

На правах рукописи

КОЧНЕВА АЛЬБИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ПРОТЕОМЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЦЕСТОД НА РАЗНЫХ
СТАДИЯХ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА**

1.5.17 – «Паразитология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Петрозаводск – 2022

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии Института биологии — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук" (ИБ КарНЦ РАН).

Научный руководитель: **Смирнов Лев Павлович**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории экологической биохимии Института биологии — обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук" (ИБ КарНЦ РАН)

Официальные оппоненты: **Гранович Андрей Игоревич**
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ)

Извекова Галина Игоревна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук» (ИБВВ РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук» (ФГБУН ИОЭБ СО РАН)

Защита состоится «_____» _____ 2022 г. в _____ часов _____ минут на заседании диссертационного совета 24.1.109.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук» по адресу Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33. Тел/факс: +7(495)952-73-24, e-mail: admin@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: www.sev-in.ru и на сайте ВАК Минобрнауки РФ по адресу: www.vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.б.н.

Татьяна Анатольевна Малютина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ленточные черви — это высокоспециализированная группа организмов, которая представлена облигатными эндопаразитами со сложным жизненным циклом. Хозяевами цестод являются живые организмы из различных систематических групп, значительно отличающихся друг от друга по экологическим, морфофизиологическим и биохимическим признакам, что определяет условия среды 1-го и 2-го порядка паразитов (Koziol et al., 2016; Paludo et al., 2020). Ленточные черви обладают определенной гостальной специфичностью, которая выражается в приуроченности паразита к узкому или широкому кругу хозяев, что отражает их приспособленность к среде 1-го порядка (Куперман, 1973). В основе такой экологической пластичности цестод лежит их способность при переходе на новую стадию онтогенетического развития запускать адаптивные биохимические, физиологические и морфологические механизмы (Жигилева, 2017). В строении ленточных червей можно отметить два основных признака: редукция пищеварительной системы, функции которой у них выполняет тегумент, и усовершенствование половой системы в сторону повышения ее эффективности за счет метамерного строения и процесса стробилиации (Дубинина, 1974). В основе адаптаций цестод к паразитическому образу жизни лежит синтез набора специфических белков, закодированных в их геноме. Изучением белкового состава организма занимается наука протеомика, а совокупность всех белков организма, носит название «протеом». Протеомика паразитических червей в настоящее время стоит фактически в начале своего становления в качестве самостоятельного раздела молекулярной биологии (Кочнева и др., 2018). Молекулярные механизмы реализации адаптационного потенциала гельминтов, направленные на поддержание эффективного процесса паразитирования, на данный момент изучены слабо. Таким образом, представителей класса Ленточные черви можно считать перспективными объектами для исследований биохимических особенностей организмов, ведущих паразитический образ жизни.

Степень разработанности темы исследования. Первые работы по изучению биохимических особенностей паразитических плоских червей появились в середине 20 века. Исследования были посвящены описанию

аминокислотного состава гельминтов и изучению механизмов потребления паразитами питательных веществ и элементов (Arme, Read, 1970; Barrett, 1977; Hopkins, 1950; Lumsden, Berger, 1974; McManus, 1987; Mettrick, Jackson, 1979; Pappas, Schroeder, 1979, Read, 1970). В дальнейшем проводилось изучение функционирования и ультраструктуры систем органов паразитических червей, изучение физиологических и иммунологических аспектов взаимоотношений в системе «паразит-хозяин» (Terenina et al., 1995; Terenina et al., 2020; Малютина и др., 2013; Извекова, 2001; Izvekova et al., 2021; Berger et al., 2020; Bień et al., 2016; Biserova et al., 2014; Kuklina, Kuklin, 2011; Kutyrev et al., 2017; Sako et al., 2001; Sulima et al., 2017; Victor et al., 2012). В последнее десятилетие протеомные методы активно применяются для изучения биохимических особенностей паразитических червей (Cantacessi et al., 2016; Hébert et al., 2017; Monteiro et al., 2017). В лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, где выполнялось диссертационное исследование, проводились работы по установлению роли углеводов, липидов, лизосомальных и других ферментов у гельминтов, выявлению биохимических особенностей паразито-хозяинных отношений (Высоцкая и др., 1973; Высоцкая и др., 2003; Сидоров, Смирнов, 1980; Сидоров и др., 1989; Смирнов и др., 2016; Vysotskaya et al., 2021).

Цель исследования: изучить качественный и количественный состав белков цестод *Triaenophorus nodulosus*, *T. crassus* и *Schistocephalus solidus* в зависимости от стадии онтогенеза и гостальной специфичности паразитов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ состава белков в различных отделах тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*.
2. Охарактеризовать протеомы плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев (окунь *Perca fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L. и налиим *Lota lota* L.).
3. Провести сравнительный анализ протеомов инвазионных плероцеркоидов и взрослых червей *S. solidus*.
4. Описать состав белков в зоне физического контакта паразита *S. solidus* (поверхность тела) и его хозяина - трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. (целомическая полость).

Научная новизна. В данной работе впервые описаны белковые профили паразитических червей рода *Triaenophorus* spp. и *S. solidus*. Выявлена (ранее не изученная) вариабельность протеома цестод *S. solidus*, *T. nodulosus* и *T. crassus* в зависимости от стадии их жизненного цикла и заселяемого хозяина, также описано распределение белков в различных частях тела червей *Triaenophorus* spp. Впервые проведена сборка транскриптома *T. nodulosus* и составлена база предсказанных белков паразита.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в получении новых знаний и представлений о молекулярных и биохимических основах жизнедеятельности паразитических организмов, механизмах компенсаторных реакций, лежащих в основе регуляции и поддержания гомеостаза системы «паразит-хозяин» на организменном и популяционном уровнях организации. Результаты работы включают уникальные сведения о биохимических адаптациях цестод *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* к паразитическому образу жизни. Полученные данные могут быть применены для выявления белков-мишеней при разработке антигельминтных препаратов, для осуществления контроля над эпизоотическим состоянием рыб естественных водоемов и рыбоводных хозяйств, а также могут быть использованы в лекционных курсах по паразитологии, ихтиопатологии, экологической физиологии и биохимии животных.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Протеомы различных отделов тела цестод *T. nodulosus* и *T. crassus* (сколекс, незрелые и зрелые проглоттиды) определяют их функциональную специфичность и характеризуются качественной и количественной вариабельностью по содержанию некоторых структурных белков и ферментов углеводного обмена.

