

УДК 577.112.083

**ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ
ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ЧЕРВЕЙ**

© А. А. Кочнева,^{1*} Е. В. Борвинская,^{1, 2} Д. С. Бедулина,²
Л. П. Смирнов,¹ И. В. Суховская¹

¹ Институт биологии — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук»

² НИИ биологии, Иркутский государственный университет

* E-mail: kochnevaalbina@gmail.com

Поступила 19.02.2018

Исследование состава белков (протеома) гельминтов имеет фундаментальное и прикладное значение, так как способствует раскрытию молекулярных механизмов, лежащих в основе жизнедеятельности паразитических организмов и отношений в системе «паразит—хозяин», а также позволяет выявить молекулы, которые могут быть предложены в качестве мишени для создания антигельминтных препаратов. В обзоре собрана доступная информация о составе белков паразитических червей. На основе данных геномного, транскриптомного и протеомного анализа небольшого числа хорошо изученных видов проведено первичное описание основных групп белков паразитов: структурных белков, ферментов углеводного обмена и белков, отвечающих за устойчивость организма к стрессу. Приведены сравнительные исследования состава белков некоторых гельминтов на разных стадиях жизненного цикла и описаны белки, характерные для личинок и половозрелых особей паразитов. Отдельно обсуждаются работы, посвященные изучению белков, которые паразиты выделяют во внешнюю среду (секретомы). Показано, что в состав белков секретомы входят различные протеолитические ферменты, белки системы детоксикации, сигнальные молекулы и др.

Ключевые слова: протеомика, белки, гельминты, Cestoda, Trematoda, Nematoda.

Паразитизм как образ жизни в той или иной форме встречается у представителей 40 % основных таксономических групп животных. При этом переход к паразитизму в разных таксонах происходил независимо, по меньшей мере 200 раз: это говорит о том, что паразитизм является успешным эволюционным трендом, а не узкой специализацией, приводящей виды в эволюционный тупик (Weinstein, Kuris, 2016). Следование по этому пути означает формирование у паразита в ходе эволюции специфических приспособлений на морфологическом, биохимическом, физиологическом и других уровнях. Эти адаптации направлены на выживание паразита в до-

вольно необычном окружении (во внутренней среде хозяина), для которого характерна высокая концентрация микроэлементов и питательных веществ, молекул с сигнальной и регуляторной активностью, а также агрессивных компонентов защитных систем хозяина.

Среди прочих граней паразитизма как универсального природного явления молекулярный аспект взаимоотношений паразитов и их хозяев является одним из важнейших, так как объясняет множество механизмов, позволяющих паразитам реализовывать их стратегию выживания. Например, на биохимическом уровне происходит коммуникация между паразитом и хозяином. Паразиты секретируют во внешнюю среду огромное количество веществ, которые способствуют инвазии, формируют более комфортное микроокружение, а зачастую могут непосредственно влиять на обмен веществ хозяина. В свою очередь состав белков хозяина в месте локализации гельминта также в значительной мере определяет, как долго будет продолжаться сосуществование двух организмов. По наличию маркеров воспаления можно определить, насколько антагонистическими являются сложившиеся отношения. Многие паразиты способны адсорбировать на своей поверхности белки и гликопротеиды хозяина, используя их для своих нужд или маскируясь от распознавания иммунной системой (Малютина, 2008).

Большинство паразитов имеет сложный жизненный цикл, когда в ходе онтогенеза одна особь сменяет нескольких хозяев, весьма далеких в систематическом отношении и зачастую сильно отличающихся по образу жизни. Такая пластичность возможна благодаря способности паразитов экстренно перестраивать метаболизм под нужды, возникающие при освоении новой среды обитания. В первую очередь такая адаптация реализуется за счет лабильности состава белков паразита, так как именно белки определяют направление путей обмена веществ, а также участвуют в перестройке липидного и углеводного компонентов (Малютина, 2008; Шемарова, 2009; Жигилева, 2017). Также на молекулярном уровне реализуются механизмы защиты паразитов от иммунной системы хозяев, например, через специфический набор белков покровов тела и цисты, а также через синтез белков-иммуносупрессоров.

Изучение паразитизма как природного явления, а также разработка лекарств от паразитарных заболеваний невозможны без изучения молекулярных основ приспособления паразитов к среде обитания. Благодаря разработке новейших молекулярно-генетических методов в последние годы в этой области знаний произошел существенный прорыв. Одной из бурно развивающихся отраслей знаний стала протеомика, в рамках которой изучают данные о профиле белковых молекул (протеоме) у различных паразитов. Существуют сотни тысяч разнообразных белков, каждый из которых представляет собой молекулу с уникальной структурой и функцией и занимает определенное положение в метаболизме каждой клетки организма. Исследования протеома очень важны, так как белки непосредственно участвуют в реализации генетической информации, поддержании жизнедеятельности паразита, и их состав напрямую определяется экологией гельминтов и их хозяев.

