).

Лишенные тегумента паразиты продолжают отвечать на препарат мышечным сокращением, при условии, что среда для культивирования содержит ионы кальция. При наличии тегумента присутствие ионов кальция в среде не является необходимым для ответа на препарат, но в среде с низким содержанием кальция и повышенным содержанием магния мышечное сокращение переходит из непрерывного в периодическое (Blair *et al.*, 1992). Это значит, что кальций, ответственный за развитие сокращения, при отсутствии тегумента входит в мышечные клетки из среды, а при наличии тегумента достаточно того количества, которое находится под тегументом. Кальций является внутриклеточным эффектором или коэффектором, участвующим во многих процессах и сигнальных путях, поэтому очевидно, что помимо мышечного сокращения, повышение концентрации ионов кальция вызывает и другие немедленные и отсроченные эффекты.

Нарушение целостности тегумента, вызванное празиквантелом, может быть следствием нарушений в системе его обновления. Такой эффект возник бы при снижении транспорта везикул (плотных гранул) с белками тегумента к поверхности при нарушениях в структуре или количестве микротрубочек, моторных белков или нарушении слияния мембран. Однако, как именно связано повреждение тегумента с применением празиквантела, не известно.

Вероятно, действие празиквантела не ограничивается единственной молекулярной мишенью, вызывая различные опосредованные эффекты. В разных

исследованиях, нацеленных на поиск молекулярных мишеней празиквантела у *S. mansoni*, были предложены в качестве белков-мишеней потенциал-зависимые кальциевые каналы (Thomas, Timson, 2020) и мембранный канал TRPM (transient receptor potential channel type M) (Park *et al.*, 2019). Кроме того, есть данные, что празиквантел влияет на текучесть клеточных мембран у *S. mansoni* (Lima *et al.*, 1994). Изменение текучести клеточных мембран значительно влияет на функции различных мембранных белков, в том числе ионных каналов (Conrard, Tyteca, 2019), что может объяснить сложности с обнаружением белков, являющихся специфической лекарственной мишенью празиквантела.

1.4.2 Снижение чувствительности/устойчивость паразитов к противопаразитарным препаратам

Известно много случаев устойчивости патогенов и опухолей к лекарствам. Описаны случаи лекарственной устойчивости и у паразитов, в том числе многоклеточных. Снижение чувствительности может быть обусловлено увеличением эффективности системы биотрансформации препарата и его экскреции, а также изменением структуры его мишени. Еще одна возможная причина снижения чувствительности — эффективная нейтрализация вторичных эффектов препарата.

Например, для лечения лейшманиоза применяют препараты с мышьяком. В паразите оксоанион мышьяка (арсенит) связывается с трипанотионом (необычной формой глутатиона, характерной для лейшманий и трипаносом) и выводится наружу с помощью ABC-транспортера (ATP-binding cassette transporter). Повышение экспрессии генов GSH1 (глутаминцистеин синтетазы) и ODC (орнитиндекарбоксилазы), вызывающее увеличение синтеза трипанотиона, способствует увеличению устойчивости лейшманий к арсенитам (Grondin *et al.*, 1997). Таким образом, устойчивость лейшманий к арсенитам возникает за счет увеличения эффективности биотрансформации и экскреции полученного продукта.

Примером появления лекарственной устойчивости, возникшей путем мутации в гене белка-мишени, является устойчивость разных видов нематод к бензимидазолам, взаимодействующим с β -тубулином паразитов (Hoti *et al.*, 2003).

Описано «смягчение» действия хлорохина при лечении малярии, вызванное его связыванием с сапозинем В хозяина. Авторы работы считают, что другим возможным последствием этого связывания может быть системное уменьшение количества сапозина В, проявляющееся в нарушении метаболизма липидов (Huta *et al.*, 2016). Идея, что сапозин В может связывать хлорохин, возникла из исследования, показавшего, что он может связывать коэнзим Q10, имеющий похожую структуру (Рисунок 5) (Jin *et al.*, 2008).

1.4.3 Чувствительность и устойчивость трематод к празиквантелу

Систематических данных об устойчивости к празиквантелу у паразитов, против которых его используют, нет, однако массовое применение препарата может привести к снижению эффективности лечения (Soukhathammavong *et al.*, 2011), и отдельные случаи снижения чувствительности к празиквантелу описаны. Так, в Кении был обнаружен изолят *S. mansoni* с заметно сниженной чувствительностью к празиквантелу (Melman *et al.*, 2009). Линии *S. mansoni* со сниженной чувствительностью к празиквантелу были получены в лаборатории (Couto *et al.*, 2011). Считается, что этот эффект связан с увеличением экспрессии SMDR2, ортолога Р-гликопротеина 1 (Messerli *et al.*, 2009) – АТФ-зависимого мембранного насоса, выкачивающего из клетки различные субстраты, такие как липиды, стероиды, пептиды, билирубин и др. Показано, что у *S. mansoni* празиквантел является одним из субстратов SMDR2 (Kasinathan, Greenberg, 2012).

Хотя проблема устойчивости паразитов к празиквантелу еще не перешла в разряд актуальных, вполне целесообразен поиск препаратов для комбинированной терапии, которые позволят увеличить эффективность лечения или существенно снизить дозу празиквантела, имеющего некоторые побочные эффекты в отношении хозяина (Erko *et al.*, 2012).

Один из подходов к изучению природы лекарственной устойчивости – это сравнение профилей экспрессии генов до и после воздействия препарата на патоген (Soukhathammavong *et al.*, 2011). При отсутствии данных массового параллельного секвенирования транскриптов генов, дающих возможность сравнить полные профили экспрессии, гипотезы об участии тех или иных белков в ответе патогена на препарат могут быть проверены с помощью анализа изменения экспрессии соответствующих генов в ответ на препарат.

1.4.4 Гипотезы о влиянии празиквантела на экспрессию генов SAP описторхид

Основываясь на доступных данных о функциях домена сапозин В и известных эффектах PZQ, мы сформулировали следующие гипотезы о влиянии празикантела на экспрессию генов SAP описторхид:

1. В разделе 2.2.3 сказано, что поверхность тегумента непрерывно обновляется за счет транспорта гранул к поверхности (Apinhasmit *et al.*, 1994). В синцитиальном слое тегумента гранулы либо изливаются в цитоплазму, принося мономерные белки цитоскелета, либо сливаются с внешней мембраной. При этом происходит обновление компонентов самой мембраны и гликокаликса. Нарушение любого из перечисленных процессов, вероятно, проявится как нарушение целостности тегумента. Поскольку нарушение целостности тегумента является одним из эффектов празиквантела, можно предположить, что оно происходит в связи с нарушением транспорта гранул или их слияния с поверхностной мембраной. Участие в слиянии мембран является одной из описанных функций сапозин-подобных белков (раздел 1.3.2) (Wang *et al.*, 2003), и снижение экспрессии генов SAP *O. felineus* под действием празиквантела могло бы приводить к наблюдаемому празиквантел-индуцируемому повреждению тегумента. Увеличение экспрессии, в таком случае, может быть связано с активацией процессов репарации тегумента, в частности, с увеличением потока плотных гранул к его поверхности.

2. Сапозин В связывает липофильные молекулы, имеющие некоторое структурное сходство с празиквантелом (Jin *et al.*, 2008; Huta *et al.*, 2016), поэтому сапозин-подобные белки описторхид, возможно, связывают празиквантел, снижая чувствительность паразитов к нему (раздел 1.3.2). Повышение экспрессии генов SAP в ответ на празиквантел может свидетельствовать об их участии в противодействии празиквантелу и снижении чувствительности к нему.
3. Некоторые сапозин В-подобные белки обладают мембранолитическими свойствами, что указывает на возможное участие их в процессе питания паразитов (Lee *et al.*, 2002; Espino, Hillyer, 2003). В этом случае изменения экспрессии генов SAP, связанные с лечением хозяина празиквантелом, могут являться ответом на голод, вызванный прерыванием питания кровью или клетками эпителия желчных протоков.

1.5 Заключение

Накопленные знания о разнообразии и функциях белков семейства SAPLIP и о значении белков с единственным доменом сапозин В (SAP) предполагают их важность для паразитизма и для физиологии описторхид. Однако до недавнего времени был описан только один SAP паразитов-представителей семейства Opisthorchiidae – клонорпорин 1. Хотя гены SAP представителей рода *Fasciola* изучены значительно лучше, их функции до конца не выяснены. Многие результаты указывают на то, что некоторые SAP паразитов вовлечены во взаимоотношения «паразит-хозяин», но их функции на молекулярном и клеточном уровнях не известны.

Принимая во внимание перечень известных функций SAP других организмов и свойства белкового домена сапозин В, можно заключить, что изучение SAP у паразитов (на разных стадиях, в разных условиях) является несомненно актуальными и перспективным исследовательским направлением. Современные доступные данные секвенирования геномов и транскриптомов многих видов трематод позволяют систематизировать сведения о подсемействе генов SAP.

Исследование эволюции и диверсификации функций подсемейства белков SAP и поиска структурно-функциональной ортологии необходимо начать со сравнительно-эволюционного анализа особенностей строения и экспрессии генов SAP.

2 Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Готовые растворы и смеси:

- TriReagent (Sigma);
- RNAlater (Ambion);
- Буфер для ПЦР 10-кратный (Биосан): 100 мМ Трис-НСl, рН 8.5 (при 25 °С), 500 мМ КСl, 0.5% (v/v) Tween 20, стабилизаторы Таq ДНК-полимеразы;
- 100 мМ растворы dАТР, dGТР, dСТР, dUТР в ТЕ-буфере (0,01 М Трис-НСl 0,001 М ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная кислота) (рН 7,8) (Биосан);
- Таq ДНК-полимераза, рекомбинантная форма 1ед./мкл (Биосан);
- Физраствор – натрия хлорид, 0,9% (Мосфарм);
- Культуральная среда RPMI 1640 (Life Technologies).

2.1.2 Растворы:

- *PBS - Phosphate-Buffered Saline / Натрий-фосфатный буфер*
1 таблетка PBS (Sigma-Aldrich)
Н₂О (деионизированная) - до 200 мл
- *ТАЕ x50 – Трис-ацетатный буфер 50-кратный*
Трис-основание (Helicon) - 24,22 г
ЭДТА динатриевая соль (AppliChem) - 1,862 г
Уксусная кислота ледяная (Panreac) - 8,96 мл
Н₂О (деионизированная) - до 100 мл
- *ТАЕ-lowEDTA x50 – Трис-ацетатный буфер с низким содержанием ЭДТА 50-кратный*
Трис-основание (Helicon) - 24,22 г
ЭДТА динатриевая соль (AppliChem) - 0,2 г
Уксусная кислота ледяная (Panreac) - 8,96 мл
Н₂О (деионизированная) - до 100 мл
- *Вода, очищенная от РНКаз*

H₂O (деионизированная) - 100 мл

DEPC (диэтилпиروкарбонат) (Sigma-Aldrich) - 0,1 мл

Инкубировали 12 ч. при 37° С, затем автоклавировали 15 мин.

- *Празиквантел, 10 мг/мл*

Празиквантел (Bayer) - 10 мг

ДМСО (диметилсульфоксид) - 1 мл

2.1.3 Наборы

- Набор для проведения реакции обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific);
- Набор для проведения секвенирующей реакции BigDye 3.1 Terminator (Applied Biosystems);
- Набор для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I «ПЦР-комплект» (Синтол).

2.1.4 Реактивы

- Хлороформ, изопропиловый спирт, этиловый спирт, агароза LE (Helicon), агароза SeaKem GTG (Lonza)

2.2 Оборудование

- Амплификатор Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf);
- Амплификатор с детектором флуоресценции CFX96 (BioRad);
- Центрифуга с охлаждением Eppendorf 5418 R (Eppendorf);
- Источник тока Эльф-4 (ДНК-Технология);
- Камера горизонтальная для электрофореза Wide Mini-Sub Cell GT (BioRad);
- Система гель-документирования Gel Doc XR System (BioRad);
- Спектрофотометр NanoDrop 2000 (Thermo Scientific);
- CO₂-инкубатор
- Микроскоп Axiovert 40CFL
- Микроскоп AxioImager Z1 (Zeiss) с приставкой ApoTome (Zeiss)

- Камера для эвтаназии углекислым газом.

2.3 Методы

2.3.1 Работа с лабораторными животными и получение паразитов

В работе были использованы сирийские (золотистые) хомячки *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).

6-8 недельным хомячкам перорально вводили по 100 метацеркарий *O. felineus*, полученных из карповых рыб из реки Обь в Новосибирской области. Хомячков подвергали эвтаназии методом ингаляции углекислым газом не ранее, чем через 3 месяца после заражения для извлечения из их печени взрослых особей *O. felineus*.

При изучении влияния празиквантела на взрослых червей *O. felineus in vivo*, через 140 дней после инфицирования хомячкам перорально вводили празиквантел, растворенный в PBS, трехкратно с интервалом 6 часов по 25 мг/кг веса животного (на один прием). Через 24 часа после первого введения (12 часов после третьего введения) празиквантела животных умерщвляли и извлекали из их печени червей. Хомячки группы отрицательного контроля получали PBS без празиквантела.

2.3.2 Оценка чувствительности взрослых особей *O. felineus* к празиквантелу *in vitro*

Взрослые особи *O. felineus* были извлечены из печени хомячков через три месяца после инфицирования и трижды отмыты стерильным физраствором. Далее 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 CO₂. Через 24 часа среду с PZQ заменяли на среду без добавления 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, с помощью микроскопа Axiovert 40CFL. Черви после 24 часов инкубации в среде, содержащей PZQ в концентрации 10 мкг/мл и не содержащей PZQ, были использованы для выделения РНК для оценки влияния PZQ на экспрессию генов OfSAP.

2.3.3 Оценка целостности тегумента

Взрослых особей *O. felineus*, извлеченных из печени хомячков и отмытых стерильным физраствором инкубировали в культуральной среде с добавлением PZQ (10 мкг/мл) в течение 30 мин или 3 часов при 37°C, высокой влажности и 5% концентрации CO₂. Червей группы отрицательного контроля инкубировали в аналогичных условиях в среде без добавления PZQ. Для оценки целостности тегумента использовали краситель пропидий йодид, который добавляли в культуральную среду (конечная концентрация 2 мкг/мл) за 20 мин до микроскопии. Непосредственно перед микроскопией червей отмывали физраствором и помещали на предметное стекло в каплю фотозащитной среды.

2.3.4 Выделение РНК

Взрослые особи *O. felineus*, извлеченные из печени хомячков и сохранившие внешнюю целостность, немедленно помещались в RNeasy для сохранения целостности РНК. Аналогично были подготовлены к хранению черви после инкубации *in vitro*. После 24 часов хранения при +4° С, образцы перемещали в морозильную камеру и хранили при -20° С до выделения РНК.

- 1) 6 взрослых червей или 700 метацеркарий растирали с 200 мкл TriReagent пластиковым гомогенизатором в пробирке на 1,5 мл;
- 2) добавляли 40 мкл хлороформа, встряхивали в течение 15 сек.;
- 3) Инкубация 15 мин. при комнатной температуре;
- 4) Центрифугирование 15 мин. при +4° С, 12000g;
- 5) водную (верхнюю) фазу (около 100 мкл) переносили в чистую пробирку на 0,5 мл, добавили к ней 100 мкл изопропилового спирта, перемешали;
- 6) инкубация 1 час при -20° С;

- 7) центрифугирование 10 мин при +4° C, 12000g;
- 8) супернатант удаляли, к осадку добавляли 400 мл 70% этилового спирта, перемешивали;
- 9) центрифугирование 5 мин при +4° C, 12000g;
- 10) осадок высушивали и растворяли в 30 мкл воды, очищенной от РНКаз;
- 11) концентрацию полученного раствора РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop.

2.3.5 Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, используя oligo-dT18 праймер, согласно инструкции производителя. Для каждой реакции использовали 700 нг тотальной РНК.

2.3.6 Праймеры для ПЦР

Дизайн праймеров проведен с помощью программ Real-Time qPCR Assay, PrimerQuest, OligoAnalyzer (Integrated DNA Technology). Синтезированные олигонуклеотиды (Биоссет, Новосибирск) имели чистоту >90%. Характеристики и назначение праймеров перечислены в Таблице 1.

Таблица 1.