2. Вариабельность состава белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев определяется биохимическим соответствием паразита и хозяина (рыбы), характеризующимся дифференциальной экспрессией тубулинов, G-белка и триозофосфатизомеразы червей.

3. Переход *S. solidus* от стадии инвазионной личинки к взрослому паразиту сопровождается изменениями протеома, направленными на интенсификацию процессов энергообеспечения и белкового анаболизма.

4. Заражение трехиглой колюшки *G. aculeatus* плероцеркоидами *S. solidus* сопровождается повышенной секрецией белков, участвующих в некоторых метаболических процессах, в том числе, в регуляции иммунных и воспалительных реакций, как у хозяина, так и паразита.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач использованы паразитологические и биохимические методы. Видовое определение цестод *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus* sp. проводилось в соответствии с общепринятыми методиками (Дубинина, 1959; Куперман, 1973; Kuchta et al., 2007). Исследование белкового состава цестод выполнено с применением классических протеомных методов (одно- и двумерный электрофорез, 2D-DIGE, масс-спектрометрия MALDI-TOF-TOF MS/MS и LC-MS/MS).

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследования обеспечена использованием достаточного количества образцов для биологических и технических повторов, применением общепринятых современных статистических методов и алгоритмов обработки масс-спектрометрических данных. Все полученные результаты исследования прошли независимое рецензирование при их опубликовании в российских и зарубежных научных изданиях.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования доложены и обсуждены на 8 международных и 1 всероссийской конференциях: Объединенный научный форум Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017); 11-ая Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2018); EuBIC Winter School on proteomics bioinformatics (Зиммеринг, Австрия, 2017); Конференция «Young biologists science Week-2017» (Петрозаводск, 2017); The 1st EuPA School on Practical Proteomics (Сплит, Хорватия, 2017), XII Съезд Гидробиологического общества при РАН (Петрозаводск, 2019); VII Съезд Вавиловского общества

генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 2019); Вторая Всероссийская конференция с международным участием «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (Борок, 2020); 72-я Всероссийская (с международным участием) научная конференция обучающихся и молодых ученых (Петрозаводск, 2020).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, в том числе 9 статей, 4 из которых в изданиях из перечня рецензируемых научных журналов ВАК при Минобрнауки России и 5 в международных изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, 5 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений, списка иллюстративного материала и приложения. Список литературы включает 252 источника, из них 35 отечественные. Диссертация также содержит 11 рисунков и 6 таблиц.

Личный вклад автора. Автор принимал личное участие в экспедиционных работах по сбору материала для исследований. Постановка задач и разработка плана исследований, поиск и обобщение литературных сведений по теме исследования, пробоподготовка, проведение экспериментальных исследований, анализ, обсуждение, интерпретация и обобщение полученных результатов, формулировка выводов выполнены автором лично.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю Заслуженному деятелю науки Республики Карелия, ведущему научному сотруднику лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, доктору биологических наук **Смирнову Льву Павловичу**. Искренне признательна ведущему научному сотруднику лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ИГУ, кандидату биологических наук **Борвинской Екатерине Витальевне** и старшему научному сотруднику лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, кандидату биологических наук **Суховской Ирине Викторовне** за помощь в реализации экспериментальных и экспедиционных работ. Выражаю благодарность **всем**

сотрудникам лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН за постоянную помощь и поддержку. Благодарю за помощь в работе и ценные рекомендации сотрудников кафедры Ихтиологии и Гидробиологии биологического факультета СпбГУ (Лайус Д.Л., Иванов М.В., Иванова Т.С.). Исследования проведены в рамках государственного задания КарНЦ РАН № 0218-2019-0076 и № 0221-2014-0033, и проектов РФФИ № 17-04-01700 и № 19-34-90095.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

В главе дана краткая характеристика молекулярно-генетических особенностей метаболизма представителей класса Ленточные черви. Приведены сведения о вариабельности протеомных профилей у различных видов цестод на разных стадиях онтогенеза. Представлена характеристика белкового состава секреторно-экскреторных продуктов ленточных червей.

2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выбраны псевдофиллидные цестоды *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) и *T. crassus* (Forel, 1868) из семейства Triaenophoridae и *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) из семейства Ligulidae. Жизненный цикл *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* является сложным и включает трех хозяев. Окончательным хозяином для *Triaenophorus* spp. является щука *Esox lucius* L., а для *S. solidus* – водоплавающие рыбаобразные птицы (Дубинина, 1966; Куперман, 1973).

2.2 Секвенирование транскриптома *T. nodulosus*

Плероцеркоиды *T. nodulosus* собраны из цист в печени окуня *Perca fluviatilis* L., взрослые черви - из кишечника щук *E. lucius* L., выловленных в оз. Онежское в 2018 году. Видовое определение паразитов проведено по морфометрии крючьев сколекса (Куперман, 1973; Kuchta et al., 2007). Смесь РНК *T. nodulosus* использовали для приготовления библиотеки спаренных концевых фрагментов с помощью набора РНК TruSeq с полной цепью на секвенаторе HiSeq 400 (Illumina). Сборка *de novo* осуществлялась в программе Trinity v2.4.0 (Haas et al.,

2013). Собранные контиги аннотированы веб-сервисом FunctionAnnotator (Chen et al., 2017). Предсказанный протеом получен с помощью программы TransDecoder v5.5.0 (Haas et al., 2013). Для филогенетического анализа взяты предсказанные белки *T. nodulosus* и всех цестод из базы WormBase и сгруппированы в программе proteinortho (Lechner et al., 2011).