В настоящем обзоре приведены данные некоторых исследований в области изучения состава и функций белков, экспрессируемых у организмов,

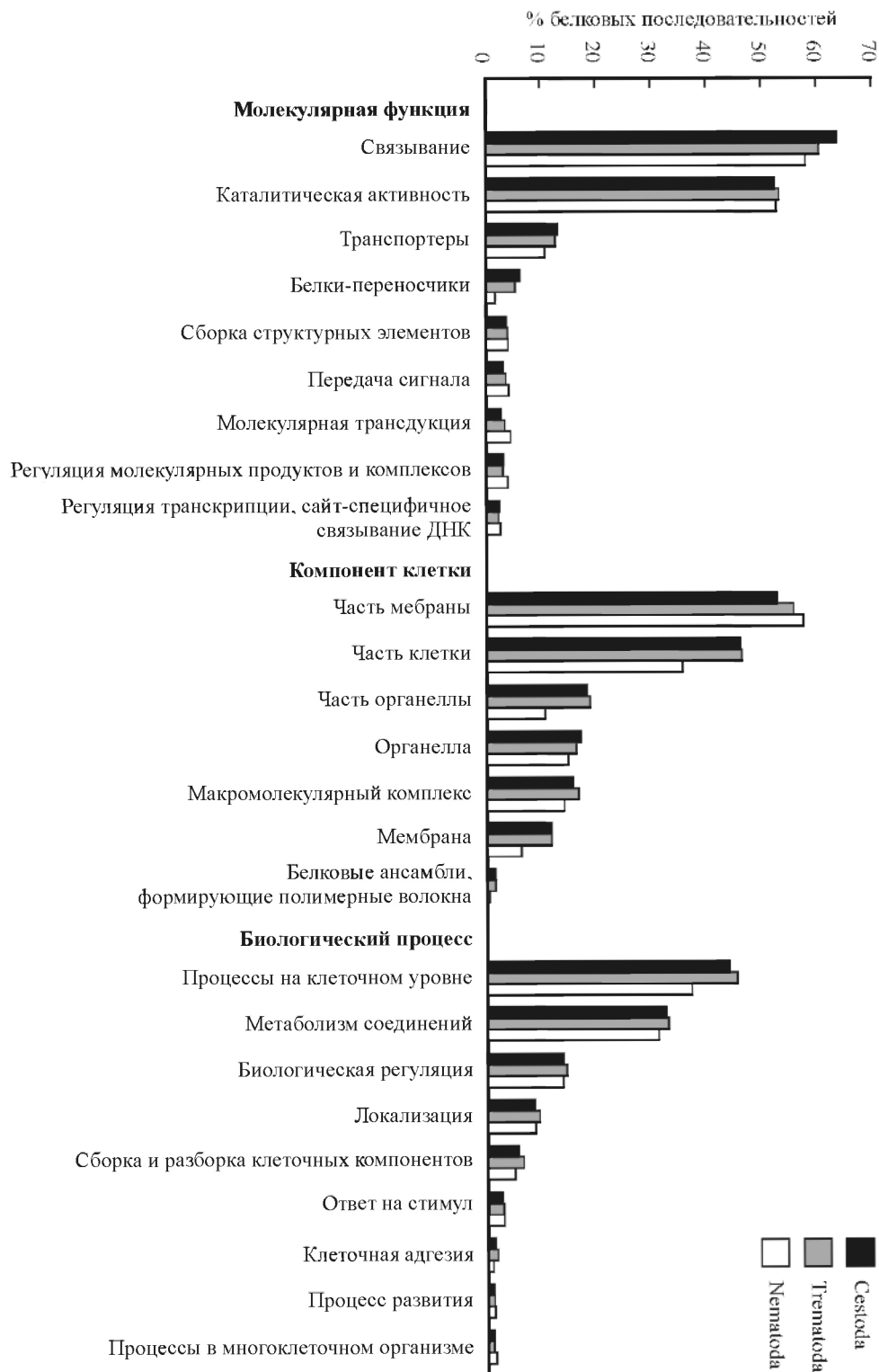
ведущих паразитический образ жизни, — цестод и трематод (тип Platyhelminthes) и нематод (тип Nematoda), паразитирующих у животных. Цестоды и трематоды представляют собой узкоспециализированных, строго облигатных паразитов с древней эволюционной историей в этом качестве. У круглых червей паразитизм независимо возникал около 18 раз, что указывает на то, что представители данного таксона устроены так, что представителям данного типа требуется минимальное количество эволюционных шагов для освоения других организмов как среды обитания (Viney, 2017). На легкость такого перехода в обе стороны также указывает наличие свободноживущих форм нематод, ведущих свое происхождение от паразитических предков (Dorris et al., 2002). Представители обоих типов в ходе эволюции приобрели специализированные молекулярные приспособления, которые позволили им освоить в качестве среды обитания многие типы и классы животных и стать успешными паразитами, широко представленными в самых разных экосистемах.