Список использованных праймеров с нуклеотидными последовательностями, длинами ампликонов и температурами плавления (T_m). Праймеры, отмеченные «seq», использовали для получения ампликонов и их секвенирования. Все остальные праймеры были использованы для ПЦР в реальном времени.

| Название гена/ GenBank ID/ Белок | Длина ампликона (п.н.) | Forward/ Reverse | 5'-3' нуклеотидная последовательность | T _m (°C) |
|---|------------------------------|---------------------|--|------------------------|
| <i>OfSAP1</i> / GBJA01004791.1 <i>saposin-like protein 1</i> | 412/424 | Fseq | CGTAAACAGCTAAACGACCGC | 57 |
| | | Rseq | TGCTCGAACTCAAGTAGTAATGC | 55 |
| <i>OfSAP2</i> / MK360860 <i>saposin-like protein 2</i> | 466 | Fseq | TCACGAAAGAATGTGCATGGT | 55 |
| | | Rseq | ACGAAGGTTGGGTGTTACAG | 55 |
| <i>GAPDH</i> / GBJA01012155.1 | 117 | F | GATGAGGTCGTAAGCATGGACT | 57 |

| | | | | |
|---|-----|---|---------------------------|----|
| <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> | | R | TTCGTTGTCGGTACCACGCAA | 57 |
| <i>SDHB / GBJA01011183.1</i> succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit | 113 | F | GGTGGAACGGAGACAAGTATC | 55 |
| | | R | CTTGTTCTGAAACTGAGTCAAGCG | 56 |
| <i>TIF-2 / GBJA01011914.1</i> translation initiation factor 2 | 120 | F | CAGGGAACACCAAAATTGCCAC | 57 |
| | | R | CACGTTGGAGGACTGTGAAGA | 57 |
| <i>MRPL16 / GBJA01007373.1</i> mitochondrial ribosomal protein L16 | 128 | F | GTGGAAAGCGAAGACGAGAC | 56 |
| | | R | GCCAATCCAGGTATCCACCAA | 57 |
| <i>OfSAP1 / GBJA01004791.1</i> saposin-like protein 1 | 131 | F | CTGAGCGAGTTTTGTCCCG | 56 |
| | | R | TAACAAAGATGAACTCTGTGGCA | 54 |
| <i>OfSAP2 / MK360860</i> saposin-like protein 2 | 118 | F | TGTGCAAATTGACGGGACA | 55 |
| | | R | AGTAAGCGACAGACTTCTTCAGG | 56 |
| <i>OfSAP3/ GBJA01003581.1</i> saposin-like protein 3 | 118 | F | GCGATCAGGCTTTGTTTACCTC | 56 |
| | | R | GAAGCGTTTCTGGAATTAGGATTTC | 54 |

2.3.7 ПЦР

Качество полученных кДНК оценивали методом ПЦР с использованием праймеров на ген GAPDH. ДНК-фрагменты для секвенирования были получены с помощью ПЦР с использованием праймеров, разработанных для гена OfSAP2. Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл:

- кДНК – 1 мкл;
- Прямой праймер, 4 пМ /мкл – 1 мкл;
- Обратный праймер, 4 пМ /мкл – 1 мкл;
- Буфер для ПЦР x10 – 2 мкл;
- MgCl₂ (25нМ/мкл) – 1 мкл;
- Смесь dNTP (2мкМ/мкл) – 2 мкл;
- Таq-полимераза 1 ед./мкл – 1 мкл;

- H₂O – 11 мкл.

Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в однократном буфере TAE (напряженность поля 10 В/см, сила тока 100 мА).

2.3.8 Очистка ампликонов с помощью электрофореза в GTG-агарозе

Ампликоны, предназначенные для секвенирования, очищали с помощью электрофореза в 0,7% GTG-агарозе в однократном TAE-буфере с низким содержанием ЭДТА при параметрах поля, аналогичных электрофорезу в обычной агарозе. Для визуализации в буфер для нанесения добавляли SYBR Green, что позволяло вырезать целевой фрагмент в свете синего диапазона. Вырезанный фрагмент геля замораживали при -70° С, затем, после оттаивания при комнатной температуре, центрифугировали в пробирке с фильтром (Centricon) 10 мин при 10000g.

ДНК из раствора осаждали добавлением 2,5 объемов перегнанного этилового спирта и 1/10 объема 3М NaAc. Смесь инкубировали 2 часа при -20°С, затем центрифугировали 10 мин при 12000g и +4°С. К осадку добавляли 0,5 мл 80% этанола, центрифугировали 5 мин при 12000g и +4°С. Осадок растворили в 20 мкл деионизованной воды.

2.3.9 Секвенирование

Секвенирование было сделано по методу Сэнгера (Sanger *et al.*, 1977). Для каждой секвенирующей реакции было взято по 20 нг ампликона, что соответствовало объему 2 мкл. Реакция Сэнгера проводилась в 25 мкл:

- ампликон - 2 мкл;
- праймер (F или R, 4 пМ/мкл) - 1 мкл;
- Реакционный буфер x5 - 5 мкл;
- BigDye 3.1 - 1 мкл;
- H₂O – 17 мкл.

Программа амплификации:

94°C - 5 мин.
 95°C - 10 сек. }
 50°C - 15 сек. } 80 циклов
 60°C - 2 мин. }
 95°C - 30 сек.

Продукт реакции очищали от несвязавшихся ddNTP с помощью Sephadex G50 и высушивали на воздухе при 56°C. Капиллярный электрофорез проводили в ЦКП "Молекулярная и клеточная биология" ИМКБ СО РАН с помощью капиллярного секвенатора 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Анализ секвенограмм проводили с помощью программы BioEdit.

2.3.10 ПЦР в реальном времени

Праймеры для ПЦР в реальном времени были комплементарны участкам в соседних экзонах 3'-концевых фрагментов транскриптов.

ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора CFX96 и наборов «ПЦР-комплект». Оценку эффективности реакций проводили с помощью построения калибровочных кривых, используя один и тот же образец кДНК и пять 5-кратных разведений. Для каждой пары праймеров был использован контроль без добавления кДНК (вместо нее добавляли равный объем воды). Каждую реакцию проводили в трех технических повторах, с тремя биологическими повторами, каждый из которых предполагал отдельное выделение РНК. Во всех реакциях состав реакционной смеси был следующим:

- кДНК - 0,5 мкл;
- реакционный буфер x10 - 2 мкл;
- смесь праймеров (F и R, по 5 пМ/мкл) - 2 мкл;
- MgCl₂ (25нМ/мкл) - 2 мкл;
- смесь dNTP (2,5нМ/мкл) - 2 мкл;
- Taq-полимераза - 1 мкл;

- H₂O – 10,5 мкл

Была использована 3-ступенчатая ПЦР, с температурой отжига 56°C и температурой элонгации 62°C. Перед измерением флуоресцентного сигнала планшет нагревали до 78°C, чтобы расплавить возможные неспецифические продукты реакции.

При анализе полученных данных применяли коррекцию C_q с учетом эффективности реакции (с помощью программы CFX Manager). Для статистического анализа различий был использован t-тест Стьюдента.

2.4 Биоинформатический анализ

Поиск транскриптов сапозин В-подобных белков *O. felineus* и их гомологов *C. sinensis* и *O. viverrini* был проведен с помощью tBLASTn и BLASTn. NCBI CD-Search (Marchler-Bauer *et al.*, 2011) был использован для поиска консервативных белковых доменов, а SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) - для определения сигнальных пептидов. Вторичную структуру белков предсказывали с помощью JPred 4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). Расположение аминокислотных остатков в проекции пептидной спирали на круг определяли с помощью программы Pepwheel <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel/>).

Были использованы следующие базы данных последовательностей:

- NCBI EST
- WormBaseParasite
- NCBI SRA

Филогенетический анализ домена сапозин В проводили с помощью программы MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) методом максимального правдоподобия с LG+I моделью замен (выбор метода - MEGA7, bootstrap-тест - 500 итераций). Для филогенетической реконструкции были использованы следующие последовательности, не относящиеся к описторхозной триаде:

Metorchis orientalis (GFXB01004776.1, GGVK01091992.1 и GFXB01006563.1),

Fasciola hepatica (U58467.1, AF286903.1 и LN637343.1),

Fasciola gigantica (AY870254.1, AY870255.1 и DQ336892.1),

Echinostoma caproni (SRA|ERR150048.293168.2 и 253122.2),

Paragonimus westermani (AT007132.1, AT007147.1 и AT007026.1).

Выравнивание аминокислотных последовательностей домена сапозин В было проведено программой Muscle, интегрированной в MEGA7. Конкатенированные нуклеотидные последовательности сайтов сплайсинга были выровнены вручную, для их филогенетического анализа был использован метод максимального правдоподобия с моделью замен Tamura-Nei.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Поиск и анализ генов сапозин-подобных белков у описторхид

3.1.1 Поиск транскриптов белков с единственным доменом сапозин В в транскриптоме *O. felineus*

В транскриптоме *O. felineus* (TSA:GBJA01000001-GBJA01012665) было обнаружено три транскрипта, кодирующих белки с единственным доменом сапозин В. Чтобы удостовериться, что все три найденных транскрипта не являются артефактами сборки транскриптома, мы сравнили их с разными базами нуклеотидных последовательностей:

- *O. felineus* adult worms NCBI EST database
- *C. sinensis* adult worms and metacercaria NCBI EST databases
- *C. sinensis* genome/ predicted genes (WormBaseParasite)
- *C. sinensis* adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018024 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040494)
- *O. viverrini* genome/ predicted genes (WormBaseParasite)
- *O. viverrini* adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018025 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040495)

Результаты сравнения представлены в Таблице 2.

Мы считали надежными и пригодными для последующего изучения те транскрипты, которые соответствовали следующим требованиям:

- 1) транскрипт содержит открытую рамку считывания (ORF), кодирующую белок с одним доменом сапозин В;
- 2) при помощи выравнивания транскрипта на геномные последовательности *C. sinensis* и *O. viverrini* удастся определить границы экзонов в пределах транскрипта;
- 3) гомологичные транскрипты других видов содержат ORF, кодирующие белок с одним доменом сапозин В, и имеют аналогичную генную модель;

Оказалось, что всем необходимым пунктам соответствовали те транскрипты, покрытие и идентичность которых гомологичным последовательностям были не меньше 60% и 80% соответственно, для как минимум одного генома и как минимум одного транскриптома близкородственных видов.

Таблица 2.

Результаты поиска последовательностей, гомологичных транскриптам SAP *O. felineus* (верхняя строка), в базах данных последовательностей геномов и транскриптов *C. sinensis* и *O. viverrini*. Представлены наилучшие результаты вместе с процентом покрытия и идентичности соответствующей последовательности *O. felineus*.

| | | | |
|--|--|--|---|
| <i>O. felineus</i> TSA GBJA01000001- GBJA01012665: ID и длина транскрипта | GBJA01004791.1 461 п.н. (OfSAP1) | GBJA01003581.1 1017 п.н. (OfSAP3) | GBJA01004450.1 455 п.н. |
| <i>O. felineus</i> adult worms NCBI EST database | JK625314.1 90% / 100% | No hits | JK625262.1 89% / 100% |
| <i>C. sinensis</i> adult worms and metacercaria NCBI EST databases | BB953500.1 91% / 86% | FS167249.1 (metacercariae) 67% / 91% | FS143807.1 19% / 75% |
| <i>C. sinensis</i> genome/ predicted genes (WormBaseParasite) | csin112758, 72% / >90% | scf00666:111236- 140303 91% / >90% | csin112757 35% / > 85% |
| <i>C. sinensis</i> adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018024 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040494) | SRA:SRR040494.481247 93% / 86% | No hits | SRA:SRR040494.431155.2, 17% / 82,05% SRA:SRR040494.467463.2, 26% / 73% |
| <i>O. viverrini</i> genome/ predicted genes (WormBaseParasite) | scaffold14702:339-431 20% / 85% | opera_v5_1:26881- 52535 81% / >90% | No hits |
| <i>O. viverrini</i> adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018025 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040495) | SRA:SRR040495.237435 99% / 84 % | SRA:SRR040495.191 271 46% / 90% | SRA:SRR040495.277096 13% / 84% |

Таким образом, из трех проверенных транскриптов *O. felineus* только GBJA01004791.1 и GBJA01004791.1 были сочтены надежными.

3.1.2 Идентификация гомолога клонорпорина 1 у *O. felineus*

Следует подчеркнуть, что упомянутый в обзоре литературы клонорпорин 1 не был гомологичен ни одному из трех найденных транскриптов, и мы предположили, что отсутствие гомолога клонорпорина в транскрипте *O. felineus* является либо следствием утраты им соответствующего гена или его экспрессии, либо является артефактом сборки транскриптома.

В базе EST (*O. felineus* были найдены последовательности, гомологичные клонорпорину 1, но не содержащие полноразмерной кодирующей последовательности. Дизайн праймеров для амплификации и секвенирования транскрипта клонорпорин1-подобного белка *O. felineus* был проведен на основе последовательностей EST *O. felineus* и с использованием геномов *C. sinensis* и *O. viverrini*.

Была проведена экспериментальная проверка наличия клонорпорин 1-подобного белка *O. felineus*: амплификация с помощью ПЦР и секвенирование кодирующей части и прилегающих 3'- и 5'-участков транскрипта (депонировано в GenBank: MK360860). Кроме того, с использованием тех же праймеров был отсеквенирован транскрипт клонорпорина 1 *C. sinensis*, и у взрослых червей была обнаружена изоформа этого транскрипта, отличная от последовательности, предсказанной при аннотации генома *C. sinensis* (Wormbase Parasite, csin105043). Обнаружение данной изоформы транскрипта (GenBank: MK423891) указывает на то, что генная модель, предложенная для клонорпорина 1, вероятно, не вполне верна, или имеет место альтернативный сплайсинг. Мы сравнили новый транскрипт *O. felineus* с известными формами транскрипта клонорпорина 1 и провели поиск гомологов в базах геномов и транскриптов *C. sinensis* и *O. viverrini*. Результаты поиска и сравнения представлены в Таблице 3.

Таблица 3.

Результаты поиска последовательностей, гомологичных транскрипту МК360860 *O. felineus*, в базах данных последовательностей геномов и транскриптов *C. sinensis* и *O. viverrini*. Представлены наилучшие результаты вместе с процентом покрытия и идентичности соответствующей последовательности *O. felineus*.

| | |
|---|--|
| GenBank / <i>O. felineus</i> | МК360860 (OfSAP2) |
| <i>O. felineus</i> / adult worms NCBI EST database | JK626604.1 70% / 100% |
| <i>C. sinensis</i> genome/ predicted genes (WormBaseParasite) | clonorporin 1, csin105043, 78% / >87% |
| GenBank/ <i>C. sinensis</i> | МК423891 (clonorporin 1) 98% / 85% |
| <i>C. sinensis</i> adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018024 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040494) | SRA:SRR040494.80725 83% / 85% |
| <i>O. viverrini</i> genome/ predicted genes (WormBaseParasite) | opera_v5_497: 259029-262012 89% / > 80% |
| <i>O. viverrini</i> adult worms transcriptome NCBI SRA: SRX018025 (study:SRP002141; submission:SRA012272; run:SRR040495) | SRA:SRR040495.484074 84% / 85% |

Таким образом, мы обнаружили у *O. felineus* три транскрипта, кодирующих белки с одним доменом сапозин В: OfSAP1 – GBJA01004791.1, OfSAP2 – МК360860 и OfSAP3 – GBJA01003581.1 (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

Каждый белок содержит домен сапозин В и N-концевой сигнальный пептид, однако OfSAP3 длиннее двух других белков, поскольку в нем за доменом сапозин В полипептид продолжается (без известных функциональных доменов).