2.3 Анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. crassus* и *T. nodulosus*

Паразиты *T. crassus* и *T. nodulosus* собраны из рыб, выловленных в 2017 и 2019 гг. в оз. Каменное (Заповедник "Костомукшский", Республика Карелия). Взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus* извлекали из кишечника щук *E. lucius* L. Видовое определение паразитов проводили по морфометрии крючьев сколекса (Куперман, 1973). У червей отделяли сколексы (0.3 см с головного конца тела), затем еще 0.8-1 см стробилы после сколекса (незрелые проглоттиды), а затем 0.8-1 см с дистального отдела тела (зрелые проглоттиды). У плероцеркоидов *T. nodulosus* из цист из печени налима *L. lota* L., и у плероцеркоидов *T. crassus* из мышц сига *Coregonus lavaretus* L. также отделяли сколексы (0.3 см с головного отдела тела) и собирали оставшуюся часть стробилы (незрелые проглоттиды). Выделение белков проводили с помощью гомогенизации в лизирующем буфере (2М тиомочевина, 7М мочевины, 4% CHAPS, 30мМ Трис, 1% коктейля ингибиторов протеаз). Концентрацию белка в лизатах измеряли по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Разделение белков проводили методом двумерного электрофореза по технологии 2D-DIGE (Viswanathan et al., 2006). Сравнительный анализ белковых профилей проведен в программе SameSpots (TotalLab). Масс-спектрометрический анализ выполнен на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER с идентификацией белков в программе Mascot по базе данных NCBI, а также на масс-спектрометре Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD, совмещенного с ВЭЖХ системой Agilent 1260 (Agilent Technologies), с идентификацией белков в программах Agilent Mass Hunter Software, Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Agilent Technologies) и Mascot по полученной нами базе предсказанных белков *T. nodulosus* и по базе UniProtKB. Функциональная аннотация белков проведена в программах InterPro, FunctionAnnotator (Chen et al., 2017), Blast2GO (Götz et al., 2008) и QuickGO (Binns et al., 2009). Работа выполнена с использованием

оборудования ЦКП КарНЦ РАН, Ресурсного Центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ и ЦКП ФГБУН Лимнологического института СО РАН.

2.4 Анализ белкового состава плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев

Плероцеркоиды *T. nodulosus* собраны в 2015 и 2016 году из рыб, выловленных в Ладожском (окунь *P. fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L.) и Онежском озерах (налим *L. lota* L.). Видовое определение паразитов проводили по морфометрии крючьев сколекса (Куперман, 1973). Выделение и очистку белков проводили при гомогенизации червей в жидком азоте с последующим осаждением в ТХУ и промывкой осадков этанолом и ацетоном. Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проведено методом двумерного электрофореза по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в системе BioRad Protean II Xi cell. Гели окрашивали раствором Кумасси G-250 и визуализировали в системе MiniLumi (Berthold Technologies). Из гелей вырезали белковые пятна и анализировали на MALDI-времетраплетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия). Идентификацию белков проводили в программе Mascot с поиском по базе NCBI. Сравнительный анализ проводили с помощью пользовательского расширения для ImageJ Software. Для статистической обработки данных использовали t-тест ($p\text{-value} \leq 0.05$). Работа выполнена на базе лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ИГУ, с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН и ЦКП ФГБУН Лимнологического института СО РАН.

2.5 Изучение вариабельности состава протеома *S. solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту

Зараженные особи трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. выловлены летом 2019 года в оз. Машинное (Республика Карелия, Лоухский район, пос. Чкаловский). Червей извлекали из полости тела рыб и промывали в растворе среды RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) с 1% антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich), а затем инкубировали в среде RPMI-1640 (с 0.5% антибиотика-антимикотика и 10% глюкозы) в течение 48 часов при CO₂ 5-10%, 40°C (5 образцов) и 22°C (5 образцов). В качестве контроля отбирали не инкубированных

инвазионных плероцеркоидов (5 образцов). Выделение и очистку белков проводили при гомогенизации червей в жидком азоте с последующим осаждением в ТХУ и промывкой осадков этанолом и ацетоном. Концентрацию белка определяли колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой (Thermo Fisher Scientific) (Smith et al., 1985). Образцы анализировали на ВЭЖХ-системе Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific) сопряженной с масс-спектрометром Orbitrap Q-Exactive HF-X (Thermo Scientific). Идентификация белков проводилась в программе SearchGUI v.3.3.7 (алгоритм X!Tandem, база данных UniprotKB) и PeptideShaker v.1.16.34 (Vaudel et al., 2015). Сравнительный анализ выполнен с использованием пакета «ROTS» для программы R (Suomi et al., 2017). Функциональная аннотация белков проведена в программах InterPro, FunctionAnnotator (Chen et al., 2017), Blast2GO (Götz et al., 2008) и QuickGO (Binns et al., 2009). Работа выполнена с использованием оборудования с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН и ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н.Ореховича.

2.6 Изучение паразито-хозяйинных отношений *S. solidus* и трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*: анализ белкового состава смывов с покровов тела плероцеркоидов и целомической полости рыб

Зараженные и незараженные особи трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* выловлены в 2020 году в оз. Машинное (Республика Карелия, Лоухский р-н, пос. Чкаловский). Червей извлекали из полости тела рыб, взвешивали (отбирали червей весом более 50 мг) и промывали в PBS буфере pH 7.4 (с 1 % коктейля ингибиторов протеаз) 30 секунд-1 минуту для сбора смыва с их поверхности тела. Буфером с коктейлем ингибиторов протеаз промывали полость тела колюшки 3 раза. Смывы из полости тела рыб объединяли со смывами с поверхности тела червей (4 образца). В качестве контроля использовали смывы с полости тела незараженных колюшек (4 образца). Концентрацию белка измеряли колориметрическим методом с бицинхониновой кислотой (Thermo Fisher Scientific) (Smith et al., 1985). Трипсинолиз белков в образцах проводили на фильтрах Microcon devices YM-10. Масс-спектрометрический анализ проводили на ВЭЖХ системе Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific), соединенной с масс-спектрометром Orbitrap Q-Exactive HF-X (Thermo Scientific). Идентификация белков проведена в

программе MaxQuant по базе UniProtKB (для видов *S. solidus* и *G. aculeatus*) (Cox, Mann, 2008). Обработка данных проведена в программе Perseus ver. 1.6.2.3 (Туанова et al., 2016; Välikangas et al., 2018). Сравнительный анализ выполнен с использованием модифицированного t-теста (пакет «limma» для программы R) (Ritchie et al., 2015). Функциональная аннотация белков проводилась в программах InterPro, FunctionAnnotator (Chen et al., 2017), Blast2GO (Götz et al., 2008) и QuickGO (Binns et al., 2009). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН и ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н.Ореховича.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Изучение белкового состава гельминтов *Triaenophorus* spp