Целью данной работы является систематизация имеющихся сведений о роли различных белков в поддержании жизнедеятельности паразитов и их приспособлении к действию различных факторов среды, а также описание некоторых молекулярных механизмов, с помощью которых паразит и хозяин влияют друг на друга.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕОРЕТИЧЕСКОГО ПРОТЕОМА ПАЗАРИТИЧЕСКИХ ПЛОСКИХ И КРУГЛЫХ ЧЕРВЕЙ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОМА И ТРАНСКРИПТОМА

Результатом внедрения технологий геномики, транскриптомики и протеомики стало накопление очень большого объема данных о молекулярном составе организмов. Однако из-за разного биологического смысла данных, полученных на разных информационных уровнях, а также из-за методических ограничений существующих технических платформ каждая из перечисленных омиксных технологий обеспечивает ценные, но не достаточные для полного понимания сведения о молекулярных механизмах функционирования организмов (Sun et al., 2014). В силу этих ограничений общее системное представление о структуре метаболизма паразитических организмов невозможно без обсуждения данных, полученных с помощью различных подходов.

Если обратиться к одной из крупнейших баз данных (БД) об известных белках UniProt (The UniProt Consortium, 2017), то можно увидеть, что около 95 % известных на данный момент последовательностей белков паразитических червей были получены путем трансляции секвенированных геномов. Анализ генома отличается наибольшей информативностью и дает практически полную информацию о потенциальных возможностях организма в плане производства разных молекул и осуществления биохимических реакций. В подсекции «Proteom» в настоящее время наиболее полную информацию о белках, которые предположительно могут быть экспрессированы различными организмами, можно найти для 10 видов трематод: *Schistosoma mansoni*, *S. margrebowiei*, *S. rodhaini*, *S. haematobium*, *S. matthei*, *S. curassoni*, *Echinostoma caproni*, *Opisthorchis viverrini*,



Clonorchis sinensis, *Trichobilharzia regent* (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=trematoda&sort=score>); 9 видов цестод: *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *H. nana*, *Taenia asiatica*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Hydatigera taeniaeformis*, *Mesocestoides corti* (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=Cestoda&sort=score>) и 28 видов 28 родов нематод, паразитирующих у животных: *Ancylostoma*, *Angiostrongylus*, *Anisakis*, *Ascaris*, *Brugia*, *Dictyocaulus*, *Dracunculus*, *Elaeophora*, *Enterobius*, *Gongylonema*, *Haemonchus*, *Heligmosomoides*, *Heterorhabditis*, *Loa*, *Necator*, *Nippostrongylus*, *Oesophagostomum*, *Onchocerca*, *Parastrongyloides*, *Soboliphyme*, *Steinernema*, *Strongyloides*, *Syphacia*, *Thelazia*, *Toxocara*, *Trichinella*, *Trichuris*, *Wuchereria* (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=nematoda&sort=score>).

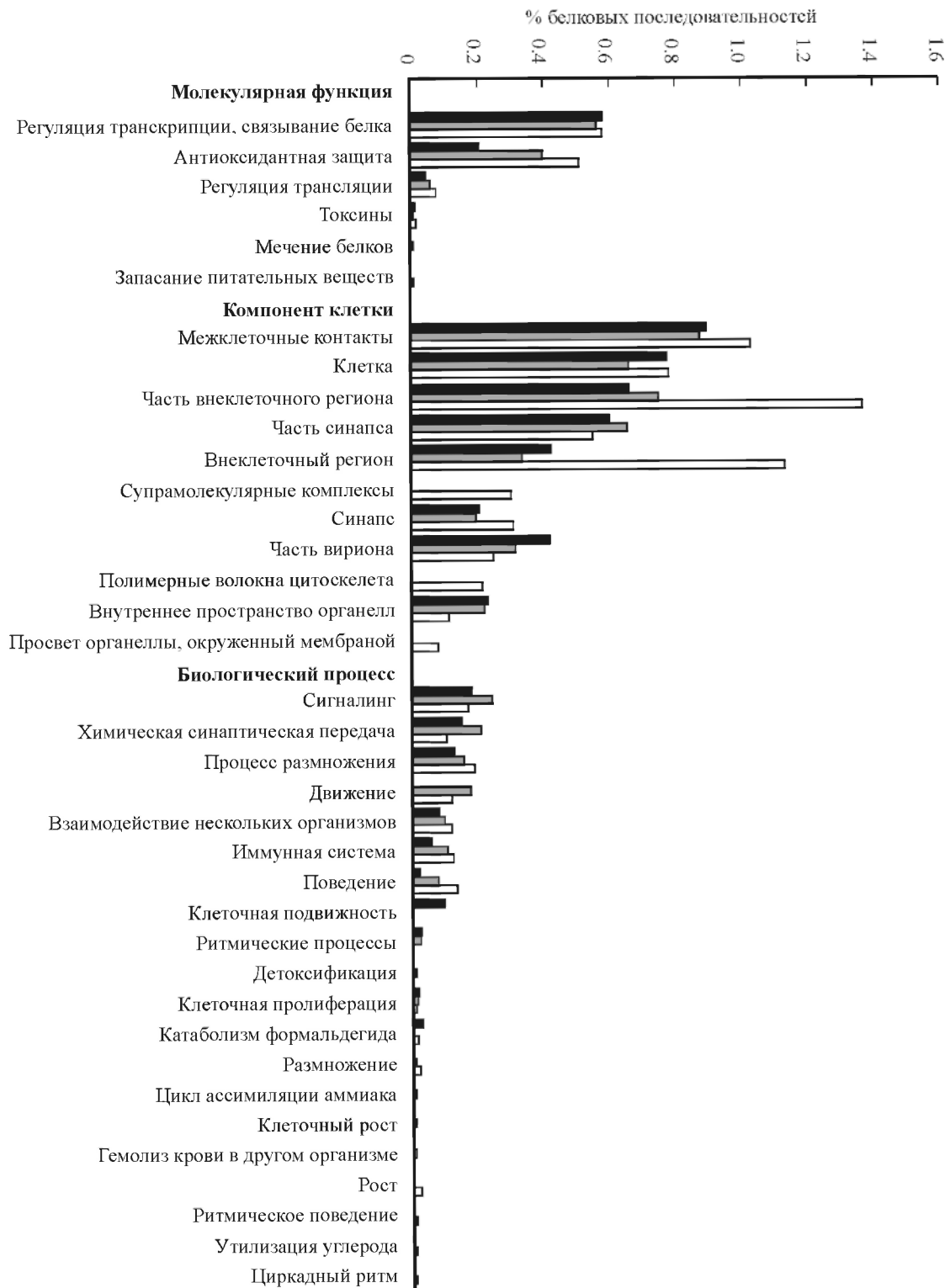
Так как считывание генетической информации жестко регулируется факторами внутренней и внешней среды, в каждый момент времени экспрессируются разные наборы белков. Поэтому актуальная информация о работе тех или иных генов и экспрессии соответствующих белков может быть получена из анализа транскрибируемых последовательностей организма. Современные методы анализа транскриптома очень информативны, и, согласно базе данных UniProt, у паразитических червей реальная транскрипция на уровне мРНК была показана для 4 % всех известных белковых последовательностей.