3.1.3 Альтернативный сплайсинг мРНК OfSAP1

Было обнаружено, что в базе EST взрослых червей *O. felineus* последовательности, соответствующие OfSAP1, отличаются друг от друга наличием или отсутствием 12-нуклеотидного фрагмента в 5'-концевой половине CDS. Так, последовательность JK625315.1 содержит фрагмент GTACGTTTGAAT,

в то время как в большинстве EST для этого гена он отсутствует. В библиотеке NGS-прочтений генома *O. felineus* (SRX3340664) мы нашли последовательность SRR6232236.173925820, содержащую заинтересовавший нас 12-нуклеотидный фрагмент и прилегающий фрагмент интрона. Мы обнаружили, что есть две сплайсформы OfSAP1, образующиеся в результате использования разных донорных сайтов первого интрона, которые начинаются на расстоянии 12 нуклеотидов друг от друга. В результате использования донорного сайта, расположенного дальше от 5'-конца пре-мРНК, 12 нуклеотидов включаются в зрелую мРНК, и белок удлиняется на 4 аминокислоты VRLN, которые не входят ни в домен сапозин В, ни в сигнальный пептид (Рисунок 6) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

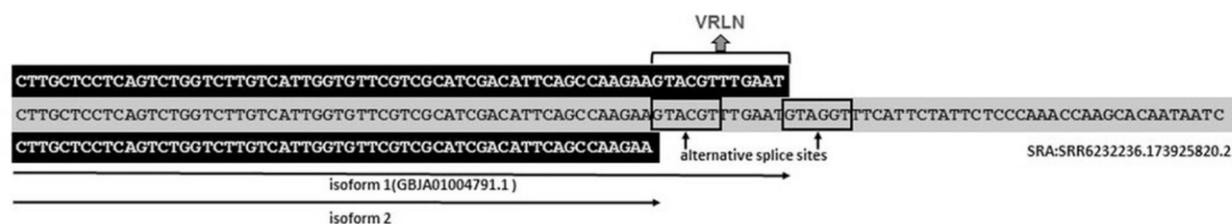


Рисунок 6. Использование альтернативных сайтов сплайсинга в первом интроне гена OfSAP1 приводит к наличию двух сплайс-вариантов мРНК OfSAP1. 5'-концевые участки первого экзона двух разных изоформ OfSAP1 помещены на черном фоне и выровнены на геномное прочтение (серый фон).

3.1.4 Сапозин В-подобные белки *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* и *Metorchis orientalis*

Для поиска транскриптов сапозин В-подобных белков *C. sinensis* и *O. viverrini* мы использовали данные, собранные в Таблицы 2 и 3. Транскрипты OfSAP1 и OfSAP2 имеют небольшую длину, и наилучшие совпадения для них были найдены в базах NGS-прочтений транскриптомов *C. sinensis* и *O. viverrini* (SRX018024 и SRX018025, соответственно), полученных при помощи системы пиросеквенирования 454 GS-FLX Titanium, обеспечивающей прочтения в 400-500 нуклеотидов. Такой длины прочтения достаточно для вмещения полной CDS гомологов OfSAP1 и OfSAP2 у *C. sinensis* и *O. viverrini*. Ближайшими гомологами для OfSAP1 оказались последовательности *C. sinensis* SRR040494.48124 и *O.*

viverrini SRR040495.237435. Ближайшими гомологами OfSAP2 были у *C. sinensis* последовательности SRR040494.80725 и МК423891 (кодирующие клонорпорин 1) и у *O. viverrini* – SRR040495.484074.

Транскрипт OfSAP3 длиннее других паралогов, и для него в транскриптомах близкородственных описторхид были найдены только гомологи с частичным покрытием, хотя и высоким сходством. Однако, геномные контиги *C. sinensis* (scf00666) и *O. viverrini* (opera_v5_497) содержат последовательности, гомологичные фрагментам транскрипта OfSAP3, по-видимому, соответствующие отдельным экзонам. Покрытие OfSAP3 фрагментами геномов *C. sinensis* и *O. viverrini* составило 91 и 81%, соответственно, а идентичность – более 90%. Это позволило нам определить нуклеотидные последовательности гомологов OfSAP3 у двух других представителей описторхозной триады.

В транскриптом *M. orientalis* было обнаружено три транскрипта, гомологичных OfSAP1–3: GFXB01004776.1, GFXB01006563.1 и GGVK01091992.1.

Таким образом, мы обнаружили в доступных базах нуклеотидных последовательностей описторхид, секвенировали или предсказали 12 транскриптов сапозин В-подобных белков, которые образуют три группы гомологов, по три паралога у каждого вида (Таблица 4).

Таблица 4.

Транскрипты SAP *O. felineus*, *C. sinensis*, *O. viverrini* и *M. orientalis*.

| | 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 |

3.1.5 Экзон-интронная структура генов и доменная организация белков SAP описторхид

Мы предположили, что описторхиды имеют три ортологичные группы белков с одиночным доменом сапозин В, представленные тремя паралогами у каждого из трех видов. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали экзон-интронную структуру генов SAP описторхид.

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 в генах SAP *O. felineus* был проведен поиск последовательностей, содержащих экзонные границы в библиотеке прочтений генома *O. felineus* SRA (SRX3340664). Границы экзонов и сайты сплайсинга в генах SAP *C. sinensis* и *O. viverrini* были определены выравниванием их транскриптов на соответствующие геномы.

Отметим, что гены, гомологичные OfSAP3, не были аннотированы в геномах *C. sinensis* and *O. viverrini*. Для реконструкции SAP3 этих видов и анализа их экзон-интронной структуры была использована генная модель OfSAP3.

Экзон-интронные структуры генов сапозин-подобных белков *O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini* представлены на Рисунке 7. Мы обнаружили, что каждый из трех паралогов OfSAP формирует ортологичную группу с генами *C. sinensis* и *O. viverrini*.

OfSAP1 и его ортологи

OfSAP1 и его ортологи (*C. sinensis* SRR040494.481247 и *O. viverrini* SRR040495.237435) содержат по 6 экзонов. Второй экзон во всех трех генах состоит из 19 п.н., т.е. является микроэкзоном. Все мРНК транслируются в белок из 102 а.о., старт трансляции – в первом экзоне. Аминокислотная последовательность домена сапозин В соответствует третьему, четвертому и

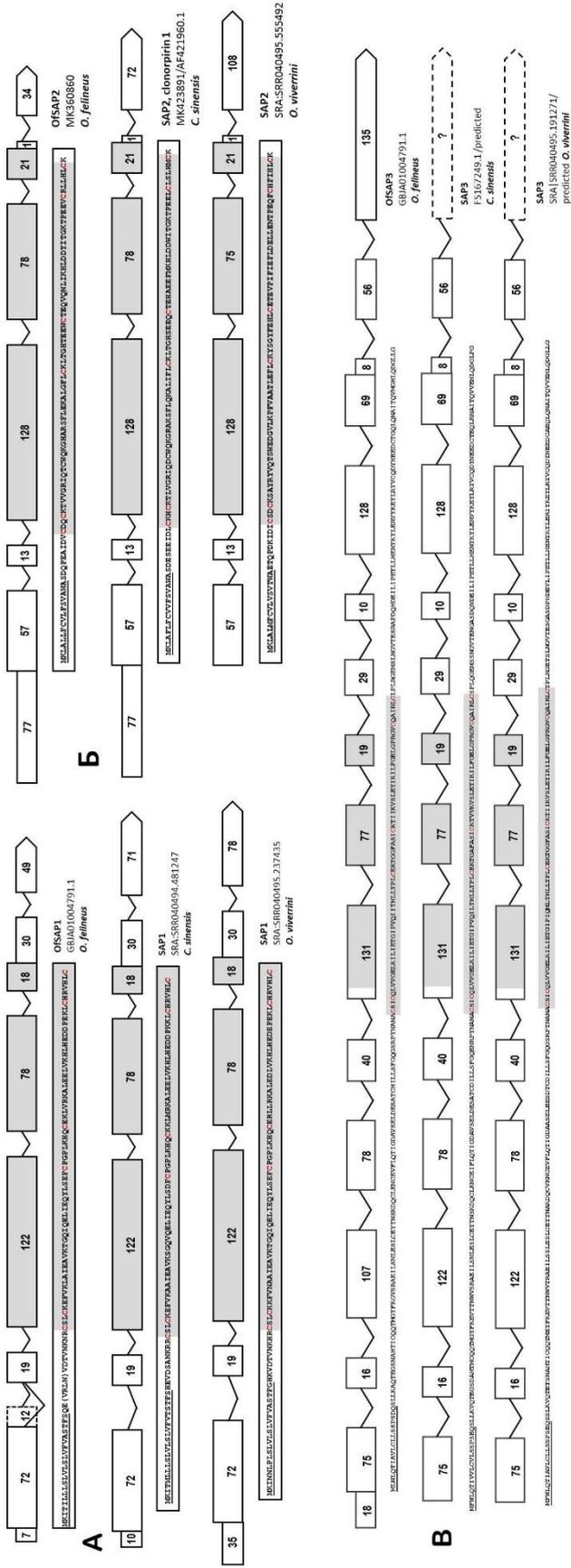


Рисунок 7. Экзон-интронная структура генов SAP описторхид. А: OfSAP1 и его ортологи; Б: OfSAP2 и его ортологи; В: OfSAP3 и его ортологи. Числа означают длину участка/экзона. Серым закрашены участки, соответствующие домену сапозин В. Знаком «?» отмечены 14-ые экзоны SAP3 *O. sinensis* и *O. viverrini*, предсказанные на основе геномной модели *O. felinus*. У *O. 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-й экзон не относится к CDS, это не сказывается на аминокислотной последовательности белка.

части пятого экзона, N-конец белка представлен сигнальным пептидом из 22 а.о. (Рисунок 7А) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

В отличие от двух других транскриптов, в OfSAP1 может происходить альтернативный сплайсинг, ведущий к появлению в белке четырех дополнительных а.о. между сигнальным пептидом и доменом сапозин В. Гены SAP1 у двух других описторхид не содержат аналогичного сайта для альтернативного сплайсинга (Рисунок 7А), продляющего первый экзон на 12 п.н. (Рисунок 6).

OfSAP2 и его ортологи

OfSAP2 и его ортологи, SRR040494.80725, MK423891 *C. sinensis* (клонорпорин 1) и SRR040495.484074 *O. viverrini*, содержат по 6 экзонов, второй экзон состоит из 13 п.н., т.е. является микроэкзоном. Кодированная часть начинается в первом экзоне и транслируется в белок из 98 а.о. у *O. felineus* и *C. sinensis*, и в белок из 97 а.о. у *O. viverrini*. Разница в длине объясняется меньшей протяженностью четвертого экзона у *O. viverrini*. В этой группе ортологов пятый экзон состоит из 22 а.о., несет терминирующий кодон и тоже является микроэкзоном. Все три белка начинаются сигнальным пептидом из 16 а.о. Домен сапозин В соответствует экзонам с третьего по пятый. В генной модели клонорпорина 1 *C. sinensis*, аннотированной в WormBase Parasite, отсутствует предложенный нами пятый экзон, что удлиняет N-конец белка. Предложенная нами генная модель учитывает и структуры транскриптов OfSAP2, и SAP2 *O. viverrini*, и геномный контекст *C. sinensis* (Рисунок 7Б) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

OfSAP3 и его ортологи

Транскрипт OfSAP3 состоит из 14 экзонов, 4 из которых – микроэкзоны. Трансляция начинается в первом экзоне, и в результате получается белковый продукт длиной 259 а.о. На N-конце расположен сигнальный пептид из 19 а.о. Домен сапозин В расположен в 6-7-8 экзонах. С-конец белка, следующий за доменом сапозин В, содержит два α -спиральных участка длиной 18 и 15 а.о.,

расположенных в положениях 215–232 и 241–254, соответственно. Предсказанные нами ортологи OfSAP3 двух других описторхид на 5 а.о. короче из-за меньшей длины третьего экзона (Рисунок 7B). Доменная организация SAP3 *C. sinensis* и *O. viverrini* аналогична OfSAP3: они содержат сигнальный пептид, домен сапозин В и по два α -спиральных участка. Во всех трех белках первые спиральные участки содержат по пять остатков тирозина, которые сосредоточены на одной из сторон α -спирали (Рисунок 8). При этом противоположная сторона α -спирали представлена кластером из четырех аминокислот (2 а.о. лизина и 2 а.о. аргинина) с выраженными свойствами основания. Аналогичные структуры обнаружены в SAP3 еще одного представителя семейства Opisthorchiidae, не входящего в «описторхохную триаду», – *M. orientalis* (Рисунок 8). Спиральные участки, расположенные ближе к С-концу белков, обладают амфипатическими свойствами у *C. sinensis* и *O. viverrini*, но у *O. felineus* два остатка глутамата заменены на остатки глицина, имеющие неполярный боковой радикал (Pirozhkova, Katokhin, 2020a). В SAP3 *M. orientalis* этот участок представлен амфипатической α -спиралью, аналогично *C. sinensis* и *O. viverrini* (Рисунок 8).

Сходство и различия в структуре паралога SAP описторхид

Все сапозин В-подобные белки описторхид начинаются сигнальным пептидом, аналогично SAP фасциол и шистосом.

OfSAP1, OfSAP2 и их ортологи имеют схожую структуру транскриптов и содержат по 6 экзонов, три из которых входят в состав домена сапозин В, а один из оставшихся является микроэкзоном. 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 7).

Все обнаруженные транскрипты содержали микроэкзоны, что говорит о высокой вероятности альтернативного сплайсинга про-мРНК (Ustianenko *et al.*, 2017). Подчеркнём, что ни один из обнаруженных в ходе работы микроэкзонов не имел длину, кратную 3, т.е. удаление любого из них при сплайсинге приводит к сдвигу рамки считывания, часто с преждевременным появлением стоп-кодона.

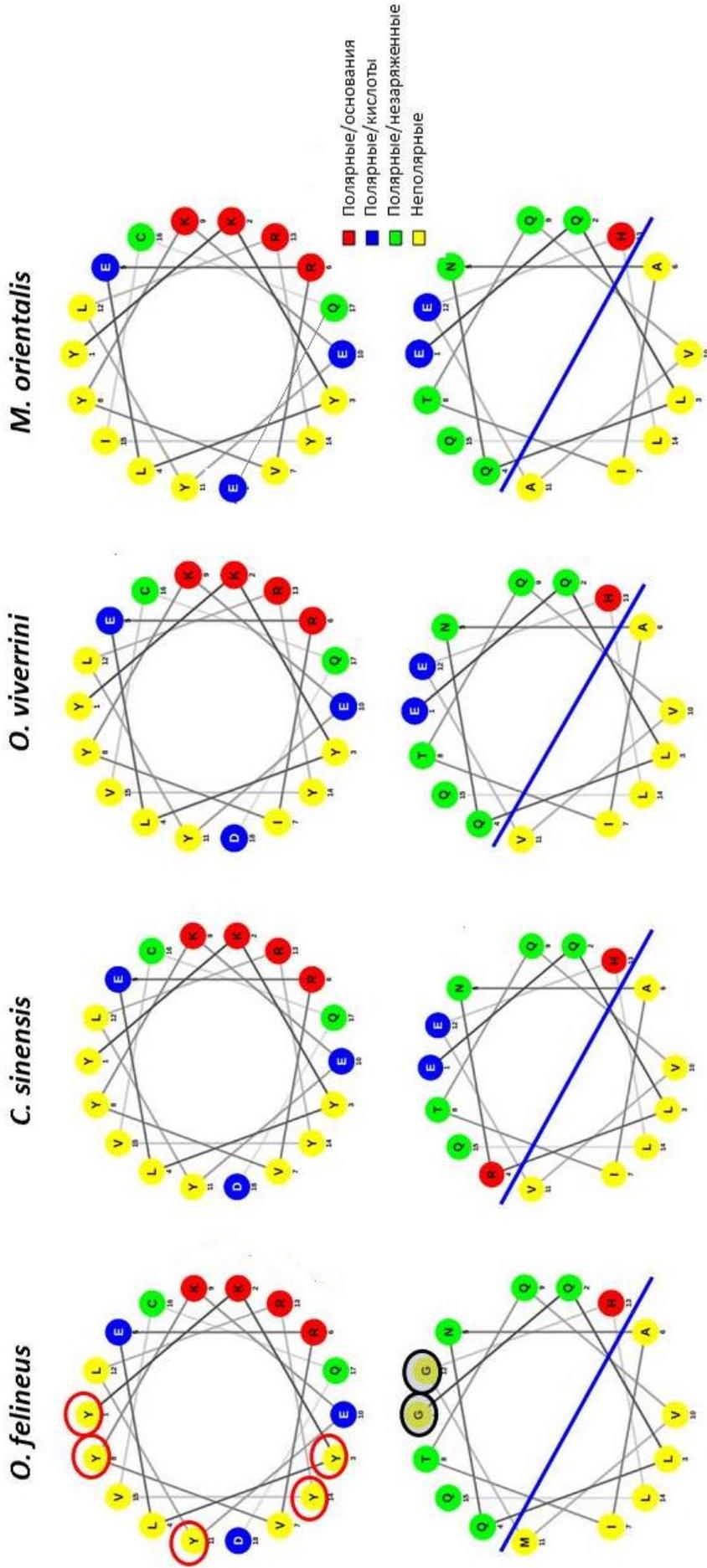


Рисунок 8. Проекция α -спиральных участков C-концевых фрагментов OfSAP3 и его ортологов. Верхний ряд: OfSAP3 215–232, *C. sinensis* SAP3 220–237 и *O. viverrini* SAP3 220–237, *M. orientalis* SAP3 241–254, *C. sinensis* SAP3 245–259 и *O. viverrini* SAP3 246–260, *M. orientalis* SAP3 245–259. Красным 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 α -спирали. Пептиды, представленные в верхнем ряду, представляют собой уникальный тирозин-богатый мотив.