3.1.1 Первые данные о составе транскриптома *T. nodulosus*

Для повышения достоверности идентификации белков в образцах *Triaenophorus* spp. проведено секвенирование транскриптома плероцеркоидов и взрослых червей *T. nodulosus* (Kochneva et al., 2019). В результате получены нуклеотидные последовательности РНК-транскриптов и сгенерирована база предполагаемых белков паразита. Среди экспрессируемых *T. nodulosus* белков обнаружены таксон-специфичные формы белков цитоскелета и клеточной адгезии (профилин, спектрин, кальпонин, катенин, кадгерин, интегрин, динеин), тетраспанины, молекулярные шапероны (HSP20, HSP40, HSP70, HSP90, главный антиген яиц р40, эндоплазмин, иммунофилин), протеолитические ферменты (аминопептидазы, кальпаины, катепсины, металлопептидазы, сериновая протеиназа), ингибиторы протеиназ (kunitz-подобный ингибитор протеаз, ингибитор сериновой протеазы, серпин) и антиоксидантные ферменты (глутатион S-трансфераза, супероксиддисмутаза, тиоредоксин, тиоредоксинглутатионредуктаза, тиоредоксинпероксидаза). На основе предсказанного протеома проведен филогенетический анализ, в результате которого показано, что более половины белков *T. nodulosus* не имеют гомологов в протеомах других видов цестод, доступных в базах данных на момент анализа (Lee et al., 2017). Все полученные нами данные загружены в базу данных NCBI BioProject (PRJNA526283). Необработанные чтения размещены в базе данных

NCBI SRA (SRX5509575), а собранные контиги - в базе Transcriptome Shotgun Assembly (GHIF000000000).

3.1.2 Сравнительный анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*

Проведен сравнительный анализ белкового состава различных отделов тела (сколекс, незрелые и зрелые проглоттиды) плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus* (Borvinskaya et al., 2021a). Среди белков, достоверно различающихся по содержанию в различных частях тела паразитов, идентифицировано 11 белков. Многомерный анализ интенсивности окраски белковых пятен на электрофореграммах показал, что неоднородность состава белков *Triaenophorus* spp. главным образом связана с отделом тела, а затем с видовой принадлежностью паразита (Рисунок 1А).

Оба вида *Triaenophorus* spp. характеризовались сниженным содержанием цитоскелетных и двигательных белков (актин, парамиозин, миозин и тропомиозин) в дистальных сегментах стробилы по сравнению со сколексом. В отличие от других структурных белков, содержание β -тубулина снижалось по направлению к дистальному концу стробилы гельминтов (Рисунок 1Б). В зрелых проглоттидах *T. nodulosus* и *T. crassus* было повышено содержание бета-индуцированного фактора роста ig-h3, относящегося к суперсемейству фасциклинов, фермента глутаматдегидрогеназы, предположительно, участвующей в биосинтезе белка при производстве яиц, а также пропионил-КоА-карбоксилазы, которая вовлечена в процесс выработки энергии при неполном расщеплении глюкозы в анаэробных условиях (Pietrzak, Saz, 1981).

При сравнении паттернов белков, синтезируемых на разных стадиях жизненного цикла червей *Triaenophorus* spp., выявлены различия по содержанию двигательных белков парамиозина и тяжелой цепи миозина у плероцеркоидов и взрослых паразитов, что, вероятно, отражает морфологические изменения личинок паразита во время инвазии окончательного хозяина.