Рис. 1 и 2 изображают распределение предсказанных (99 %) и экспериментально обнаруженных белковых последовательностей цестод, трематод и паразитических нематод в зависимости от выполняемой функции, локализации и участия в том или ином биологическом процессе, согласно классификатору базы данных Gene Ontology (GO Consortium, 2017). Видно, что подавляющая часть белков (>90 %) принадлежит к нескольким функциональным категориям. При этом распределение этих белков весьма консервативно и в целом совпадает у представителей разных таксонов (рис. 1). Данный паттерн в общих чертах отражает структуру базового метаболизма — набора функций, необходимых для поддержания жизнедеятельности у всех живых организмов. Соответственно разнообразие специализированных белков, например связанных с осуществлением паразитизма, существенно меньше относительно пула белков, составляющих ядро обмена веществ.

Наиболее интересные с точки зрения поддержания паразитического образа жизни группы белков, такие как белки с токсичным действием на другой организм (GO:0090729); запасающие белки, необходимые для накопления поглощенных питательных веществ (GO:0045735); экскретируемые белки, которые могут участвовать в передаче сигнала хозяину и формировании микросреды вокруг червя (GO:0005576, GO:0044421); белки, участ-

Рис. 1. Аннотация генов, кодирующих белки паразитических червей, согласно классификации Gene Ontology (GO Consortium, 2017). Показаны наиболее представленные по количеству белковых последовательностей группы. Сумма может быть больше 100 %, так как многие белки относятся к нескольким категориям.

Fig. 1. Annotation of genes encoding proteins of parasitic worms according to classification Gene Ontology (GO Consortium, 2017). The most represented by the number of protein sequences groups are shown. The sum can be more than 100 %, because many proteins relate to several categories.



вующие в воспроизводстве половых клеток (GO:0022414); сигнальные белки, которые могут принимать участие в регуляции метаболизма хозяина (GO:0099531, GO:0023052); белки регуляции иммунного ответа (GO:0002376); белки защиты от токсинов (GO:0098754) и активных форм кислорода (GO:0031386) и белки гемолиза кровяных клеток (GO:0044179) обычно не превышают 1 % от всего разнообразия тотального теоретического протеома паразитических червей (рис. 2). У представителей разных таксонов также сильнее всего различия протеомов заметны среди наименее представленных по разнообразию белков, что иллюстрирует тот факт, что для узкой специализации требуются лишь незначительные, точечные перестройки метаболизма.

Подробное исследование генома и транскриптома *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *T. solium* и *H. microstoma*, представленное в аналитическом обзоре Тсай и др. (Tsai et al., 2013), дает ценную информацию об особенностях организации обмена веществ у ленточных червей в связи с их узкой специализацией как облигатных паразитов. Общий тренд заключается в эволюционном ослаблении анаболического блока метаболизма (потеря способности синтезировать жирные кислоты, холестерол, аминокислоты и др.) одновременно с увеличением способности поглощать питательные вещества хозяина (например, расширение разнообразия и возникновение новых таксон-специфичных семейств белков-транспортеров жирных кислот). Общее упрощение строения цестод при одновременном повышении пластичности и регенеративных способностей (например, способность эхинококков к неконтролируемой пролиферации и метастазированию) на уровне генома выражается в резком сокращении разнообразия генов, регулирующих морфогенез (homeobox genes) и сильной модификации набора генов роста и пролиферации. Серьезные изменения произошли в метаболических путях детоксикации чужеродных веществ. С одной стороны, все разнообразие цитохромов P450 представлено одним геном, с другой стороны, наблюдается необычайное разнообразие глутатион S-трансфераз класса мю (GST Mu) и возникновение уникального фермента тиоредоксин глутатион редуктазы, совмещающего функции двух белков — глутатион редуктазы и тиоредоксин редуктазы. Эти данные свидетельствуют о сниженной способности ленточных червей окислять ксенобиотики и стероиды, но большом потенциале в плане восстановительных реакций и выведения гидрофобных соединений, что имеет очень большое значение для метаболизма антигельминтных препаратов. Одно из самых заметных расширений произошло в семействе белков теплового шока (шапероны, heat shock proteins — HSP), разнообразие генов которых у цестод в десять раз больше, чем у насекомых и позвоночных. Канонические формы HSP у солитеров экспрессируются конститутивно, тогда как многочисленные бел-