Это, в свою очередь, может вызывать нонсенс-опосредованный распад транскриптов, что является известным механизмом пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов у эукариот (Nickless *et al.*, 2017).

Транскрипты SAP3 содержат кассету из 3 микроэкзонов, расположенную после участка, кодирующего домен сапозин В, что предполагает многообразие вариантов альтернативного сплайсинга. Возникающие в результате альтернативного сплайсинга вариации 3'-нетранслируемого района мРНК открывают возможности также и для микроРНК-опосредованной пост-транскрипционной регуляции (Катохин и др., 2006).

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. Вставка из 4 а.о., появляющаяся в OfSAP1 в результате альтернативного сплайсинга, может влиять на отщепление сигнального пептида, изменяя клеточную локализацию белка.

В данном разделе описаны структурные различия в общей организации генов SAP описторхид. Наблюдаемые различия в аминокислотных последовательностях домена сапозин В можно оценить с помощью филогенетического анализа, позволяющего, реконструировать историю возникновения отдельных паралогов.

3.2 Филогенетический анализ

3.2.1 Филогенетические отношения сапозин-подобных белков описторхид и других трематод

Для исследования эволюции сапозин В-подобных белков трематод мы реконструировали филогенетическое дерево на основе аминокислотных последовательностей домена сапозин В. Для анализа были взяты белки с единственным доменом сапозин В у четырех представителей семейства Opisthorchiidae, в частности у трех видов рода *Opisthorchis* (включая *C. sinensis*) и *Metorchis orientalis*, а также белки нескольких представителей отряда Plagiorchiida

(*F. hepatica*, *F. gigantea*, *E. caproni*, и *P. westermani*). В качестве внешней последовательности была использована последовательность домена сапозин В одного из SAPLIP планарии *Schmidtea mediterranea* (mk4.002629.00).

Ортологичные группы, сформированные по сходству экзон-интронной структуры генов, прослеживаются в виде отдельных клад филогенетического дерева. Примечательно, что сапозин-подобные белки *M. orientalis*, четвертого представителя семейства Opisthorchiidae, так же представлены тремя паралогами, ортологичными соответствующим белкам паразитов описторхозной триады.

Ортологи OfSAP1 представляются наименее эволюционно удаленными от предковой формы, и это предположение подтверждается сравнительно близким расположением одного из белков *P. westermani*. Десять оставшихся последовательностей, принадлежащих представителям Plagiorchiida, формируют несколько собственных клад, отдельных от Opisthorchiidae. Расположение ветвей указывает, что расхождение паралогов происходило, вероятнее всего, независимо внутри каждого отряда. Анализ выравнивания последовательностей домена сапозин В разных трематод обнаружил особенность сапозин-подобных белков описторхид: фрагмент домена, расположенный между вторым и третьим остатками цистеина у всех описторхид содержит в 18-й позиции гидрофобный остаток глицина, в то время как у остальных трематод в этой позиции находятся гидрофильные аминокислотные остатки (за исключением двух белков *E. caproni*, имеющих в этом положении гидрофобные остатки пролина) (Рисунок 9) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

Стоит отметить, что домен сапозин В в SAP2 *O. viverrini* в ходе эволюции приобрел структурные вариации, которые проявляются в изменении суммарного заряда домена: в то время как в SAP2 *O. felineus* и *C. sinensis* домен сапозин В заряжен положительно, у *O. viverrini* он имеет отрицательный заряд. Эти вариации могут отражать межвидовые различия в физиологии у описторхид.

3.2.1 Консерватизм сайтов сплайсинга

Мы сравнили последовательности сайтов сплайсинга в генах SAP *O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini*. Для этого было взято по 6 нуклеотидов с 5'-конца и по 20 нуклеотидов с 3'-конца каждого интрона. Кроме того, мы использовали сайты сплайсинга генов SAP *F. hepatica* (FhSAP1 и FhSAP2), которые имеют экзон-интронную структуру, аналогичную SAP1 и SAP2 описторхид, а именно, содержат по 6 экзонов, из которых второй является микроэкзоном (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

Было обнаружено высокое сходство концов интронов SAP1 у описторхид. В ортологах SAP2 сайты сплайсинга были значительно менее консервативны.

Сайты сплайсинга в группе ортологов SAP3 в большей степени консервативны, но у *C. sinensis* и *O. viverrini* непосредственно перед 14-м экзоном была найдена замена G/C. Однако этот экзон входит в состав 3'-UTR, и при сплайсинге может быть использован какой-нибудь нижележащий акцепторный сайт, что приведёт к некоторому уменьшению длины последнего экзона у этих двух видов (Рисунок 10).

Чтобы оценить и визуализировать степень сходства между концами интронов генов SAP, мы построили филогенетическое дерево на основе выравнивания конкатенированных последовательностей концов интронов SAP1 и SAP2, содержащих по 6 экзонов, и концов 4-8 интронов SAP3 (Рисунок 11).

Было обнаружено, что 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. Это свидетельствует о дупликации гена SAP и последующей независимой эволюции паралогов у видов в семействе Opisthorchiidae. Сайты сплайсинга генов FhSAP1 и FhSAP2 образуют отдельную кладу, еще раз указывая на независимую мультипликацию гена SAP у Fasciolidae и Opisthorchiidae.

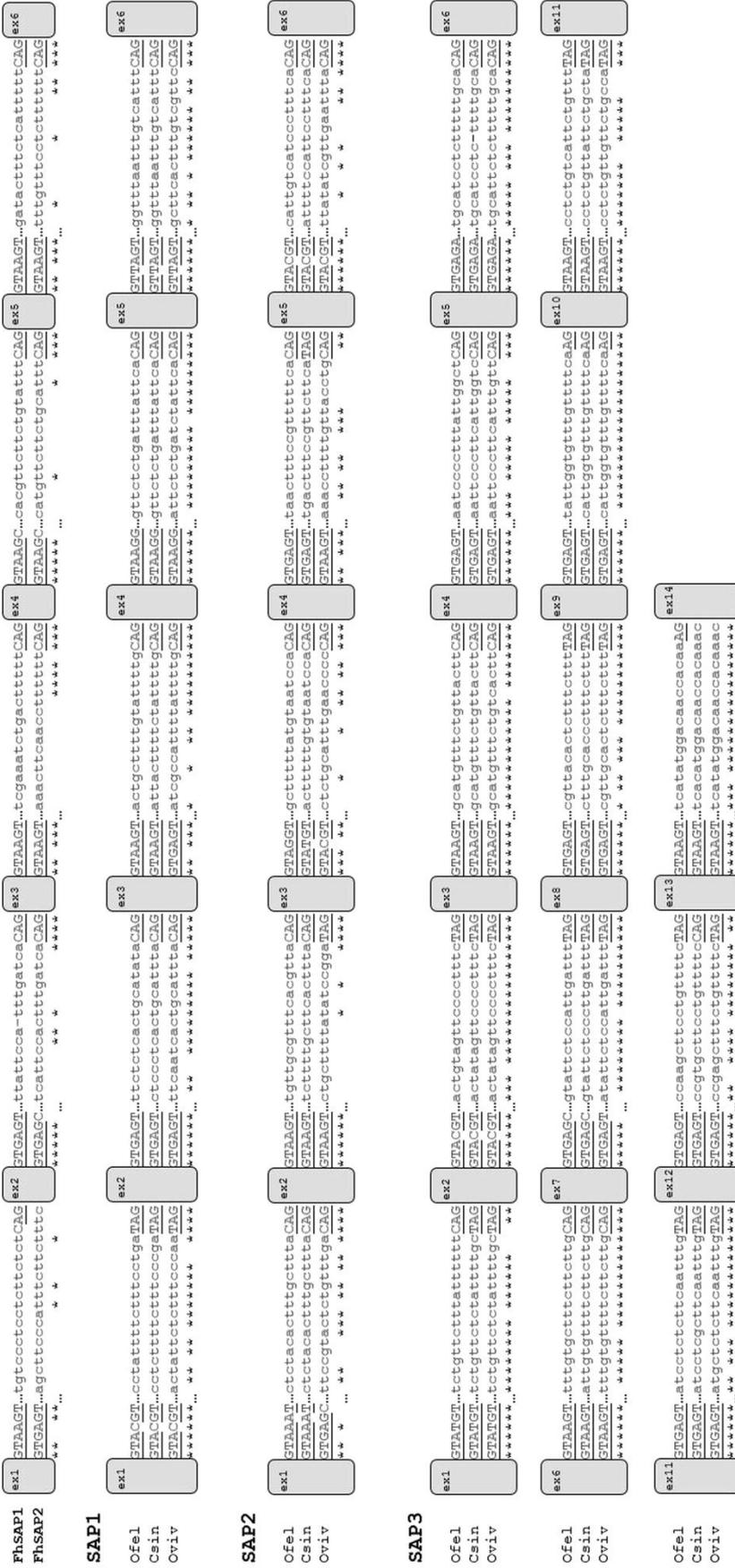


Рисунок 10. Выравнивание концов интронов двух генов *SAP F. heratica* и 9-ти генов *SAP* описторхид.

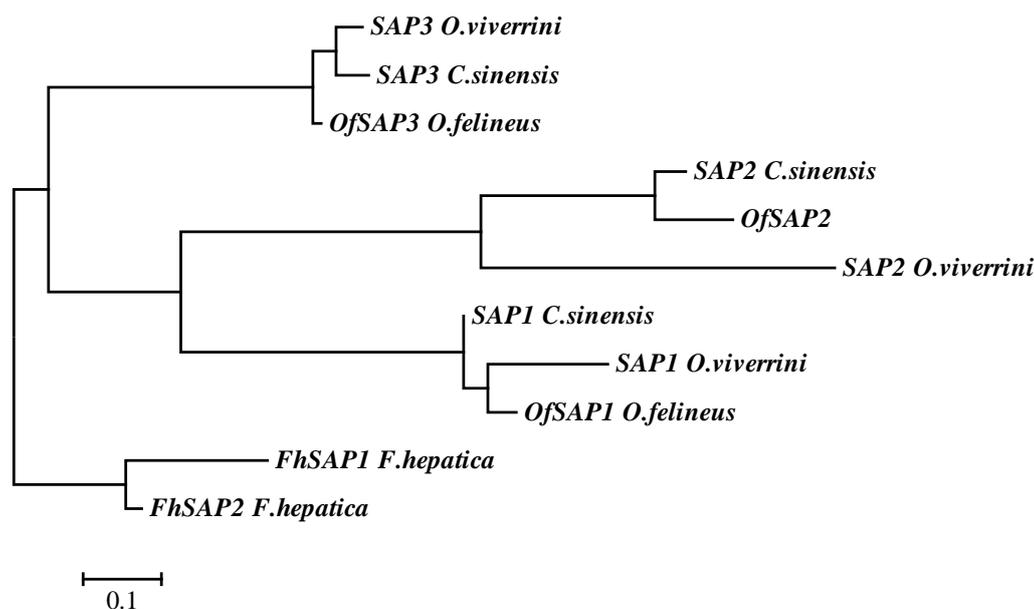


Рисунок 11. Филогенетическое дерево, построенное для конкатенированных последовательностей концов интронов двух генов SAP *F. hepatica* и 9-ти генов SAP описторхид.

Реконструированное нами филогенетическое дерево, основанное на последовательностях домена сапозин В (Рисунок 9), демонстрирует отсутствие непосредственных эволюционных связей между SAP представителей разных отрядов, что свидетельствует о независимой специализации их функций после возникновения трех паралогов у описторхид и плагиорхид.

Наличие у всех изученных нами трематод по несколько паралогов SAP, проявляющих структурные вариации, может отражать результаты приспособления трематод разных семейств к выживанию в разных тканях хозяев.

3.3 Стадиоспецифичность экспрессии генов сапозин В-подобных белков описторхид

Исследование экспрессии генов на разных стадиях жизненного цикла и в разных условиях является одной из необходимых предпосылок для формулировки гипотез о функциях соответствующих белков и их физиологической роли. В данной работе представлены результаты сравнения экспрессии генов SAP у взрослых особей и метацеркарий *O. felineus*, а также исследования влияния

паразитов на экспрессию генов OfSAP1, OfSAP2 и OfSAP3 у взрослых паразитов.

3.3.1 Экспрессия генов *OfSAP1–3* на разных стадиях жизненного цикла

Для определения стадиоспецифической экспрессии OfSAP1 и OfSAP3 мы использовали опубликованные данные секвенирования РНК (Pomaznou *et al.*, 2016). Как оказалось, экспрессия OfSAP1 присуща взрослым паразитам (и занимает 20-е место при ранжировании генов по экспрессии во взрослых червях), в то время как OfSAP3 является специфичным для метацеркарий (Рисунок 12А). Эти данные были экспериментально проверены нами с помощью ПЦР в реальном времени (Рисунок 12Б). В качестве нормализующего был использован ген GAPDH, экспрессия которого не различается у взрослых описторхов и метацеркарий (Pomaznou *et al.*, 2016). Рисунок 12А,Б демонстрирует соответствие профилей стадиоспецифической экспрессии генов OfSAP1 и OfSAP3, измеренной двумя разными методами.

Поскольку OfSAP2 не был описан в работе (Pomaznou *et al.*, 2016), его стадиоспецифическая экспрессия тоже была измерена методом ПЦР в реальном времени. Мы обнаружили, что у взрослых паразитов экспрессия OfSAP2 приблизительно в 2 тыс. раз выше, чем в метацеркариях. При сравнении экспрессии гена OfSAP2 и двух других паралофов, видно, что у взрослых паразитов его экспрессия примерно в 4 раза выше, чем экспрессия OfSAP1, и значительно выше экспрессии OfSAP3, являющейся специфичной для метацеркарий (Рисунок 12Б) (Pirozhkova, Katokhin, 2020a).

Таким образом, у взрослых особей *O. felineus* SAP2 является наиболее высоко экспрессированным геном SAP. По-видимому, экспрессия гена OfSAP2 имеет важное физиологическое значение, поскольку его транскрипт занимает пятое место по представленности среди всех транскриптов.