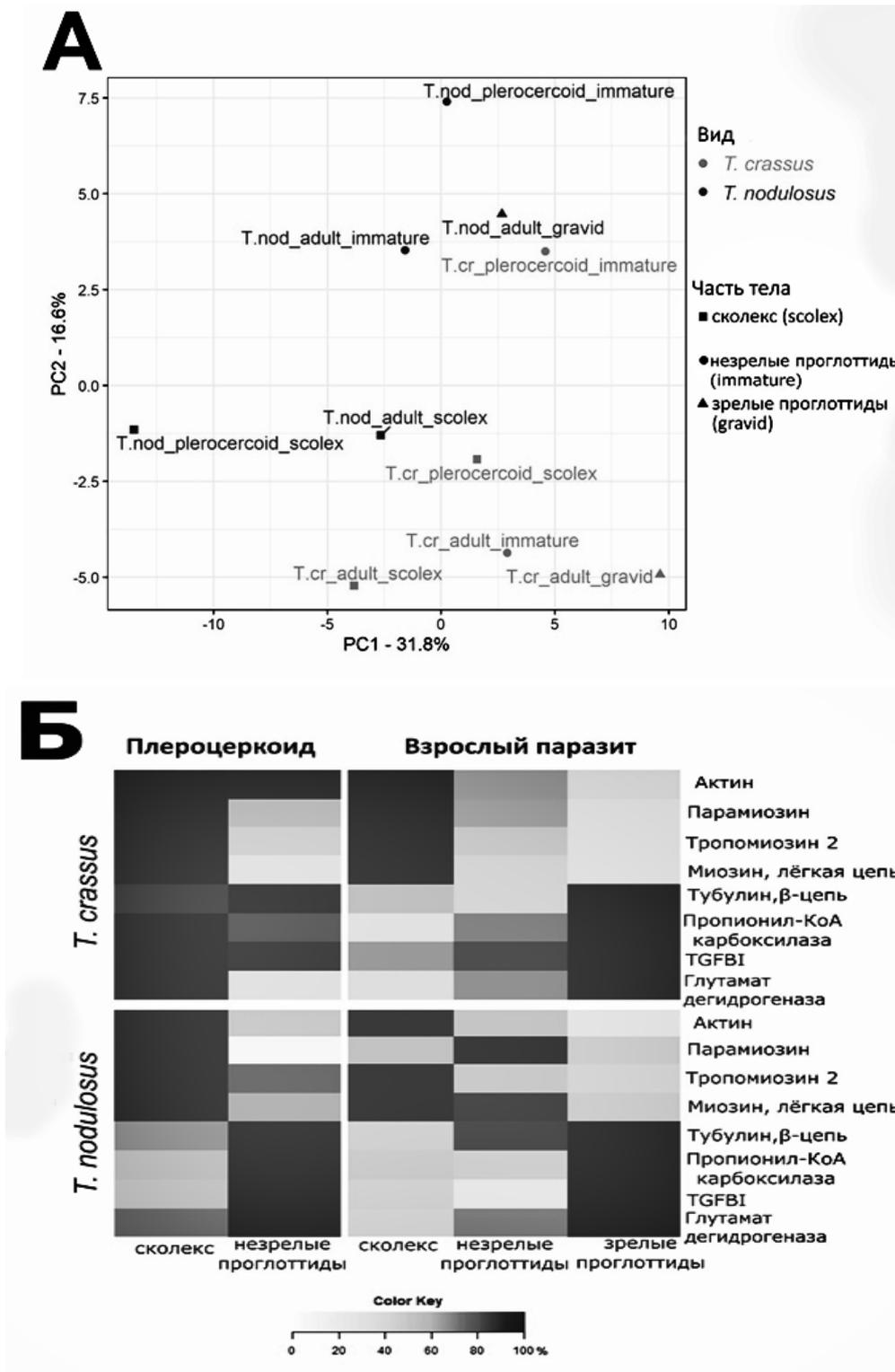


Рисунок 1. Анализ интенсивности окраски белковых пятен на DIGE-электрофореграммах *T. nodulosus* и *T. crassus*. А – Результаты анализа методом главных компонент содержания белков *Triaenophorus* spp. В – Тепловая карта содержания идентифицированных белков *T. nodulosus* и *T. crassus* (в % от самого высокого значения на конкретной жизненной стадии).

Сравнительный анализ паттернов белков плероцеркоидов и зрелых особей *T. crassus* и *T. nodulosus* выявил различия менее чем для 2% белковых пятен. Среди идентифицированных белков, содержание которых значительно варьирует между двумя видами цестод, особое внимание обращает на себя неохарактеризованный белок DN24645_TRINITY. Содержание этого белка в сколексах *T. nodulosus* было равным или даже выше, чем содержание актина, при этом он полностью отсутствует у *T. crassus*. Также показана зависимость уровня синтеза миозина и парамиозина от вида гельминта, что, вероятно, является отражением морфологических различий между двумя видами.

3.1.3 Изучение состава белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев

Сравнительный анализ электрофореграмм белковых профилей плероцеркоидов *T. nodulosus*, полученных из печени трех видов рыб (окунь *P. fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L., налим *L. lota* L.) (окунь, ерш, налим) выявил статистически значимые различия в интенсивности окраски 18 белковых пятен, из которых с помощью масс-спектрометрических методов удалось идентифицировать 5 белков (Рисунок 2) (Кочнева и др., 2018). Плероцеркоиды из трех различных видов рыб различались по содержанию α - и β -тубулина, G-белка и триозофосфатизомеразы, наибольшая концентрация которых наблюдалась у плероцеркоидов из окуня, а наименьшая - у червей из налима.

Снижение содержания 14 из 170 белков личинок *T. nodulosus* из печени налима, по сравнению с плероцеркоидами из других рыб, возможно, отражает различную степень агрессивности среды для червя в разных видах промежуточных хозяев. Однако, помимо влияния биохимического состава тканей хозяина, выявленные различия в протеомах плероцеркоидов, возможно, являются результатом генетических различий между отдельными популяциями паразита. Полученные результаты могут отражать как влияние абиотических факторов среды, так и биохимическую разнокачественность среды, формируемой хозяевами из разных таксономических групп.

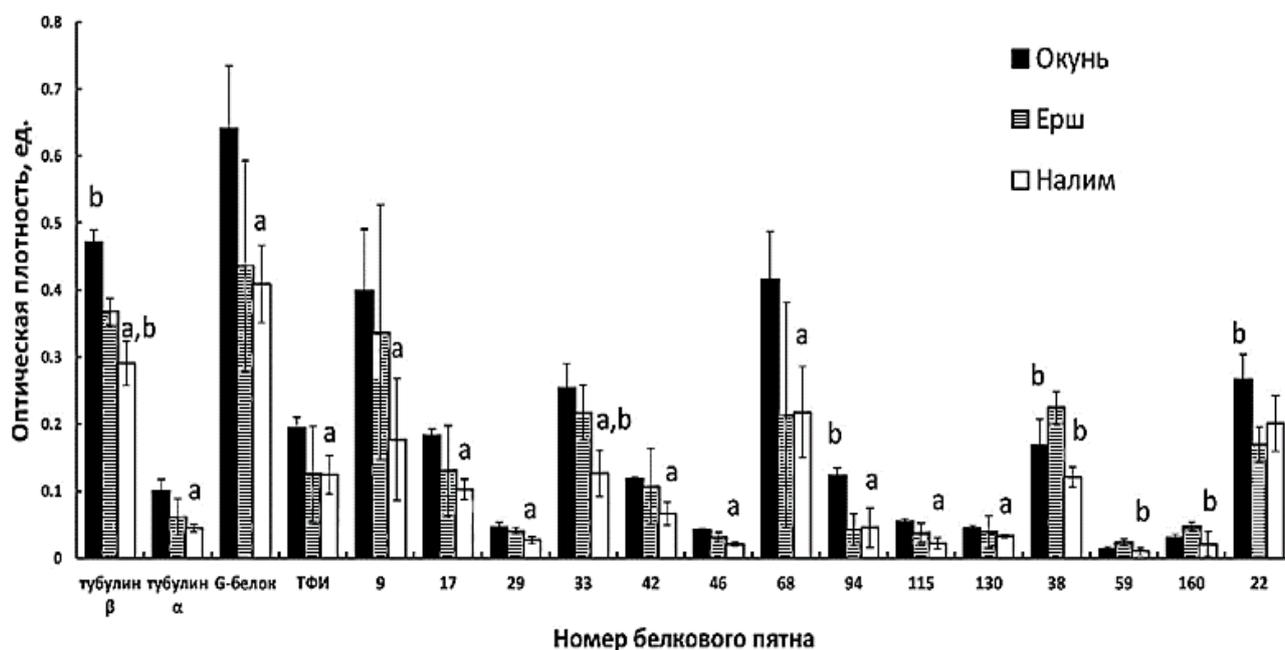


Рисунок 2. Оптическая плотность белковых пятен на 2D-электрофореграммах плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных хозяев, где, а – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из окуня (p-value <0.05), b – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из ерша (p-value <0.05).