Рис. 2. Аннотация генов, кодирующих белки паразитических червей, согласно классификации Gene Ontology (GO Consortium, 2017). Показаны группы с небольшим разнообразием белковых последовательностей (UniProtKB). Сумма может быть больше 100 %, так как многие белки относятся к нескольким категориям.

Fig. 2. Annotation of genes encoding proteins of parasitic worms according to classification Gene Ontology (GO Consortium, 2017). The groups with a small variety of protein sequences (UniProtKB) are shown. The sum can be more than 100 %, because many proteins relate to several categories.

ки, имеющие уникальные мотивы (и соответственно уникальные функции), экспрессируются в зависимости от условий. В целом у ленточных червей обнаружено около 20 % уникальных генов, со списком которых можно ознакомиться в обзоре (Tsai et al., 2013).

Так как среди нематод широко представлены как свободноживущие, так и паразитические формы, сравнение геномов и транскриптомов червей, ведущих разный образ жизни, является очень информативным подходом для получения сведений о белках, отвечающих за приспособление к паразитизму. Попытка такого анализа была сделана в исследовании Ханта и др. (Hunt et al., 2016), где были обобщены данные секвенирования геномов 5 паразитических нематод — *Strongyloides stercoralis*, *S. ratti*, *S. venezuelensis*, *S. papillosus*, *Parastrongyloides trichosuri* — и свободноживущей нематоды *Rhabditophanes* sp. Было обнаружено, что у паразитических червей значительное расширение разнообразия генов происходит в семействе астацинов (металлопептидазы) и белков SCP/TAPS, а также ацетилхолинэстераз и пролилэндопептидаз. Белки семейства SCP/TAPS оказывают иммуномодуляторный эффект и широко представлены в геномах паразитических нематод из других клад, а также других паразитов, например трематод (Chalmers et al., 2008). Ацетилхолинэстеразы, разнообразие генов которых у исследованных паразитических нематод было в 30—100 раз выше, чем у свободноживущих, участвуют в регуляции мышечных сокращений и, как считается, способствуют удержанию нематод в хозяине. Помимо этого, у паразитических нематод было обнаружено 6 новых, ранее не описанных генных семейств (sgpf) с неизвестной функцией, предположительно кодирующих различные сигнальные пептиды. Функциональный анализ транскриптомов подтверждает, что у паразитических форм нематод преобладает экспрессия генов всевозможных протеолитических ферментов, тогда как у свободноживущих нематод в основном производятся белки, связанные с ростом и базовым обменом. Различные гены протеаз широко представлены в геномах паразитических нематод из других клад и, вероятно, играют фундаментальную роль в паразитизме у круглых червей. Протеазы и пептидазы участвуют в расщеплении и переваривании белков хозяина, внедрении в его ткани и защите от иммунного ответа. Также для паразитических нематод показана повышенная экспрессия транскриптов-подобных белков, группы регуляторных белков, специфичной для круглых червей и участвующей в транспорте гормонов и линьке (Hunt et al., 2016; Ondrovics et al., 2016).

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БЕЛКАХ ГЕЛЬМИНТОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ПРОТЕОМИКИ

Как показано выше, составить предварительное представление о структуре обмена веществ и отследить динамические перестройки отдельных блоков метаболизма возможно уже на уровне анализа транскриптома организма. Этот подход является очень мощным инструментом для изучения экологических закономерностей функционирования биологических систем под действием факторов среды и широко применяется на практике. Однако интерпретировать подобные данные следует с известной долей

осторожности. Практика показывает, что лишь 30—60 % данных о предсказанной перестройке протеома у различных организмов подтверждаются экспериментально на уровне непосредственного обнаружения в пробе тех или иных белков (Sun et al., 2014; Hunt et al., 2016). Такое несоответствие, с одной стороны, объясняется некоторыми ограничениями применяемых методов и, с другой стороны, обусловлено биологическими процессами посттрансляционных модификаций белков в клетке (Ning et al., 2012; Vogel, Marcotte, 2012; Sun et al., 2014). В том числе из-за разного времени жизни мРНК и белков количество продуктов транскрипции слабо коррелирует с количеством соответствующих белков в клетке (Vogel, Marcotte, 2012).