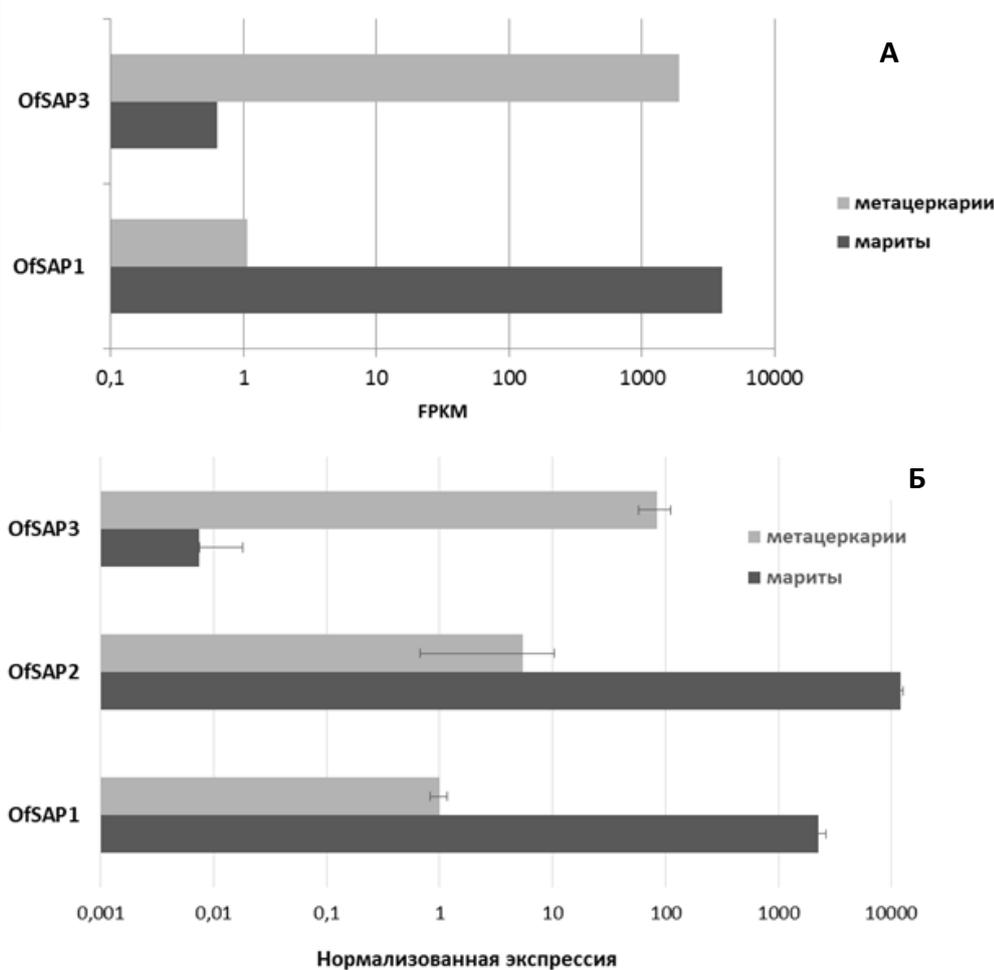


Рисунок 12. Экспрессия генов OfSAP на разных стадиях жизненного цикла: (А) на основе литературных данных, (Б) по данным ПЦР в реальном времени. Данные представлены как lg FPKM или lg нормализованной экспрессии.

3.3.2 Стадиоспецифичность экспрессии генов SAP у *C. sinensis*, *O. viverrini* и *M. orientalis*

Для сравнения полученных нами данных об экспрессии генов SAP у *O. felineus* с экспрессией 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 около 0,34% прочтений (Yoo *et al.*, 2011). Экспрессия гена SAP1 на взрослой стадии *C. sinensis* несколько ниже, ему соответствует около 0,2% прочтений. Исследование экспрессии генов в разных органах и тканях взрослых *C. sinensis* показало, что в яичниках, семенниках и присоске SAP1 – это самый

высоко представленный транскрипт из всех, а в мышцах он занимает второе место по представленности. По данным того же исследования ген SAP2 (клонорпорин 1) тоже характеризуется высокой экспрессией у взрослых особей *C. sinensis*, и соответствующий транскрипт входит в 20 наиболее представленных (Huang *et al.*, 2013). Однако, авторы не исследовали кишечный эпителий и тегумент, составляющие существенную часть тела взрослого паразита. Таким образом, меньшая, по сравнению с SAP1, экспрессия клонорпорина 1 может объясняться тем, что этот ген экспрессируется преимущественно в кишечном эпителии и/или тегументе, что даёт важные свидетельства для понимания функций его белкового продукта. В библиотеке EST из метацеркарии *C. sinensis* транскрипты SAP1 и SAP2 не были обнаружены.

В библиотеке прочтений транскриптома взрослых особей *O. viverrini* было обнаружено 47 последовательностей, соответствующих SAP1, и 110 последовательностей, соответствующих SAP2, что составляет около 0,07% и 0,17% от общего числа прочтений, соответственно. Транскриптомные данные для метацеркарий *O. viverrini* отсутствуют.

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. Это указывает на то, что для клонорха характерна аналогичная *O. felineus* стадиоспецифичность экспрессии SAP3. В то же время, в библиотеке NGS-прочтений транскриптома взрослых особей *O. viverrini* было найдено 3 последовательности, соответствующие SAP3, однако во всех трёх отсутствовал участок, соответствующий 10-му экзону, который является микроэкзоном и состоит из 10 п.н. Такой альтернативный сплайсинг приводит к укорочению белка и отсутствию протяженного С-конца, следующего за доменом сапозин В и содержащего обнаруженный нами тирозин-богатый мотив, функции которого еще не выяснены.

Кроме того, используя библиотеки NGS-прочтений (SRA: SRX4282189,

SRX4282190) мы оценили экспрессию SAP1–3 у метацеркарий и взрослых особей *M. orientalis*. У взрослых особей этого вида SAP2 является наиболее представленным транскриптом SAP, относящиеся к нему прочтения составляют 0,2% от всей библиотеки, в то время как на долю SAP1 приходится 0,004%. В метацеркариях экспрессия гена SAP1 отсутствует, а доля прочтений, соответствующих SAP2, составляет 0,002%. Экспрессия гена SAP3 характерна для метацеркарий: около 0,16% всех прочтений соответствует SAP3.

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. Анализ доступных транскриптомных данных выявил следующие видоспецифические особенности экспрессии генов SAP:

- А) У взрослых *M. orientalis* наблюдается сравнительно низкая экспрессия SAP1.
- Б) У взрослых *O. viverrini* экспрессируется ген SAP3, однако обнаруженная изоформа соответствует белку меньшего размера, в котором отсутствует С-конец, следующий за доменом сапозин В.

Исследование дифференциальной экспрессии генов в разных условиях и на разных стадиях жизненного цикла является важным инструментом при выяснении функций соответствующих белков. В разделе 1.4.4. были предложены гипотезы о влиянии празиквантела на экспрессию генов SAP описторхид. Поскольку применение празиквантела обычно ассоциировано с взрослой стадией жизненного цикла паразитов, а взрослые паразиты более чувствительны к нему (Cupit, Cunningham, 2015), мы оценили влияние препарата на экспрессию генов SAP у взрослых особей *O. felineus* при применении его *in vivo* и *in vitro*. Предполагая, что сапозин В-подобные белки могут быть вовлечены в празиквантел-индуцированное повреждение тегумента, мы предварительно проверили существование этого эффекта у *O. felineus*.

3.4 Действие празиквантела на *O. felineus*

3.4.1 Эффективность празиквантела *in vivo*

При подготовке материала для оценки влияния празиквантела на экспрессию генов SAP было обнаружено, что при лечении экспериментального описторхоза празиквантелом через 20 недель после заражения значительное количество живых паразитов остается в печени хозяев. Данные о количестве червей, выделенных из каждого экспериментального животного, зараженного 100 метацеркариями, представлены на Рисунке 13.

Далекая от стопроцентной и значительно различающаяся эффективность празиквантела при лечении экспериментального описторхоза скорее всего не является признаком снижения чувствительности паразитов к препарату, а может быть следствием различий в метаболизме празиквантела у лабораторных животных. Поэтому чувствительность *O. felineus* к празиквантелу была оценена *in vitro*.

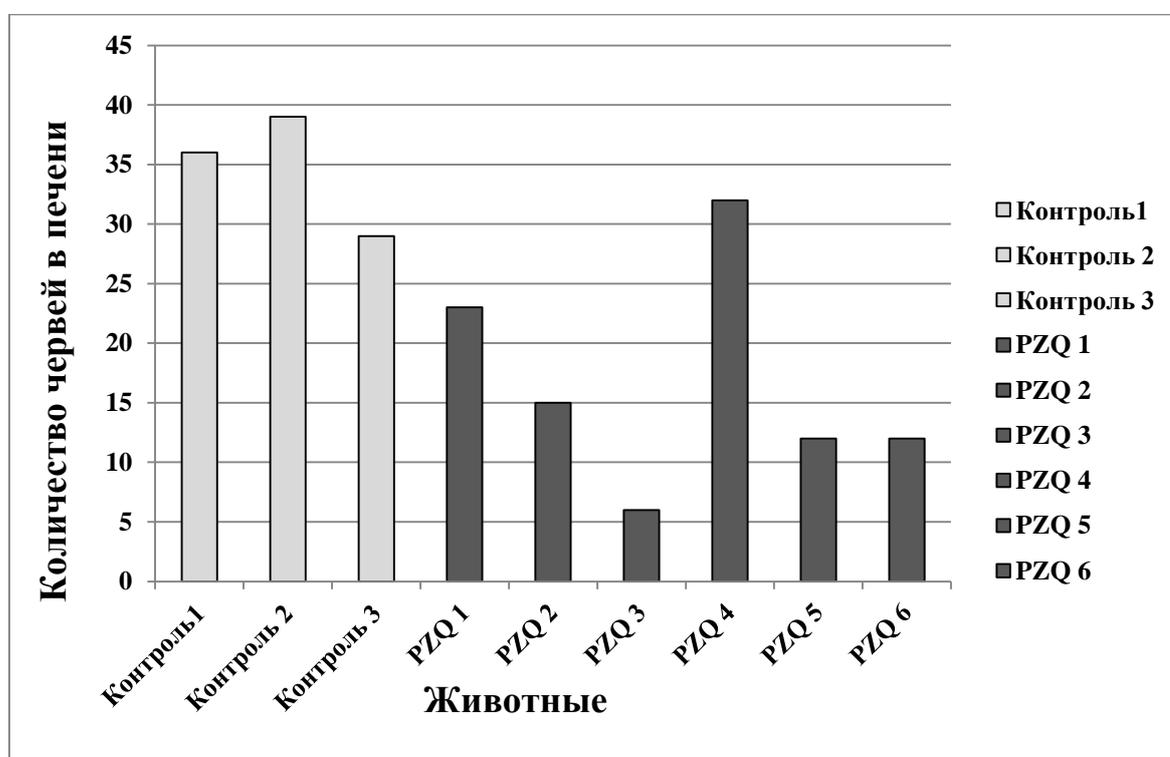


Рисунок 13. Количество червей, извлеченных из печени сирийских хомячков с экспериментальным описторхозом без лечения (Контроль 1–3) и после лечения празиквантелом в терапевтической дозе (PZQ1-6).

3.4.2 Чувствительность взрослых особей *O. felineus* к празиквантелу *in vitro*

Реакция *O. felineus* на празиквантел оценивалась в баллах: три балла соответствовали сохранению нормальной подвижности, т.е. черви были настолько же активны, как особи из группы отрицательного контроля, не подвергшиеся действию празиквантела. Снижение подвижности по сравнению с отрицательным контролем, но с сохранением мышечных сокращений во всем теле соответствовало двум баллам. Если подвижность сохранялась только в области ротовой присоски, черви получали один балл. Ноль баллов означал полное отсутствие подвижности в течение 2 минут. Мёртвыми считали червей, приобретших мутно-серый оттенок.

Результаты оценки подвижности паразитов, подвергшихся действию разных доз празиквантела (0-50 мкг/мл) *in vitro* в течение 1 и 24 часов, представлены в Таблице 5. Кроме того, была оценена способность паразитов восстанавливаться после замены питательной среды на среду без добавления празиквантела (Pakharukova *et al.*, 2015).

Даже при концентрации празиквантела 50 мкг/мл небольшая доля паразитов восстанавливает жизнеспособность после удаления препарата из среды. Это указывает на гетерогенность описторхов по способности восстанавливаться после действия празиквантела. В этом случае в перспективе возможен отбор особей с повышенной устойчивостью при повторяющихся циклах лечения и реинфекции, что определенно указывает на необходимость выяснения механизмов снижения чувствительности паразитов к празиквантелу.

Таблица 5

Подвижность взрослых особей *O. felineus*, подвергшихся действию разных концентраций празиквантела через 1 и 24 часа после начала инкубации и через 48 часов после замены культуральной среды без празиквантела (*цифра - оценка подвижности в баллах).

| Количество особей в группе | 40 | 38 | 30 | 30 | 15 |
|------------------------------|---|--------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| | Концентрация празиквантела (мкг/мл) / количество особей | | | | |
| Время инкубации, час | 0 | 0,1 | 1 | 10 | 50 |
| 1 | 40*3 | 20*1 18*0 | 6*1 24*0 | 30*0 | 15*0 |
| 24 | 40*3 | 18*1 20*0 | 30*0 | 30*0 | 15*0 |
| + 48 без празиквантела | 40*3 | 18*2 20*0 | 6*1 19*0 5 мертвы | 2*1 19*0 9 мертвы | 2*1 13 мертвы |

3.4.3 *Нарушение целостности тегумента O. felineus под действием празиквантела*

Одним из описанных эффектов празиквантела является нарушение целостности тегумента некоторых трематод. Окрашивание с помощью пропидиум йодида дает возможность оценить целостность покровов паразитов. Пропидиум йодид (PI) – это интеркалирующий флуоресцентный краситель, проникающий только в поврежденные клетки и окрашивающий ДНК. Мы сравнили состояние тегумента особей *O. felineus*, подвергавшихся действию 10 мкг/мл празиквантела в течение 30 минут и 3 часов, с червями, содержащимися в среде без него. PI окрашивает тегумент подвергшихся действию празиквантела червей (Рисунок 14В, Г), но не проникает через поверхность червей, не подвергавшихся действию празиквантела (Рисунок 14А, Б). Заметно изменение характера окрашивания тегумента со временем: через полчаса большая часть поверхности окрашивается PI, но подтегументальные структуры не окрашиваются (Рисунок 14В); через три

часа окрашенные области становятся меньше по площади, и вовлекаются более глубокие структуры (Рисунок 14Г). Через 24 часа инкубации при такой же концентрации PZQ окрашивание тегумента не наблюдается (Рисунок 14Д), что может свидетельствовать о подключении механизмов репарации тегумента, в том числе связанных с изменением экспрессии генов (Pakharukova *et al.*, 2015).

Исследования влияния празиквантела на тегумент *O. viverrini* показали, что при его применении *in vitro* выраженные нарушения в структуре тегумента взрослых червей развиваются уже в течение часа (Apinhasmit, Sobhon, 1996). Через 2 часа инкубации с PZQ в концентрации 20 мкг/мл от тегумента могут отделяться фрагменты, обнажая подтегументальные структуры (Sirisinha *et al.*, 1984). При применении PZQ *in vivo* через 4 часа после лечения хозяина у *O. viverrini* наблюдается отделение фрагментов тегумента, однако появляются и признаки репарации, в частности, становятся заметны гранулы, которые вероятно содержат компоненты для восстановления покровов паразита (Sirisinha *et al.*, 1984).

Таким образом, наши результаты подтвердили, что нарушение целостности тегумента под действием PZQ, описанное для *O. viverrini* (и многих других трематод), характерно и для *O. felineus*. Кроме того, тегумент *O. felineus* способен восстанавливать целостность, что согласуется с литературными данными, описывающими такой эффект у *O. viverrini*.