3.2 Реорганизация протеома цестоды *S. solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту

С целью изучения адаптивных перестроек метаболизма цестоды *S. solidus*, происходящих в результате термошока при инвазировании окончательного хозяина проведен эксперимент, в котором инвазионные плероцеркоиды созревали до стадии имаго в лабораторных условиях (инкубация 48 часов (до продукции яиц), CO₂ 5-10% и температура 40°C) (Borvinskaya et al., 2021b). Для выявления изменений в протеоме *S. solidus*, вызванных повышением температуры среды, а не сменой ее состава, также выполнена инкубация червей в течение 48 часов при температуре 22°C и CO₂ 5-10% (продукция яиц червями не наблюдалась). В качестве контрольной группы выступали не инкубированные инвазионные плероцеркоиды.

Длительная инкубация червей *S. solidus* при температуре среды 40°C вызвала активные изменения в их протеоме. Содержание 257 белков плероцеркоидов *S. solidus* значительно изменялось после нагревания, из которых синтез 99% белков повышался у зрелых червей. Только два белка, аррестин и неохарактеризованный белок A0A0X3PWQ6, преобладали у не инкубированных плероцеркоидов, по сравнению со взрослыми паразитами.

После длительного нагревания у плероцеркоидов *S. solidus*, повышалось содержание белков, отвечающих за синтез и обмен белков (рибосомные белки, инициаторы трансляции, ингибитор трансляции, факторы терминации трансляции, РНК-геликаза DDX6), ферментов метаболизма аминокислот и регуляторов синтеза белка, а также глутаматдегидрогеназы, ключевого фермента переключения азотно-углеродного обмена. У половозрелых гельминтов наблюдалось повышение содержания ряда ферментов, участвующих в гликолизе и гликогенолизе, таких как гликогенфосфорилаза, альдолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и енолаза. Зрелые черви *S. solidus* также отличались от плероцеркоидов наличием фермента фруктозо-1,6-бисфосфатазы, который отсутствовал в белковых профилях плероцеркоидов. Две из трех изоформ лактатдегидрогеназы, идентифицированные в протеомах *S. solidus*, экспрессировались только у взрослых червей.

3.3 Изучение паразито-хозяйинных отношений плероцеркоидов *S. solidus* и трехиглой колюшки *G. aculeatus*: анализ белкового состава смывов с покровов тела паразита и целомической полости хозяина

Изучен белковый состав смывов с поверхности тела плероцеркоидов *S. solidus* и целомической полости тела зараженных и незараженных колюшек *Gasterosteus aculeatus* для выявления белков, участвующих в поддержании их жизнедеятельности (Kochneva et al., 2021). В результате масс-спектрометрического анализа идентифицированы 215 белков. Контрольные образцы содержали только белки рыб, а в смывах опытной группы обнаружены белки как рыб, так и паразита. Сравнительный полуколичественный анализ выявил достоверные различия между группами образцов по содержанию 20 белков колюшки (Рисунок 3).

В смывах полости тела зараженных рыб наблюдалось повышение содержания белков, которые играют важную роль в процессах свертывания крови, иммунной регуляции, воспалении и фибринолизе (ингибиторы сериновых протеаз (серпины, антитромбин-3, плазминоген, ангиотензин 1-10), цистатины, регулирующие активность цистеиновых протеиназ и компоненты системы комплемента) (Hoffman et al., 1990; Kalle et al., 2013; Fu et al., 2019; Wang et al., 2019).

В образцах, полученных от незараженных рыб, по сравнению с зараженными, повышена экспрессия ферментов, участвующих в энергетических процессах (триозфосфатизомераза, креатинкиназа, фруктоз-бифосфат альдолаза), компонентов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы и пероксиноксин-1), гомоцистеин-связывающего белка, парвальбумина и переносчиков жирных кислот (FABP 3 и FABP 11a).