С точки зрения описания реально функционирующих компонентов метаболизма в конкретный момент времени, наибольшую ценность, на наш взгляд, представляют результаты протеомных исследований. Помимо информации о конечных продуктах реализации генетической информации, протеомные исследования позволяют определить содержание отдельных белков в клетке, выделить мажорные и минорные компоненты протеома, а также оценить посттрансляционные изменения белков и детально изучить изоферментный профиль отдельных групп белков. Анализ протеома также может существенно дополнить результаты, полученные молекулярно-генетическими методами у видов, геном которых был секвенирован не полностью (Cui S. J. et al., 2013).

Несмотря на большое значение для изучения молекулярных процессов, происходящих в организме, накопление данных, полученных в протеомных исследованиях, происходит наиболее медленно. Согласно базе данных UniProtKB, экспериментальные доказательства наличия в биологических образцах тех или иных белков (методами масс-спектрометрии, прямого секвенирования по Эдману или иммуноблоттинга) были получены лишь для 5 % белков теоретических протеомов различных организмов. Для всех белков цестод и трематод (классификатор existence: «evidence at protein level») эта величина составляет около 0.05 %. Такой низкий процент, очевидно, связан не столько с недостаточным интересом исследователей к данной области, сколько с относительно низкой чувствительностью применяемых протеомных методов (Sun et al., 2014).

Современные технологии, применяемые в протеомных исследованиях, по-прежнему имеют большое количество ограничений, прежде всего в плане чувствительности и производительности анализа. На этапе разделения белковых смесей методом одно- и двумерного электрофореза получается выделить только белки (обычно 1—2 сотни), концентрация которых в образце достаточна для их визуализации с помощью специфического окрашивания. Кроме того, в ходе электрофореза происходит отсеивание низкомолекулярных и высокомолекулярных фракций, а часть белков может быть потеряна из-за специфических физико-химических свойств. Внедрение методов разделения белков с помощью хроматографии высокого давления в тандеме с масс-спектрометрией позволило существенно снизить потери белка при его разделении на фракции и повысить чувствительность анализа к минорным компонентам пробы. Новейшие методы позволяют уловить и идентифицировать до нескольких тысяч различных белков. Тем не менее, учитывая то, что теоретическое количество белков в протеоме должно быть минимум на порядок выше (Omenn et al., 2016),

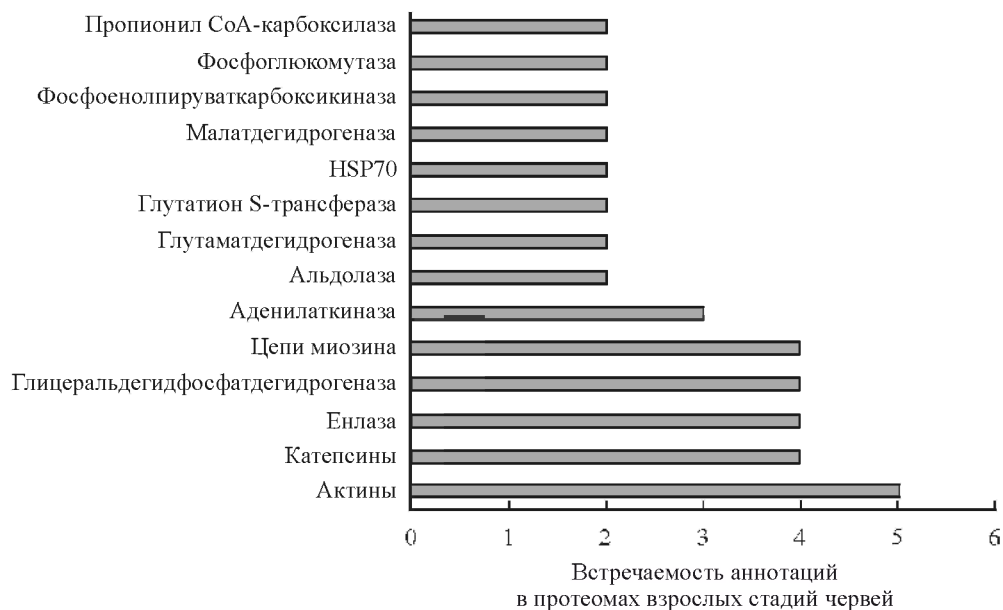


Рис. 3. Наиболее часто встречающиеся идентификации белковых семейств гельминтов у взрослых червей (по результатам анализов, выполненных на видах *Zygocotyle lunata* (Sotillo et al., 2011), *Ascaridia galli* (González-Miguel et al., 2013), *Echinococcus granulosus* (Cui et al., 2013), *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* (Boukli et al., 2011), *Spirometra erinacei* (Kim et al., 2009), *Schistosoma japonicum* (Hong et al., 2013)).

Fig. 3. The most frequently occurring identifications of protein families of helminths in adult worms (according to the results of analyzes performed on the species *Zygocotyle lunata* (Sotillo et al., 2011), *Ascaridia galli* (González-Miguel et al., 2013), *Echinococcus granulosus* (Cui et al., 2013), *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni* (Boukli et al., 2011), *Spirometra erinacei* (Kim et al., 2009), *Schistosoma japonicum* (Hong et al., 2013)).