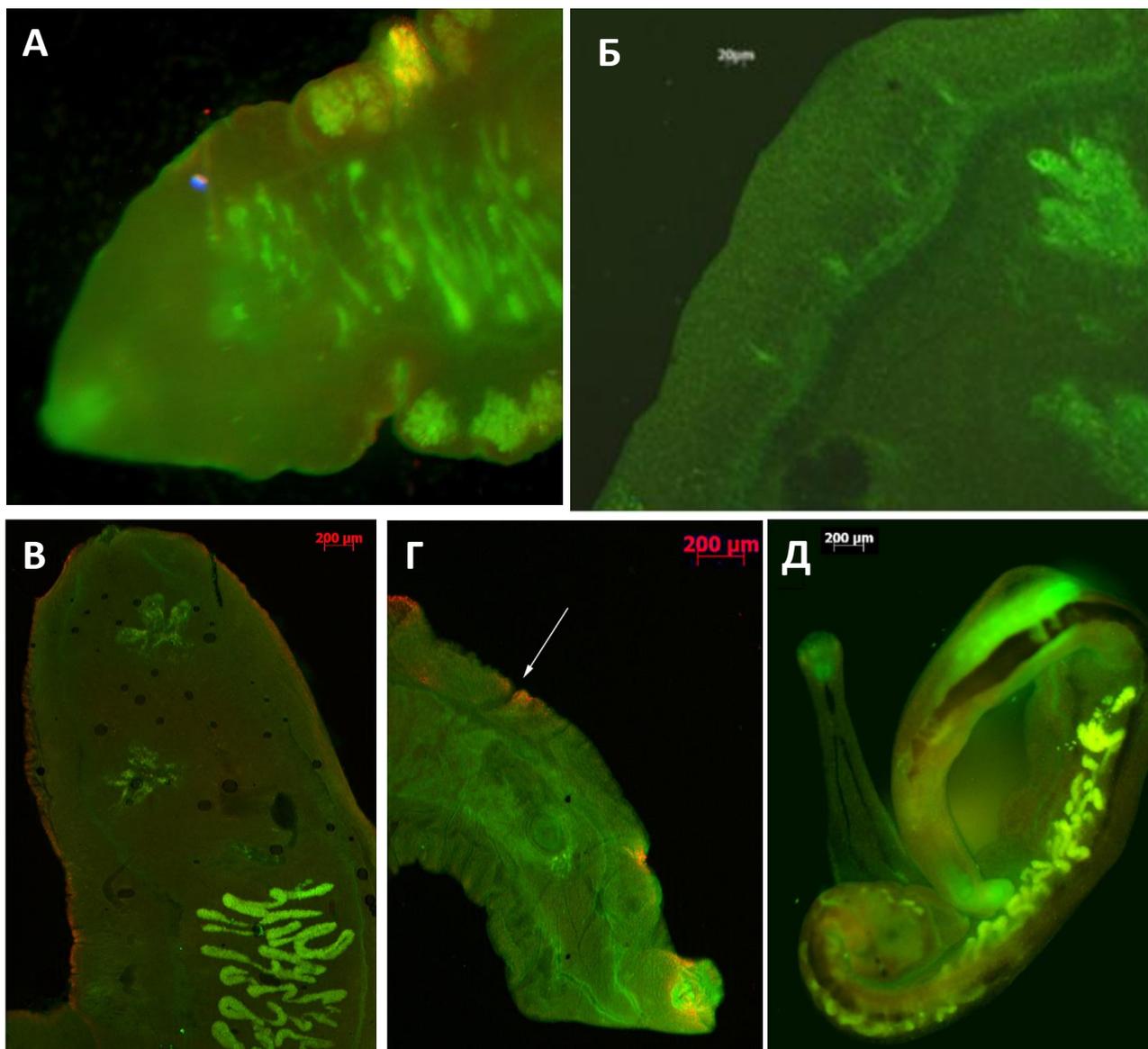


Рисунок 14. Нарушение целостности тегумента *O. felineus* под действием празиквантела *in vitro*. А, Б: черви, содержащиеся в среде без празиквантела; В, Г: 10 мкг/мл празиквантела в течение 30 минут и 3 часов, соответственно; Д: 10 мкг/мл празиквантела в течение 24 часов.

3.4.4 Влияние празиквантела на экспрессию генов *SAP* у взрослых особей *O. felineus*

Выбор нормализующих генов для ПЦР в реальном времени

При определении экспрессии генов *OfSAP* на разных стадиях жизненного цикла мы использовали в качестве нормализующего ген *GAPDH* (GBJA01012155.1), экспрессия которого была стабильна согласно работе (Pomaznou *et al.*, 2016). Для оценки влияния празиквантела на экспрессию генов

OfSAP была оценена стабильность экспрессии этого и трех других генов в тестируемых условиях. Стабильность экспрессии в условия стресса была показана для генов GAPDH, субъединицы В сукцинатдегидрогеназы митохондрий (SDHB, GBJA01011183.1) (Mehennaoui *et al.*, 2018) и митохондриального рибосомного белка L16 (MRPL16, GBJA01007373.1) (Mordvinov *et al.*, 2017). Кроме того, был протестирован ген фактора инициации транскрипции 2 (TIF-2).

Мы обнаружили, что экспрессия более стабильна у генов GAPDH и SDHB (M value обоих генов 0,2096), поэтому они были использованы для нормализации данных в ПЦР в реальном времени (Pirozhkova, Katokhin, 2020b).

Влияние празиквантела in vivo на экспрессию генов SAP у взрослых особей O. felineus

В условиях *in vivo* PZQ вызывает повышение экспрессии гена OfSAP2 в 2,5 раза через 12 часов после последнего введения препарата (Рисунок 15) (Pirozhkova, Katokhin, 2020b). Экспрессия OfSAP1 и OfSAP3 не меняется.

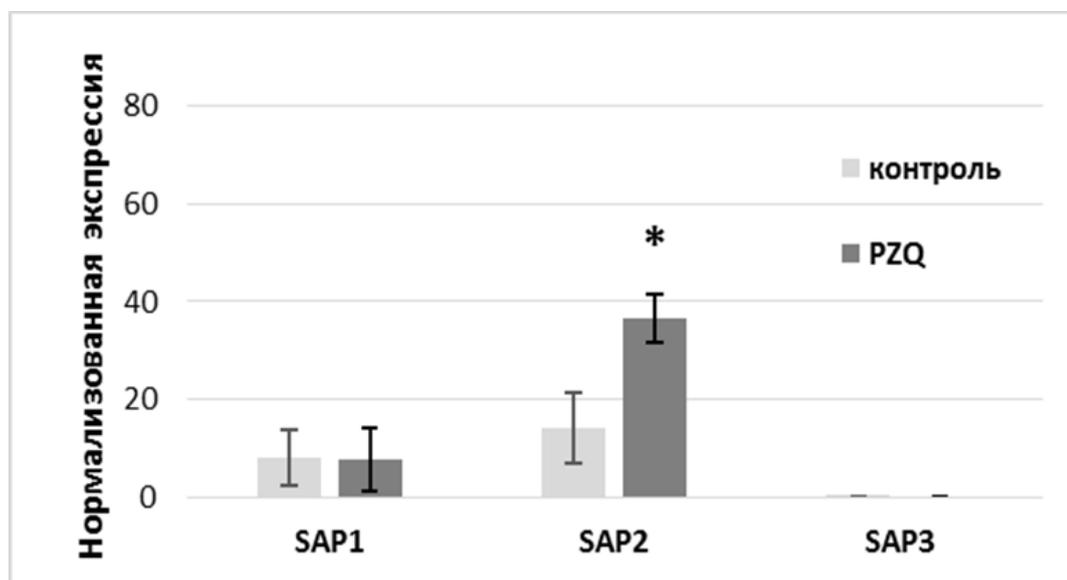


Рисунок 15. Нормализованная экспрессия генов SAP1, SAP2 и SAP3 у взрослых особей *O. felineus* через 12 часов после обработки празиквантелом *in vivo*; * $p < 0,01$.

Увеличение уровня экспрессии гена OfSAP2 может быть связано с тем, что соответствующий белок способствует ослаблению эффекта празиквантела. В частности, если белок OfSAP2 участвует в процессе слияния мембранных

везикул с поверхностью тегумента, увеличение экспрессии кодирующего его гена может способствовать восстановлению тегумента, поврежденного празиквантелом. В таком случае ожидаемо увеличение экспрессии других генов, продукты которых вовлечены в обновление тегумента, а именно, во внутриклеточный транспорт с участием микротрубочек.

Влияние празиквантела in vivo на экспрессию генов, ассоциированных с внутриклеточным транспортом с участием микротрубочек, у взрослых червей

Была проверена корегуляция экспрессии гена OfSAP2 и генов, продукты которых, как мы предполагаем, могут участвовать в транспорте везикул к поверхности тегумента в процессе его обновления/репарации. Для анализа были выбраны гены белков, вовлеченных во внутриклеточный транспорт органелл по микротрубочкам. В частности, тубулин альфа (TubA) и тубулин бета (TubB) являются структурными белками микротрубочек, а также тяжелая и легкая цепи динеина (DyneH и DyneL) - моторного белка, перемещающего везикулы от плюс- к минус-концам микротрубочек. Динеин был выбран потому, что он транспортирует везикулы от плюс- к минус-концам микротрубочек, то есть в базально-апикальном направлении в эпителиальных клетках (Toya, Takeichi, 2016). Тегумент представляет собой специфическую разновидность эпителия, и транспорт объектов к поверхности должен осуществляться также с помощью динеина.

Дизайн исследования был полностью аналогичен использованному при оценке влияния празиквантела *in vivo* на экспрессию генов OfSAP1 и OfSAP2. Было обнаружено, что празиквантел достоверно снижает экспрессию всех четырех выбранных генов (Рисунок 16) (Pirozhkova, Katokhin, 2020b).

Таким образом, нам не удалось обнаружить корегуляцию экспрессии гена OfSAP2 и генов, вовлеченных в транспорт везикул, поэтому маловероятно, что OfSAP2 необходим для слияния мембранных везикул с поверхностью тегумента в процессе его обновления/репарации.

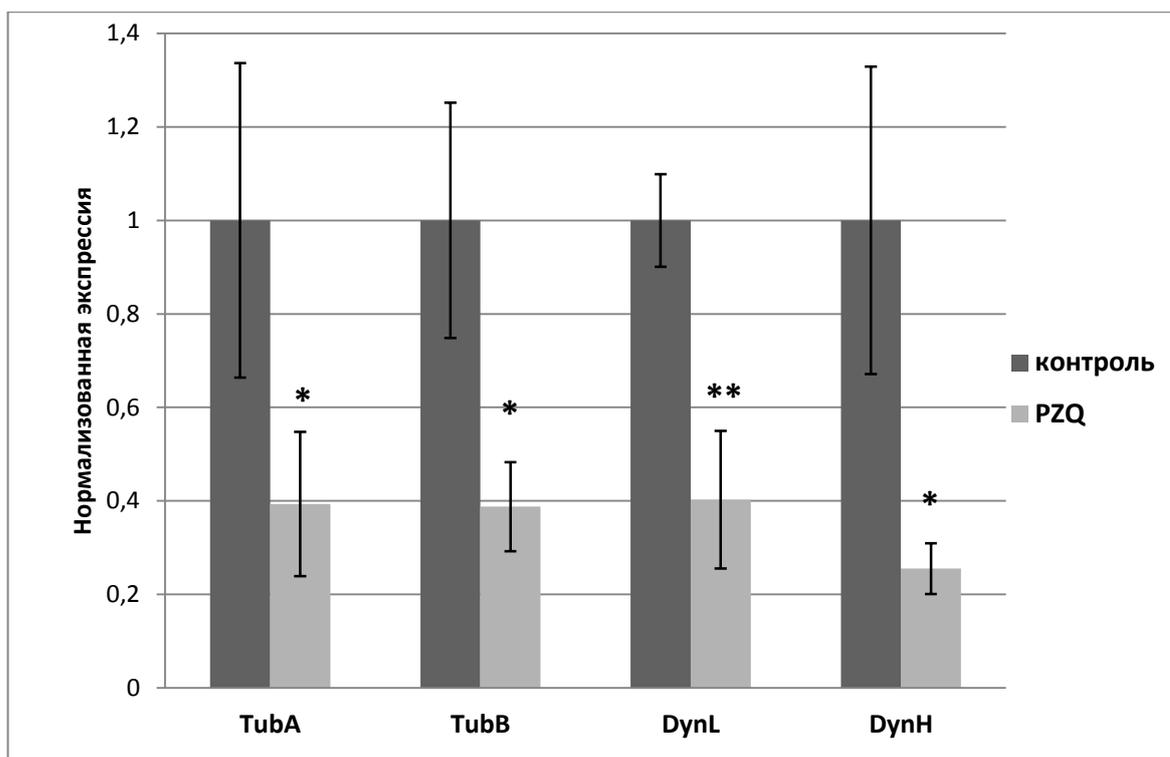


Рисунок 16. Относительная нормализованная экспрессия генов TubA, TubB, DynL и DynH; * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$.

Влияние празиквантела in vitro на экспрессию генов SAP у взрослых особей O. felineus

Чтобы проверить, является ли увеличение экспрессии SAP2 *O. felineus* специфическим ответом на PZQ, а не следствием разнообразных воздействий со стороны хозяина, мы оценили изменение экспрессии генов OfSAP1–3 в ответ на препарат *in vitro*.

При оценке действия препарата *in vitro* взрослых червей (N=20) инкубировали в течение 24 часов в среде, содержащей 10 мкг/мл празиквантела. В качестве контроля использовали необработанных червей. Было обнаружено, что добавление празиквантела при инкубации червей *in vitro* не влияет на экспрессию генов OfSAP (Рисунок 17).

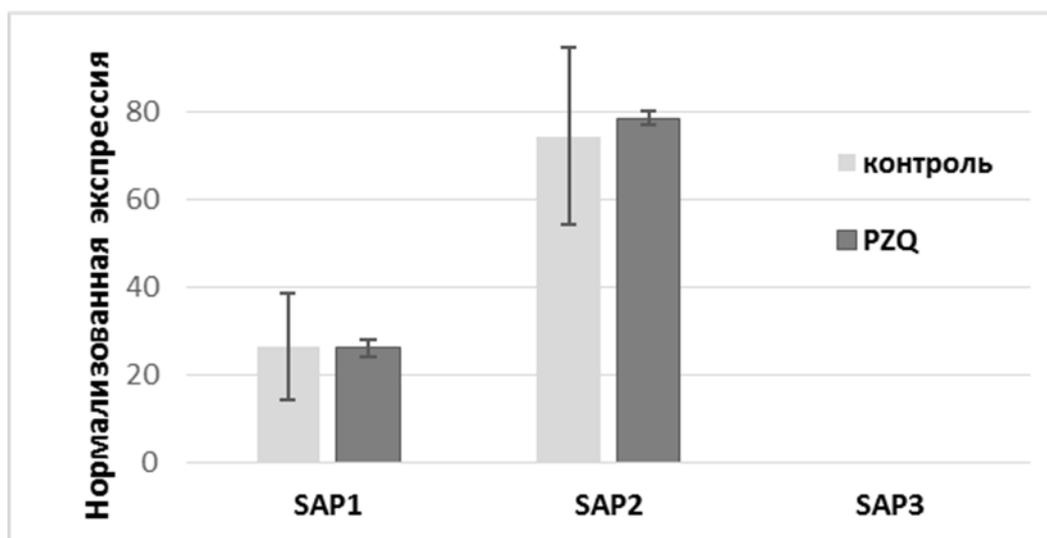


Рисунок 17. Нормализованная экспрессия генов SAP1, SAP2 и SAP3 у взрослых особей *O. felineus* после 24 ч. инкубации *in vitro* в среде, содержащей празиквантел;

Однако легко заметить, что экспрессия генов OfSAP1 и OfSAP2 у червей, перенесших инкубацию *in vitro* (Рисунок 17), существенно выше, чем непосредственно после извлечения из модельного хозяина (Рисунок 15). Экспрессия гена OfSAP2 после обработки PZQ *in vivo* остается ниже, чем после инкубации *in vitro* (в среде без PZQ). Ген SAP3 слабо экспрессируется у взрослых червей и не индуцируется PZQ ни *in vitro*, ни *in vivo*.

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*, поэтому маловероятно, что функцией соответствующего белка является связывание липофильных метаболитов и ксенобиотиков. При этом экспрессия OfSAP1 увеличивается только после инкубации *in vitro*, но не меняется под влиянием PZQ. Мы видим следующие возможные причины этих изменений:

1. Паралич, вызванный празиквантелом, в условиях *in vivo* приводит к потере связи червя со стенкой протока и, как следствие, к прекращению доступа к крови или клеткам эпителия желчных протоков, которые составляют основу

питания взрослых описторхид. Это приводит к прекращению поступления питательных веществ через кишечник, что, следуя логике, должно активировать внешнее пищеварение и всасывание через тегумент. При этом, помимо компонентов желчи, паразит может использовать клетки эпителия желчных протоков, предварительно разрушая их. Аналогично, содержание *O. felineus in vitro* означает прекращение поступления питательных веществ через кишечник и требует перехода на питание через тегумент. Таким образом, увеличение экспрессии гена OfSAP2 может указывать на то, что его функция связана с питанием, и продукт этого гена необходим для связывания липидов желчи или для разрушения клеточных мембран.

2. Увеличение экспрессии гена OfSAP1, сопровождающее содержание взрослых особей *O. felineus in vitro*, может быть следствием переноса паразитов из желчи в культуральную среду. Состав среды значительно отличается от желчи: культуральная среда не содержит липидов, в то время как желчь почти не содержит глюкозы. Увеличение экспрессии OfSAP1 после содержания червей *in vitro* может указывать на участие продукта этого гена в мобилизации и транспорте запасённых липидов.
3. При инкубации паразитов *in vitro* условия становятся не физиологическими, что приводит к различным изменениям и нарушениям в физиологии и морфологии червей. Для *F. hepatica* показано, что при инкубации *in vitro* не менее 16 часов в ЭСП появляются дополнительные белки (Morphew *et al.*, 2007). По мнению авторов указанной работы, изменение состава ЭСП является следствием увеличения скорости обновления тегумента, индуцированное стрессом, вызванным содержанием вне хозяина. Таким образом, увеличение экспрессии гена OfSAP2 может свидетельствовать о том, что его продукт необходим для обновления тегумента, однако отсутствие корегуляции экспрессии этого гена и генов белков, ассоциированных с транспортом при участии микротрубочек, под действием празиквантела *in vivo* не подтверждает это предположение.