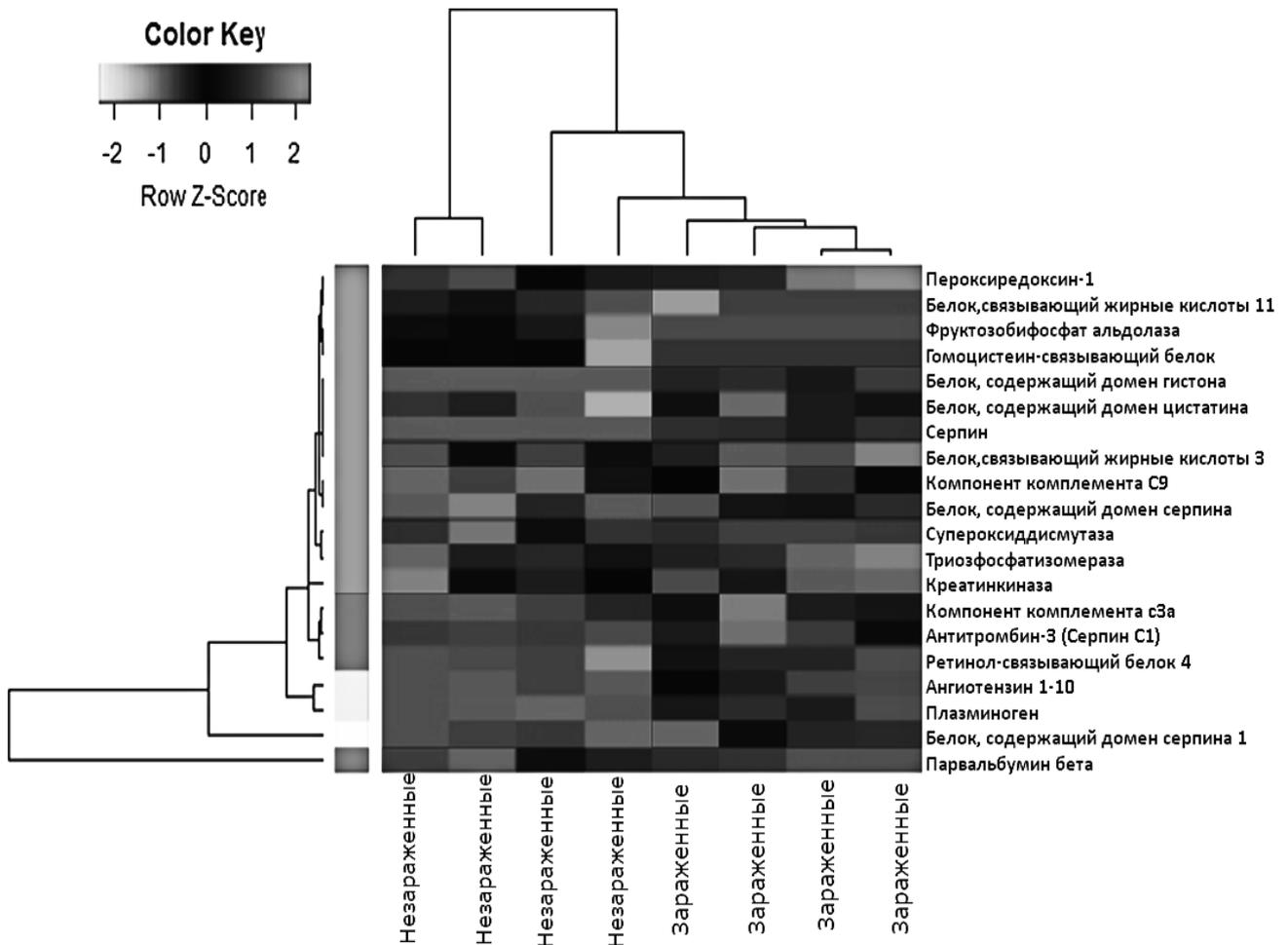


Рисунок 3. Количественные различия в составе белков смывов полости тела особей трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus*, зараженных гельминтом *S. solidus*, и незараженных особей рыб.

В смывах из целомической полости тела рыб и с поверхности паразита обнаружено 30 белков гельминта *S. solidus*. Среди секретируемых паразитом белков идентифицированы малатдегидрогеназы, участвующие в поддержании окислительно-восстановительного баланса в процессе получения энергии из глюкозы, белки, связанные с регулированием иммунных реакций (аннексины, серпины, пептидил-пролил цис-транс изомераза, тирозин протеин фосфатаза H)

и два белка, связывающих жирные кислоты кислоты (Bell et al., 2006; Molehin et al., 2012; Cantacessi et al., 2013; He et al., 2014; Ehsan et al., 2018; Nie et al., 2019).

Таким образом, у рыб *Gasterosteus aculeatus*, зараженных паразитом *S. solidus*, происходит ослабление местных антиоксидантных реакций. Отмечается одновременное снижение содержания белков-переносчиков жирных кислот у рыб и секреция данных белков паразитом. Плероцеркоиды *S. solidus* и особи трехиглой колюшки секретируют разнообразные ингибиторы сериновых протеиназ семейства серпинов, обладающие иммуномодуляторными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые проведено детальное профилирование белков цестод *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* на различных стадиях жизненного цикла. Сколекс, незрелые и зрелые проглоттиды плероцеркоидов и взрослых *T. nodulosus* и *T. crassus* имели различный качественный и количественный белковый состав. Зрелые сегменты стробилы по сравнению со сколексом червей характеризовались снижением содержания цитоскелетных и двигательных белков и повышением содержания глутаматдегидрогеназы и бета-индуцированного фактора роста ig-h3.

При сравнении паттерна белков *T. nodulosus* и *T. crassus*, синтезируемых на различных стадиях их жизненного цикла, выявлены различия в экспрессии парамиозина и тяжелой цепи миозина у плероцеркоидов и взрослых червей, что, вероятно, отражает морфологические изменения в организме паразитов при их развитии в теле дефинитивного хозяина. Среди белков, по содержанию которых различаются белковые профили *T. nodulosus* и *T. crassus*, обращает на себя внимание неохарактеризованный белок DN24645_TRINITY, количественное содержание которого в сколексах плероцеркоидов *T. nodulosus* было равным или выше, чем содержание актина, мажорного белка, наблюдаемого в протеомах гельминтов. При этом белок DN24645_TRINITY полностью отсутствует у червей *T. crassus*.

Плероцеркоиды из трех различных видов вторых промежуточных хозяев (окунь *P. fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L., налим *L. lota* L.) различались по содержанию тубулинов, регуляторного G-белка и фермента углеводного обмена триозофосфатизомеразы.

Протеомы взрослых особей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами характеризовались повышением синтеза белков, участвующих в анаболических процессах. У зрелых червей отмечалось повышение содержания ферментов обмена углеводов, что указывает на активацию метаболизма взрослых червей *S. solidus* из-за необходимости в течение 2-3 дней завершить онтогенетический цикл и преобразовать накопленную личинками энергию в большое количество гамет и яиц. Такая интенсивная реорганизация метаболизма гельминтов также следует и из активации белков, участвующих в обработке генетической информации.

На примере исследования белкового состава смывов с поверхности тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* и целомической полости зараженных и незараженных рыб *Gasterosteus aculeatus* L., показано, что у зараженных рыб повышается содержание белков, которые участвуют в процессах свертывании крови, иммунной регуляции, воспалении и фибринолизе (ингибиторы сериновых протеаз (серпины, антитромбин-3, плазминогена, ангиотензина 1-10), цистатины и компоненты системы комплемента. В смывах с полости тела зараженных особей трехиглой колюшки по сравнению с незараженными выявлено снижение содержания триозфосфатизомеразы, креатинкиназы, фруктозо-бифосфат альдолазы, супероксиддисмутазы, пероксиоксида-1, гомоцистеин-связывающего белка, парвальбумина и переносчиков жирных кислот. Среди белков, секретлируемых плероцеркоидами *S. solidus*, отмечены серпины, пептидил-пролил цис-транс изомераза, тирозин протеинфосфатаза H, аннексин и белки, связывающие жирные кислоты.

Таким образом, выявленные впервые изменения в белковых профилях *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* при смене фаз их онтогенетического развития, свидетельствуют о количественной и качественной вариабельности протеома плероцеркоидов и взрослых особей цестод, и отражает разнокачественность их адаптивных механизмов к изменяющимся факторам среды первого и второго порядков.

ВЫВОДЫ

1. Состав белков различных отделов стробилы плероцеркоидов и взрослых червей *T. nodulosus* и *T. crassus* изменяется от сколекса к зрелым членикам. Содержание цитоскелетных и двигательных белков снижается в дистальных отделах стробилы, что может отражать морфологические изменения в проглоттидах. Зрелая часть стробилы отличается более высоким содержанием бета-индуцированного фактора роста ig-h3, глутаматдегидрогеназы и пропионил-КоА-карбоксилазы, что указывает на интенсификацию процессов образования энергии и синтеза белка.