едва ли можно говорить о том, что существующие методы протеомики приблизились к тому, чтобы полностью охарактеризовать тотальный состав белков того или иного образца. Следует подчеркнуть, что протеомными методами, как правило, обнаруживаются белки, присутствующие в клетках в большой концентрации, т. е. относящиеся к так называемым «мажорным» белкам. Исходя из этого, белки, наличие которых в ткани удалось подтвердить экспериментально, имеют большое значение для функционирования организма, так как на их производство были затрачены значительные энергетические ресурсы.

Подавляющая часть белков гельминтов идентифицирована методами двумерного электрофореза и различных методов масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS/MS, LC-MS), что позволяет предположить, что описанные белки являются наиболее представленными в протеомах.

Интегрированный функциональный анализ имеющихся литературных данных позволяет составить общее представление о преобладающих группах белков в протеомах гельминтов. В целом белковый состав гельминтов соответствует данным полногеномных анализов. В белковом составе взрослых стадий червей наиболее представленными по количеству являются белки цитоскелета и мышечные белки, белки катаболизма глюкозы и энергетического обмена, регуляторные белки. Важную роль в протеоме

играют молекулярные шапероны, белки антиоксидантной системы и протеазы (рис. 3).

Мышечные белки принимают участие в двигательной активности и являются обязательным компонентом протеома взрослых стадий гельминтов. Наиболее часто среди них определяют актин и цепи миозина, в отдельных случаях также определяют тропомиозин, парамиозин, динеин и миофилин (Liu et al., 2006; De la Torre Escudero et al., 2011; Boukli et al., 2011; Sotillo et al., 2012; Cui S. J. et al., 2013). Другим необходимым элементом протеома являются структурные белки цитоскелета, в частности тубулин.

Среди белков, ответственных за энергетический метаболизм, у взрослых стадий гельминтов часто идентифицируют ферменты гликолиза, в особенности енолазу и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), а также альдолазу и 2-фосфо-D-глицератгидролазу. Катаболизм глюкозы является центральным звеном энергетического обмена клетки, и ферменты, задействованные в этом метаболическом пути, присутствуют у большинства организмов. Преобладание в протеомах гельминтов ферментов гликолиза может также косвенно свидетельствовать об интенсификации анаэробного окисления глюкозы, связанного с особенностями образа жизни в теле хозяина. Кроме того, в тканях гельминтов часто идентифицируют белки и других процессов энергетического обмена — глюконеогенеза, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования (фосфоглюкомутаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа (PEPCK) и малатдегидрогеназа (MDH), фумараза, митохондриальный предшественник глутаматдегидрогеназы, НАДН-дегидрогеназа, фосфоглицераткиназа и др.).

Идентификация мажорных белков взрослых стадий паразитических червей позволяет произвести поиск видоспецифичных антигенов для разработки вакцины против паразитарного заражения. Так, показана возможность применения енолазы видов *Streptococcus suis*, *Taenia pisiformis* (Feng et al., 2009; Zhang et al., 2015) и *Ascaris suum* (Chen et al., 2012) в качестве антигена при разработке вакцин (Chen et al., 2012).

К белкам домашнего хозяйства, обычно представленным в протеомах плоских и круглых червей, относятся кальций-связывающие белки, участвующие в регуляции метаболизма (Boukli et al., 2011; Sotillo et al., 2012). У *F. hepatica* и *Shistosoma* sp. показано присутствие в протеоме большого количества иммунофилинов (циклофилинов, пептидил-пролил-цис/транс изомераз), белков с шаперонной активностью, являющихся рецепторами жизненно важного для паразитов сигнального пути (Bell et al., 2006; Liu et al., 2006; De la Torre Escudero et al., 2011). Среди протеолитических ферментов в протеомах гельминтов в большом количестве были идентифицированы катепсины. Препрокатепсин С был идентифицирован у *S. japonicum* (Hong et al., 2013), катепсины L и D — у трематод *F. hepatica* и *S. mansoni* (Boukli et al., 2011), что также соответствует данным, полученным при анализе транскриптомов. Известно, что протеазы необходимы паразитам для проникновения через тканевые барьеры, пищеварения и избегания иммунного ответа хозяина (Boukli et al., 2011). Катепсины и другие протеазы гельминтов часто рассматриваются в качестве высокоэффективных потенциальных целей для разработки новых хемотерапевтических препаратов, вакцин, а также в качестве селективных биомаркеров различных гельминтозов (Perez-Sanchez et al., 2008).

Кроме того, в протеомах гельминтов идентифицировали и другие белки. У имаго нематоды *Ascaridia galli* в составе растворимых белков, помимо наиболее представленных, также присутствуют полипептиды, участвующие в различных процессах метаболизма нуклеотидов и аминокислот и энергетического обеспечения клеток (фосфофруктокиназа, триозофосфат изомеразы, аденилаткиназа, деаминаза, субъединица альфа протеазы протеосомы, гипотетический белок C44B7.10, относящийся к метаболизму ацетилкоэнзима А) (Gonzalez-Miguel et al., 2013). В другой работе в тканях нематод *Syphacia muris*, отобранных из искусственно зараженных лабораторных мышей, также были выявлены структурные белки (тропонин), белки транскрипции и репликации ДНК (РНК и ДНК-полимеразы семейства В), белки трансляции (факторы элонгации CBR-EFT-3.2, фактор элонгации 2, фактор элонгации 1 α), белки-транспортеры, сигнальные белки (Sotillo et al., 2012).