3.5 Возможные функции сапозин В-подобных белков описторхид

SAP1

Ген *SAP1* экспрессируется у взрослых описторхид, при этом экспрессия *OfSAP1* не увеличивается в ответ на празиквантел, но возрастает в условиях *in vitro*, т.е. в среде, не содержащей липидов. Описторхиды не способны синтезировать холестерол и жирные кислоты и получают их от хозяина (Young *et al.*, 2014). Увеличение экспрессии *OfSAP1* после содержания червей *in vitro* в течение 24 часов может указывать на участие продукта этого гена в мобилизации и транспорте депонированных липидов.

SAP2

Ген *SAP2* специфически экспрессируется у взрослых описторхид, и по-видимому, уровень экспрессии очень высок. При этом экспрессия *OfSAP2* увеличивается как в ответ на *PZQ*, так и в ответ на содержание паразита *in vitro*. Мы не обнаружили корегуляцию экспрессии *OfSAP2* и генов, продукты которых вовлечены в транспорт везикул к поверхности тегумента в процессе его обновления, поэтому маловероятно, что белок *SAP2* вовлечен в этот процесс. По-видимому, экспрессия гена *OfSAP2* увеличивается при прекращении поступления пищи в кишечник, а его продукт разрушает клеточные мембраны хозяина для обогащения среды компонентами, которые могут всасываться через тегумент. При питании кровью и клетками эпителия желчных протоков *SAP2* вероятно участвует в разрушении клеточных мембран, поэтому у всех описторхид экспрессия соответствующего гена очень высока. Дальнейшее увеличение экспрессии гена *SAP2* можно объяснить тем, что для внекишечного пищеварения необходимо больше белка, поскольку оно происходит в большем объеме.

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). Возможно, различия в питании отражены в структурных вариациях домена сапозин В в *SAP2 O. viverrini*, описанных в разделе 3.2.1.

SAP3

Мы обнаружили, что у описторхид ген *SAP3* экспрессируется в метацеркариях, но не во взрослых паразитах. Необходимо учитывать, что извлечение метацеркарий из рыбы – это довольно продолжительный процесс (Максимова и др., 2012), при котором может происходить изменение транскрипционного профиля и приближение его к профилю эксцистированных метацеркарий, поэтому мы считаем, что экспрессия *SAP3* может быть присуща именно эксцистированным метацеркариям.

Известно, что эксцистированные метацеркарии (ювенильные мариты) описторхид мигрируют в желчные протоки по внепеченочным желчевыводящим путям, а не через стенку кишечника и паренхиму печени, как ювенильные мариты фасциол. Во время миграции единственным источником питания для них является желчь, и возможно, функция *SAP3* связана с извлечением липидов из желчных мицелл (Young *et al*, 2014).

Альтернативная идея состоит в том, что *SAP3* оказывает бактерицидное и/или иммуномодулирующее действие, пока эксцистированная марита мигрирует в печень. Поскольку паразиты двигаются из кишечника к желчным протокам, целесообразно наличие механизма защиты от бактерий, которые могут проникнуть туда вместе с паразитом.

4 Заключение

В представленной работе исследованы гены, кодирующие сапозин В-подобные белки (SAP) у описторхид. В большинстве случаев функции SAP связывают с разрушением клеточных или бактериальных мембран в процессе питания или для иммунной защиты от микроорганизмов. Однако, для домена сапозин В описаны и другие функции, в частности, участие в слиянии мембран (Wang *et al.*, 2003; Winkelmann *et al.*, 2006), связывание небольших липофильных молекул (Jin *et al.*, 2008; Huta *et al.*, 2016) и образование водорастворимых комплексов с липидами, что необходимо учитывать при выяснении функций новых SAP.

В геномах каждого из трех видов медицински значимых представителей семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini*) обнаружено по три паралога SAP. В транскриптоме *M. orientalis* – четвертого представителя семейства Opisthorchiidae – также обнаружено три паралога SAP, которые вместе с SAP трематод, относящихся к описторхозной триаде, формируют три ортологичные группы, в пределах которых экзон-интронная структура генов консервативна. Филогенетический анализ показал, что увеличение количества и диверсификация паралогов происходили независимо в разных семействах трематод, по-видимому, обеспечивая приспособленность к паразитированию в разных тканях разных хозяев.

Стадиоспецифичность экспрессии генов SAP одинакова у разных видов описторхид: SAP1 и SAP2 экспрессируются у взрослых паразитов, а SAP3 - в метацеркариях или эксцистированных метацеркариях. Транскрипты SAP2 высоко представлены в транскриптомах взрослых описторхид, и превосходят по представленности другие паралоги SAP.

Белки SAP3, специфичные для метацеркарий (или эксцистированных метацеркарий), содержат новый аминокислотный мотив с неизвестной функцией, представляющий собой участок α -спирали из 18 а.о., содержащий 5 остатков тирозина, сгруппированных на одной из сторон спирали.

В условиях *in vivo*, празиквантел вызывает увеличение экспрессии гена SAP2 у взрослых особей *O. felineus*. Однако обработка препаратом *in vitro* показала, что увеличение экспрессии генов SAP1 и SAP2 вероятно связано с содержанием паразитов вне хозяина, которое означает прекращение поступления крови в кишечник паразитов. Основываясь на данных о стадиоспецифичности экспрессии генов SAP описторхид и влиянии празиквантела и содержания паразитов *in vitro* на экспрессию генов SAP *O. felineus*, мы предполагаем, что у описторхид белки SAP1 вовлечены в мобилизацию и транспорт депонированных липидов, а белки SAP2 участвуют в разрушении клеточных мембран в процессе питания. Хотя сам празиквантел не влияет на экспрессию генов SAP у *O. felineus in vivo*, увеличение экспрессии гена OfSAP2 происходит вследствие прекращения кишечного питания, вызванного празиквантелом. Принимая во внимание предполагаемую функцию ортологов SAP2 описторхид, увеличение количества этих белков в просвете желчных протоков может приводить к дополнительному повреждению эпителия желчных протоков. Необходимо прояснение роли белков SAP2, как факторов патогенности.

Примечательно, что все гены SAP описторхид содержат микроэзоны, что повышает вероятность альтернативного сплайсинга, который, по-видимому, обеспечивает дополнительные механизмы посттранскрипционной регуляции их экспрессии, в частности, с помощью нонсенс-опосредованного распада транскриптов SAP или с участием микроРНК.

Данная работа существенно дополняет структурно-функциональные данные о сапозин-подобных белках описторхид, и впервые создает общее системное представление о SAP описторхид, особенностях их структуры и генов и филогенетических связях друг с другом и другими SAP трематод отряда плагиорхид. Тем самым открываются новые перспективы для исследования функций сапозин-подобных белков, для выяснения их роли в паразитизме и патогенном действии 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 α -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 сокращений:

а.о. – аминокислотный остаток;

п.н. – пара нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ЭСП – экскреторно-секреторный продукт;

EST– expressed sequence tag;

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

MRPL16 – митохондриальный рибосомальный белок L16;

NGS – next generation sequencing;

OfSAP – SAP *O. felineus*;

PZQ – празиквантел;

SAP – сапозин В-подобный белок или белок с единственным доменом сапозин В;

SRA – sequence read archive, библиотека прочтений;

SDHB – сукцинатдегидрогеназа железо-серная субъединица (В);

TIF-2 – фактор инициации трансляции 2;

3'-UTR – 3'-untranslated region, 3'-нетранслируемая область.

Список литературы

1. Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г., Николаева Л.В. Лечение описторхоза и клонорхоза: современные подходы, проблемные аспекты и перспективы // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т.19, №.6. – С.14-23.
2. Беэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М.: КМК, 2005. – 336 с.
3. Бражникова Н. А., Цхай В. Ф. Клиника, диагностика и лечение осложнений описторхоза // Анналы хирургической патологии. – 2004. – Т. 9, №. 2. – С. 40–44.
4. Брусенцов И. И., Катохин А. В., Сахаровская З. В., Сазонов А. Э., Огородова Л. М., Федорова О. С., Колчанов Н. А., Мордвинов В. А. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – №.2. – С.10–13.
5. Гинецинская Т. А. Трематоды – их жизненный цикл, биология и экология. – Ленинград: Наука, 1968. – Т 3. – 337 с.
6. Катохин А. В., Кузнецова Т. Н., Омелянчук Н. А., Ран С. О. миРНК – новые регуляторы активности генов у эукариот // Информационный вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10. – № 2. – С.241–272.
7. Катохин А. В., Шеховцов С. В., Konkow S., Юрлова Н. И., Сербина Е. А., Водяницкая С. Н., Фёдоров К. П., Локтев В. Б., Муратов И. В., Ohyama F., Махнёва Т. В., Пельтек С. Е., Мордвинов В. А. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felineus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1- последовательностям // Доклады академии наук. – 2008. – Т.421. – № 4. – С.549–552.
8. Львова М. Н., Дужак Т. Г., Центалович Ю. П., Катохин А. В., Мордвинов В. А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus* // Паразитология. – 2014. – Т.48. – № 3. – С.169–184.
9. Максимова Г.А., Жукова Н.А., Кашина Е.В., Львова М.Н., Катохин А.В.,

- Толстикова Т.Г., Огородова Л.М., Каминский И.П., Сазонов А.Э., Мордвинов В.А. Экспериментальная модель описторхоза на хомяках (*Mesocricetus auratus*) // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 6. – С.59-65.
10. Матвеева М. Ю., Офицеров В. И. Медико-биологические особенности описторхоза: Информационно-методическое пособие. Новосибирск: АО «Вектор-Бест», 2018. – 32 с.
 11. Abath F. G. C., Werkhauser R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: Functional and immunological features // Parasite Immunol. – 1996. – Vol.18. – № 1. – P.15–20.
 12. Ahn V. E., Faull K. F., Whitelegge J. P., Fluharty A. L., Prive G. G. Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2003. – Vol.100. – № 1. – P.38–43.
 13. Anderson D. H., Sawaya M. R., Cascio D., Ernst W., Modlin R., Krensky A., Eisenberg D. Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism // Journal of Molecular Biology. – 2003. – Vol.325. – P.355–365.
 14. Apinhasmit W., Sobhon P. *Opisthorchis viverrini*: effect of praziquantel on the adult tegument // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Heal. – 1996. – Vol.27. – № 2. – P.304–311.
 15. Apinhasmit W., Sobhon P., Saitongdee P., Menayotin S., Upatham E. S. *Opisthorchis viverrini*: Ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes // Int. J. Parasitol. – 1994. – Vol.24. – № 5. – P.613–621.
 16. Apinhasmit W., Sobhon P., Tarasub C., Mothong W., Saitongdee P., Sretarugsa P., Wanichanon C., Upatham E. S. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure and cytochemistry of the glycocalyx of the tegument // J. Helminthol. – 2000. – Vol.74. – № 1. – P.23–29.
 17. Berasaín P., Goñi F., Mcgonigle S., Dowd A., Dalton J. P., Frangione B., Carmona C., Berasain P., Gofii F., Mcgoniglet S., Dowdt A., Daltont J. P., Frangionet B., Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracelullar matrix and basement membrane components // J. Parasitol. – 2015. –

Vol.83. – № 1. – P.1–5.

18. Blair K. L., Bennett J. L., Pax R. A. Praziquantel : physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni* // Parasitology. – 1992. – Vol.104. – P.59–66.
19. Bogitsh B. J., Carter C. E., Oeltmann T. N. Visceral flukes // Human Parasitology. – 2019. – P.175–191.
20. Bracha R., Nuchamowitz Y., Mirelman D. Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica* // J. Biosci. – 2002. – Vol.27. – № 6 SUPPL. 3. – P.579–587.
21. Bruhn H. A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins // Biochem. J. – 2005. – Vol. 389. – P.249–257.
22. Cabán-Hernández K., Espino A. M. Differential expression and localization of saposin-like protein 2 of *Fasciola hepatica* // Acta Trop. – 2013. – Vol.128. – № 3. – P.591–597.
23. Chai J.Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update // Infect Chemother. – 2013. – Vol.45. – №1. – P.32–43.
24. Chaiyadet S., Sotillo J., Smout M., Cantacessi C., Jones M. K., Johnson M. S., Turnbull L., Whitchurch C. B., Potriquet J., Laohaviroj M., Mulvenna J., Brindley P. J., Bethony J. M., Laha T., Sripa B., Loukas A. Carcinogenic liver fluke secretes extracellular vesicles that promote cholangiocytes to adopt a tumorigenic phenotype // J. Infect. Dis. – 2015. – Vol.212. – P.1636–1645.
25. Conrard L., Tyteca D. Regulation of membrane calcium transport proteins by the surrounding lipid environment // Biomolecules – 2019. – Vol.9. – № 10. – 513.
26. Couto F. F. B., Coelho P. M. Z., Araújo N., Kusel J. R., Katz N., Jannotti-passos L. K., Mattos A. C. A. *Schistosoma mansoni* : a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2011. – Vol.106. – № 2. – P.153–157.
27. Cupit P. M., Cunningham C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? // Future Med. Chem. – 2015. – Vol.7. – № 6.

- P.701–705.
28. Dalton J. P., Skelly P., Halton D. W. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths // *Can. J. Zool.* – 2004. – Vol.82. – № 2. – P.211–232.
 29. Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma // *Parasitol. Int.* – 2012. – Vol.61. – № 1. – P.155–161.
 30. Di Maggio L. S., Tirloni L., Pinto A. F. M., Diedrich J. K., Yates J. R., Benavides U., Carmona C., Silva Vaz I. Da, Berasain P. Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: A proteomic study // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol.6. – e32796.
 31. Erko B., Degarege A., Tadesse K., Mathiwos A., Legesse M. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment of schistosomiasis mansoni in schoolchildren in Shesha Kekele Elementary // *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* – 2012. – Vol.2. – № 3. – P.235–239.
 32. Esch G. W. The Transmission of digenetic trematodes: style, elegance, complexity // *Integr. Comp. Biol.* – 2002. – Vol.42. – № 2. – P.304–312.
 33. Espino A. M., Hillyer G. V. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family // *J. Parasitol.* – 2003. – Vol.89. – № 3. – P.545–552.
 34. Espino A. M., Morales A., Delgado B., Rivera F. M., Figueroa O., Suárez E. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct // *Ethn. Dis.* – 2010. – Vol.20. – P.17–23.
 35. Espino A. M., Osuna A., Gil R., Hillyer G. V. *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice // *Exp. Parasitol.* – 2005. – Vol.110. – P.374–383.
 36. Faghiri Z., Camargo S. M. R., Huggel K., Forster I. C., Ndegwa D., Skelly P. J.