2. Белковые профили плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев отражают особенности гостальной специфичности паразита. Плероцеркоиды *T. nodulosus*, паразитирующие у окуней, отличаются повышенным содержанием β -тубулина, G-белка и триозофосфатизомеразы по сравнению с гельминтами из других промежуточных хозяев (ерш и налим), что может свидетельствовать о влиянии метаболизма хозяина на количественный состав белков паразита.

3. Установлено, что у зрелых особей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами повышено содержание белков, которые участвуют в метаболических превращениях белков и в генерации энергии на путях катаболизма углеводов.

4. В целомической полости особей трехиглой колюшки *G. aculeatus*, зараженных плероцеркоидами *S. solidus*, обнаружены белки рыб и паразита, участвующие в регуляции иммунных и воспалительных процессов, а также в метаболизме жирных кислот.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Смирнов Л.П., Борвинская Е.В., **Кочнева А.А.**, Суховская И.В. Глутатион-S трансферазы у гельминтов // Труды Карельского научного центра РАН. - 2015. - Т. 11. - С.3–14. DOI: 10.17076/eb213.

2. **Кочнева А.А.**, Борвинская Е.В., Суховская И.В., Иешко Е.П., Смирнов Л.П. Особенности ферментативной активности глутатион S-

трансферазы и уровень восстановленного глутатиона у щуки *Esox lucius* L. и ее облигатного паразита цестоды *Triaenophorus nodulosus* // Труды Карельского научного центра РАН. - 2016. - Т. 11. - С.48–56. DOI: 10.17076/eb429.

3. **Кочнева А.А.**, Смирнов Л.П., Борвинская Е.В., Бедулина Д.С., Суховская И.В. Протеомные исследования особенностей жизнедеятельности паразитических червей (обзор) // Паразитология. - 2018. - Т. 52. - № 3. - С.177-204.

4. **Кочнева А.А.**, Борвинская Е.В., Бедулина Д.С., Суховская И.В. Сравнение профиля белков плероцеркоидов цестоды *Triaenophorus nodulosus* из различных промежуточных хозяев // Труды Карельского научного центра РАН. - 2018. - Т. 12. - № 1. - С.12. DOI: 10.17076/eb899.

Статьи в изданиях, индексируемых в базах Scopus и WoS:

1. Borvinskaya E.V., Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P., **Kochneva A.A.**, Parshukov A.N., Krupnova M.Y., Buoy E.A., Vysotskaya R.U., Churova M.V. The effect of *Triaenophorus nodulosus* (cestoda: Bothriocephalidea) infection on some biochemical parameters of the liver of *Perca fluviatilis* // Journal of Parasitic Diseases. - 2019. - Vol. 43. - N 4. - P. 566-574. DOI: 10.1007/s12639-019-01128-0.

2. **Kochneva A.**, Borvinskaya E., Drozdova P. The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (cestoda: bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish // Marine Genomics. - 2019. - Vol. 51. - P.100702. DOI: 10.1016/j.margen.2019.100702.

3. **Kochneva A.**, Borvinskaya E., Smirnov L. Zone of interaction between the parasite and the host: protein profile of the body cavity fluid of *Gasterosteus aculeatus* L. infected with the cestode *Schistocephalus solidus* (Muller, 1776) // Acta Parasit. - 2021. - Vol. 66. - P.569–583. DOI: 10.1007/s11686-020-00318-8.

4. Borvinskaya, E.V. Temperature-induced reorganisation of *Schistocephalus solidus* (Cestoda) proteome during the transition to the warm-blooded host / E.V.Borvinskaya, **A.A.Kochneva**, P.B.Drozdova, O.V.Balan, V.G.Zgoda // Biol Open. - 2021. - Vol. 10. - N 11. - P.bio058719. DOI: 10.1242/bio.058719.

5. Borvinskaya E., **Kochneva A.**, Bedulina D., Sukhovskaya I., Smirnov L., Babkina I. Comparative analysis of proteins of functionally different body parts of the fish parasites *Triaenophorus nodulosus* and *Triaenophorus crassus* // Acta Parasit. - 2021. - Vol. 66. - P.1137–1150. DOI: 10.1007/s11686-021-00384-6.

Тезисы конференций:

1. **Кочнева А.А.**, Борвинская Е.В., Бедулина Д.С., Бадуев Б.К., Федорова Г.А. Изучение белков цестоды *Triaenophorus nodulosus* на разных этапах жизненного цикла гельминта // Acta Naturae, спецвыпуск: Научные труды объединенного научного форума Международной научной конференции по биоорганической химии "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова", VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва: ИБХ РАН, 18-22 сентября 2017 года. - М: «Перо», 2017. - С.33. режим доступа: <https://yadi.sk/i/m4KO1xAf3Ngx3q>
2. **Kochneva A.**, Borvinskaya E., Bedulina D. The study of protein composition of *Triaenophorus* sp. at different stages of the life cycle and in different body segments // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018) : The Eleventh International Conference, Novosibirsk, 20–25 августа 2018 года. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – P. 108. – DOI 10.18699/BGRSSB-2018-081.
3. **Кочнева А.А.**, Борвинская Е.В., Бедулина Д.С., Дроздова П.Б. Влияние кратковременной инкубации при 40 °С на спектр белков плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* // XII Съезд Гидробиологического общества при РАН : тезисы докладов, Петрозаводск, 16–20 сентября 2019 года. – Петрозаводск: Карельский научный центр Российской академии наук, 2019. – С. 259-261.
4. **Кочнева А.А.**, Борвинская Е.В., Бедулина Д.С. Изменения белкового профиля плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* после кратковременной инкубации при 40° С // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы: Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – С. 716.
5. **Кочнева А.А.** Изменчивость протеома (в т.ч. предсказанного секретома) плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* в условиях экспериментального моделирования изменений температурного режима паразита при смене хозяина // Научно-исследовательская работа обучающихся и молодых ученых: материалы 72-й Всероссийской (с международным участием)

научной конференции обучающихся и молодых ученых, Петрозаводск, 09–29 апреля 2020 года – Петрозаводск: Петрозаводский государственный университет, 2020. – С. 45-48.