- The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ : the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter // PLoS One. – 2010. – Vol.5. – № 5. – e10451
37. Fedorova O. S., Kovshirina Y. V., Kovshirina A. E., Fedotova M. M., Deev I. A., Petrovskiy F. I., Filimonov A. V., Dmitrieva A. I., Kudiyakov L. A., Saltykova I. V., Odermatt P., Ogorodova L. M. *Opisthorchis felinus* infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics // Parasitol. Int. – 2017. – Vol.66. – № 4. – P.365–371.
 38. Figueroa-Santiago O., Delgado B., Espino A. M. *Fasciola hepatica* saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol.70. – № 3. – P.355–361.
 39. Fürst W., Sandhoff K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism // Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab. – 1992. – Vol.1126. – № 1. – P.1–16.
 40. Gao J.F., Gao Y., Qiu J.H., Chang Q.C., Zhang Y., Fang M., Wang C.R. *De novo* assembly and functional annotations of the transcriptome of *Metorchis orientalis* (trematoda: Opisthorchiidae) // Exp Parasitol. – 2018. – Vol.184. – P.90-96.
 41. Garrido-Arandia M., Cuevas-Zuviría B., Díaz-Perales A., Pacios L. F. A comparative study of human saposins // Molecules. – 2018. – Vol.23. – № 2. – P.1–22.
 42. Gobert G. N., Stenzel D. J., McManus D. P., Jones M. K. The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument // Int. J. Parasitol. – 2003. – Vol.33. – № 14. – P.1561–1575.
 43. Gottstein B., Schneeberger M., Boubaker G., Merkle B., Huber C., Spiliotis M., Müller N., Garate T., Doherr M. G. Comparative assessment of ELISAs using recombinant saposin-like protein 2 and recombinant cathepsin L-1 from *Fasciola hepatica* for the serodiagnosis of human fasciolosis // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2014. – Vol.8. – № 6. – P.2–11.
 44. Grams R., Adisakwattana P., Ritthisunthorn N., Eursitthichai V., Vichasri-

- Grams S., Viyanant V. The saposin-like proteins 1, 2, and 3 of *Fasciola gigantica* // Mol. Biochem. Parasitol. – 2006. – Vol.148. – № 2. – P.133–143.
45. Grondin K., Haimeur A., Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Ouellette M. Co-amplification of the γ -glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae* // The EMBO J. – 1997. – Vol.16. – № 11. – P.3057–3065.
46. Gutschmann T., Riekens B., Bruhn H., Wiese A., Seydel U., Leippe M. Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers // Biochemistry. – 2003. – Vol.42. – № 32. – P.9804–9812.
47. Hecht O., Nuland N. A. Van, Schleinkofer K., Dingley A. J., Bruhn H., Leippe M., Grötzinger J. Solution Structure of the Pore-forming Protein of *Entamoeba histolytica* // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol.279. – № 17. – P.17834–17841.
48. Hoti S. L., Subramaniyan K., Das P. K. Detection of codon for amino acid 200 in isotype 1 β -tubulin gene of *Wuchereria bancrofti* isolates, implicated in resistance to benzimidazoles in other nematodes // Acta Trop. – 2003. – Vol.88. – P.77–81.
49. Hu F., Hu X., Ma C., Zhao J., Xu J., Yu X. Molecular characterization of a novel *Clonorchis sinensis* secretory phospholipase A2 and investigation of its potential contribution to hepatic fibrosis // Mol. Biochem. Parasitol. – 2009. – № 167. – P.127–134.
50. Huang Y., Chen W., Wang X., Liu H., Chen Y., Guo L., Luo F., Sun J., Mao Q., Liang P., Xie Z., Zhou C., Tian Y., Lv X., Huang L., Zhou J., Hu Y., Li R., Zhang F., Lei H., Li W., Hu X., Liang C., Xu J., Li X., Yu X. The Carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis*: new assembly, reannotation and analysis of the genome and characterization of tissue transcriptomes // PLoS One. – 2013. – Vol.8. – № 1. –e54732.
51. Huta B. P., Mehlenbacher M. R., Nie Y., Zubieta C., Bou-Abdallah F., Doyle P. The lysosomal protein saposin B binds chloroquine // Chem Med Chem. – 2016. – Vol.11. – № 3. – P.277–282.

52. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Biological agents. Volume 100B. A review of Human carcinogens. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2012. – 475 p.
53. Jefferies J. R., Campbell A. M., Rossum A. J. V., Barrett J., Brophy P. M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* products // Proteomics. – 2001. – Vol.1. – № 9. – P.1128–1132.
54. Jin G., Kubo H., Kashiba M., Horinouchi R., Hasegawa M. Saposin B is a human coenzyme Q10-binding/transfer protein // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2008. – Vol.42. – № March. – P.167–174.
55. Kaewpitoon N., Kaewpitoon S. J., Pengsaa P., Sripa B. *Opisthorchis viverrini*: The carcinogenic human liver fluke // World J. Gastroenterol. – 2008. – Vol.14. – № 5. – P.666–674.
56. Kasinathan R. S., Greenberg R. M. Pharmacology and potential physiological significance of schistosome multidrug resistance transporters // Exp. Parasitol. – 2012. – Vol.132. – № 1. – P.2–6.
57. Keiser J., Utzinger J. The drugs we have and the drugs we need against major helminth infections // Adv. Parasitol. – 2010. – Vol.73. – P.197–230.
58. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. – 2016. – Vol.33. – № 7. – P.1870–1874.
59. Lee J. Y., Cho P. Y., Kim T. Y., Kang S. Y., Song K. Y., Hong S. J. Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – Vol.296. – № 5. – P.1238–1244.
60. Leippe M. Amoebapores // Parasitol. Today. – 1997. – Vol.13. – № 5. – P.178–183.
61. Leippe M., Andrä J., Nickel R., Tannich E., Muller-Eberhard H. J. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes // Mol. Microbiol. – 1994. – Vol.14. – № 5. – P.895–904.

62. Leonova T., Qi X., Bencosme A., Ponce E., Sun Y., Grabowski G. A. Proteolytic processing patterns of prosaposin in insect and mammalian cells // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol.271. – № 29. – P.17312–17320.
63. Lima S. F., Vieira L. Q., Harder A., Kuselj J. R. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni* // *Parasitology.* – 1994. – № 109. – P.57–64.
64. Liu S., Zhou X., Piao X., Hou N., Shen Y., Zou Y., Li S., Cao J., Chen Q. Saposin-like proteins, a multigene family of *Schistosoma* species, are biomarkers for the immunodiagnosis of schistosomiasis japonica // *J. Infect. Dis.* – 2016. – Vol.214. – № 8. – P.1225–1234.
65. Lockart I., Das A., Merrett N. D., Levy M. T. Migration route of Fasciola into the liver // *JGH Open.* – 2018. – Vol.3. – P.89–90.
66. Lvova M. N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A. V., Mordvinov V. A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: An implication of high pathogenicity of the European liver fluke // *Parasitol. Int.* – 2012. – Vol.61. – P.167–172.
67. Lvova M., Zhukova M., Kiseleva E., Mayboroda O., Hensbergen P., Kizilova E., Ogienko A., Besprozvannykh V., Sripa B., Katokhin A., Mordvinov V. Hemozoin is a product of heme detoxification in the gut of the most medically important species of the family Opisthorchiidae // *Int. J. Parasitol.* – 2016. – Vol.46. – № 3. – P.147–156.
68. Maksimova G. A., Pakharukova M. Y., Kashina E. V., Zhukova N. A., Kovner A. V., Lvova M. N., Katokhin A. V., Tolstikova T. G., Mordvinov V. A. Effect of *Opisthorchis felineus* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian hamsters // *Parasitol. Int.* – 2017. – Vol.66. – № 4. – P.458–463.
69. Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Omelchenko M. V., Robertson C. L., Song J. S., Thanki N.,

- Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Zheng C., Bryant S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol.39. – № SUPPL. 1. – P.225–229.
70. Mehennaoui K., Legay S., Serchi T., Guérolde F., Giamberini L., Gutleb A. C., Cambier S. Identification of reference genes for RT-qPCR data normalization in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) // *Nat. Sci. Reports.* – 2018. – Vol.8. – № 1. – P.1–8.
71. Melman S. D., Steinauer M. L., Cunningham C., Kubatko L. S., Ibrahim N., Wynn N. B., Mutuku M. W., Karanja D. M. S., Colley D. G., Carla L., Secor W. E., Mkoji G. M., Loker E. S. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni* // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2009. – Vol.3. – № 8.
72. Messerli S. M., Kasinathan R. S., Morgan W., Spranger S., Greenberg M. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility // *Mol Biochem Parasitol.* – 2009. – Vol.167. – № 1. – P.54–59.
73. Michalek M., Leippe M. Mechanistic insights into the lipid interaction of an ancient saposin-like protein // *Biochemistry.* – 2015. – Vol.54. – № 9. – P.1778–1786.
74. Mordvinov V. A., Ershov N. I., Pirozhkova D. S., Pakharukov Y. V., Pakharukova M. Y. ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felineus* // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2017. – Vol.216. – P.60–68.
75. Mordvinov V. A., Furman D. P. The digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs // *Infect. Disord. - Drug Targets.* – 2012. – Vol.10. – № 5. – P.385–401.
76. Mordvinov V. A., Yurlova N. I., Ogorodova L. M., Katokhin A. V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // *Parasitol. Int.* – 2012. – Vol.61. – № 1. – P.25–31.
77. Morphew R. M., Wright H. A., LaCourse E. J., Woods D. J., Brophy P. M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver

- fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during *in vitro* culture ex host // Mol. Cell. Proteomics. – 2007. – Vol.6. – № 6. – P.963–972.
78. Motta M., Camerini S., Tatti M., Casella M., Torrerri P., Crescenzi M., Tartaglia M., Salvioli R. Gaucher disease due to saposin C deficiency is an inherited lysosomal disease caused by rapidly degraded mutant proteins // Hum. Mol. Genet. – 2014. – Vol.23. – № 21. – P.5814–5826.
79. Munford R. S., Sheppard P. O., O'Hara P. J. Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure // J. Lipid Res. – 1995. – Vol.36. – № 8. – P.1653–1663.
80. Nickless A., Bailis J. M., You Z. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway // Cell Biosci. – 2017. – Vol.7. – № 1. – P.1–12.
81. O'Brien J. S., Carson G. S., Seo H. C., Hiraiwa M., Kishimoto Y. Identification of prosaposin as a neurotrophic factor // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1994. – Vol.91. – № 20. – P.9593–9596.
82. O'Brien J., Kishimoto Y. Saposin proteins: and role in human lysosomal storage disorders // J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. – 1991. – Vol.5. – P.301–308.
83. Oliveira M. F., D'Avila J. C. P., Torres C. R., Oliveira P. L., Tempone A. J., Rumjanek F. D., Braga C. M. S., Silva J. R., Dansa-Petretski M., Oliveira M. A., Souza W. De, Ferreira S. T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni* // Mol. Biochem. Parasitol. – 2000. – Vol.111. – № 1. – P.217–221.
84. Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Pirozhkova D.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. The first comprehensive study of praziquantel effects *in vivo* and *in vitro* on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda) // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2015. – Vol.46. – №1. –:P.94-100.
85. Park S., Gunaratne G. S., Chulkov E. G., Moehring F., Mccusker P., Dosa P. I., Chan J. D., Stucky C. L., Marchant X. J. S. The anthelmintic drug praziquantel activates a schistosome transient receptor potential channel // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol.294. – № 49. – P.18873–18880.
86. Petney T. N., Andrews R. H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P.

- The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* // Int. J. Parasitol. – 2013. – Vol.43. – № 12–13. – P.1031–1046.
87. Pirozhkova D., Katokhin A. Saposin-like proteins in *Opisthorchis felineus* and related opisthorchids // Infect. Genet. Evol. – 2020a. – Vol.78. – P.104132.
88. 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 // Parasitol. Res. – 2020b. – Vol.119. – № 8. – P.2695–2702.
89. Pisciotta J. M., Ponder E. L., Fried B., Sullivan D. Hemozoin formation in *Echinostoma trivolvis* rediae // Int. J. Parasitol. – 2005. – Vol.35. – № 10. – P.1037–1042.
90. 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. – 2016. – Vol.65. – № 1. – P.12–19.
91. Reed M. B., Strugnell R. A., Panaccio M., Spithill T. W. A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica* // Mol. Biochem. Parasitol. – 2000. – Vol.105. – № 2. – P.297–303.
92. Roeder T., Stanisak M., Gelhaus C., Bruchhaus I., Gro J., Leippe M. Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity // Dev. Comp. Immunol. – 2010. – Vol.34. – P.203–209.
93. Sanger F., Nicklen S., Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1977. – Vol.74. – № 12. – P.5463–5467.
94. Sirisinha S., Puengtornwatanakul S., Sobhon P., Saitongdee P., Wongpayabal P., Mitranonde V., Radomyos P., Bunnag D., Harinasuta T. Alterations of the surface tegument of *Opisthorchis viverrini* exposed to praziquantel *in vitro* and *in vivo* // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 1984. – Vol.15. – № 1. – P.95–103.

95. Smout M. J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiprapa S., Jones A., Brindley P. J., Loukas A. A granulin-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells // PLoS Pathog. – 2009. – Vol.5. – № 10.
96. Sobhon P., Apinhasmit W. *Opisthorchis viverrini*: The tegumental cytoskeleton // Int. J. Parasitol. – 1995. – Vol.25. – № 7. – P.787–796.
97. Sotillo J., Pearson M., Potriquet J., Becker L., Pickering D., Mulvenna J., Loukas A. Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates // Int. J. Parasitol. – 2016. – Vol.46. – P.1–5.
98. Soukhathammavong P., Odermatt P., Sayasone S., Vonghachack Y., Vounatsou P., Hatz C. 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. – Vol.11. – № 2. – P.110–118.
99. Sripa B. Pathobiology of opisthorchiasis: an update // Acta Trop. – 2003. – Vol.88. – P.209–220.
100. Suwannatrai A., Saichua P., Haswell M. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini* infection // Adv. Parasitol. – 2018. – Vol.101. – P.41–67.
101. Thomas C. M., Timson D. J. The mechanism of action of praziquantel: can new drugs exploit similar mechanisms? // Curr. Med. Chem. – 2020. – Vol.27. – № 5. – P.676–696.
102. Threadgold L. T. The tegument and associated structures of *Fasciola hepatica* // Quart. J. Micr. Sci. – 1963. – Vol.104. – № 4. – P.1505–512.
103. Toya M., Takeichi M. Organization of non-centrosomal microtubules in epithelial cells // Cell Struct. Funct. – 2016. – Vol.135. – № 41. – P.127–135.
104. Ustianenko D., Weyn-Vanhentenryck S. M., Zhang C. Microexons: discovery, regulation, and function // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. – 2017. – Vol.8. – № 4. – P.1173–1178.
105. Vaccaro A. M., Salvioli R., Tatti M., Ciaffoni F. Saposins and their interaction with lipids // Neurochem. Res. – 1999. – Vol.24. – № 2. – P.307–314.

106. Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J., Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis* // *Genome Biol.* – 2011. – Vol.12. – № 10. – P.R107.
107. Wang Y., Grabowski G. A., Qi X. Phospholipid vesicle fusion induced by saposin C // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol.415. – № 1. – P.43–53.
108. Weerakoon K. G. A. D., Gobert G. N., Cai P., McManus D. P. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol.28. – № 4. – P.939–967.
109. Willis C., Wang C. K., Osman A., Simon A., Pickering D., Mulvenna J., Riboldi-Tunicliffe A., Jones M. K., Loukas A., Hofmann A. Insights into the membrane interactions of the saposin-like proteins Na-SLP-1 and Ac-SLP-1 from human and dog hookworm // *PLoS One.* – 2011. – Vol.6. – № 10.
110. Winkelmann J., Leippe M., Bruhn H. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 2006. – Vol.147. – № 1. – P.85–94.
111. Yoo W. G., Kim D. W., Ju J. W., Cho P. Y., Kim T. I., Cho S. H., Choi S. H., Park H. S., Kim T. S., Hong S. J. Developmental transcriptomic features of the carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis* // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2011. – Vol.5. – № 6. – e1208.
112. Young N. D., Nagarajan N., Lin S. J., Korhonen P. K., Jex A. R., Hall R. S., Safavi-Hemami H., Kaewkong W., Bertrand D., Gao S., Seet Q., Wongkham S., Teh B. T., Wongkham C., Intapan P. M., Maleewong W., Yang X., Hu M., Wang Z., Hofmann A., Sternberg P. W., Tan P., Wang J., Gasser R. B. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol.5. – P.1–11.
113. Zheng M., Hu K., Liu W., Hu X., Hu F., Huang L., Wang P., Hu Y., Huang Y., Li W., Liang C., Yin X., He Q., Yu X. Proteomic analysis of excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: Molecular characterization and serological reactivity of a excretory-secretory antigen-fructose-1,6-

- bisphosphatase // Parasitol. Res. – 2011. – Vol.109. – № 3. – P.737–744.
114. Zheng M., Hu K., Liu W., Li H., Chen J., Yu X. Proteomic analysis of different period excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: Molecular characterization, immunolocalization, and serological reactivity of two excretory secretory antigens - Methionine aminopeptidase 2 and acid // Parasitol. Res. – 2013. – Vol.112. – № 3. – P.1287–1297.
115. Zysset-Burri D. C., Müller N., Beuret C., Heller M., Schürch N., Gottstein B., Wittwer M. Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri* // BMC Genomics. – 2014. – Vol.15. – № 1. – P.1–15.