У многих из изученных видов на уровне протеома также часто обнаруживают ряд белков, которые у большинства организмов являются частью универсальной неспецифической системы стресс-ответа. К ним относятся белки антиоксидантной защиты и детоксикации, такие как тиоредоксин, супероксиддисмутаза (SOD), глутатион S-трансферазы (GST), ABC-транспортеры (в протеомах *F. hepatica*, *S. mansoni*, *E. granulosus*) (Boukli et al., 2011; Cui S. J. et al., 2013). Найденная в большом количестве в протеомах и транскриптомах глутатион S-трансфераза участвует в детоксикации и удалении продуктов перекисного окисления. Показано, что этот фермент экскретируется из тегумента, вероятно, для защиты паразита от активных форм кислорода, вырабатываемых иммунными клетками хозяина (Abath, Werkhauser, 1996). Обращает на себя внимание большое разнообразие молекулярных шаперонов у представителей плоских червей и нематод (Benitez et al., 1998; Merckelbach et al., 2003; Liu et al., 2006; Pérez-Sánchez et al., 2008; Smith et al., 2008; Boukli et al., 2011; De la Torre Escudero et al., 2011; Sotillo et al., 2012). Шапероны играют ключевую роль в процессах созревания и деградации белков, способствуя перестройкам метаболизма при изменении условий среды обитания. Данные протеомных исследований согласуются с результатами анализа генома ленточных червей, который отличается большим разнообразием генов этого семейства (Tsai et al., 2013) и свидетельствуют о большом значении этих белков для жизнедеятельности паразитов.

При помощи методов протеомики экспериментально было продемонстрировано не только присутствие консервативных белков, участвующих в обязательных клеточных процессах, но также выявлены белки, вовлеченные в биохимические адаптации имагинальной формы паразита к жизни в теле хозяина. Так, у взрослых трематод *Zygocotyle lunata* в большом количестве был обнаружен миоглобин, белок, который имеет высокое сродство к кислороду (Sotillo et al., 2011). Вероятно, этот полипептид способствует выживанию трематод в условиях гипоксии (Kiger et al., 1998). У нематоды *Ascaridia galli* в протеоме обнаружены полипептиды, участвующие в транспорте и обмене липидов, такие как пропионил КоА-карбоксилаза, липид-связывающий белок, ион-связывающий белок (белок двигательной активности половых клеток MFP2b) (González-Miguel et al., 2013). Последние два белка являются специфичными для представителей круглых чер-

вей. Липид-связывающие белки очень важны для паразитических нематод, так как в условиях недостатка кислорода у них снижены способности самостоятельно окислять липиды. Поэтому высокий уровень содержания липидов, ретиноидов и стероидов, характерный для этих червей, поддерживается за счет активного транспорта из организма хозяина.

Важнейшее значение для успешного паразитирования имеет строение и структура оболочки тела паразита. У плоских червей покровы представлены специфической морфологической структурой — тегументом, выполняющим ряд функций, включающих защиту от иммунного ответа хозяина и поглощение питательных веществ из среды. В работе Лиу и др. (Liu et al., 2006) был проведен подробный анализ состава белков тегумента *S. japonicum*, который показал, что в данной ткани протекают активные метаболические процессы. Помимо структурных и двигательных белков (актин, тубулин, коллаген, парамиозин, тропомиозин, миозин и динеин) и протеолитических ферментов (лейцинаминопептидаза, предшественник катепсина В), в данной ткани обнаружены регуляторные белки (NO-синтаза, 14-3-3 белок, аннексины, презенелин, белки регуляции обмена кальция: кальпаин, кальретикулин, кальцинейрин, остеоонектин), а также белки осморегуляции (Na^+/K^+ -АТФаза). Показано присутствие большого числа шаперонов и шаперонинов, а также белков, участвующих в восстановительных реакциях и обладающих антиоксидантными свойствами и, вероятно, помогающих защищаться от токсинов (тиоредоксин пероксидаза (TRx), SOD). Также идентифицированы некоторые специфические для трематод белки с неизвестной функцией (21.7 кДа антиген, 22.6 кДа антиген, ассоциированный с тегументом, Sm20 антиген).

В доступной литературе представлено мало работ по изучению белкового состава кутикулы паразитических нематод. В исследовании Дженг Цуй и др. (Cui J. et al., 2013) поверхностных белков кутикулы личинок *Trichinella spiralis* удалось идентифицировать сериновые протеазы, участвующие в разрушении белков хозяина и проникновении червей в его ткани, и дезоксирибонуклеазы II — ферменты регуляции иммунного ответа и апоптоза. Функцию еще 10 поверхностных белков *T. spiralis* в данном исследовании не удалось определить. Известно, что основным компонентом кутикулы нематод является структурный белок коллаген, а также кутиклин — белок, специфичный для круглых червей, — и различные гликопротеины. В геноме нематод присутствует более 170 генов, кодирующих коллаген, при этом разные наборы этих генов экспрессируются на разных стадиях жизненного цикла червей (Mitrova et al., 2004). Предполагается, что способность сбрасывать кутикулу во время линьки, одновременно подстраивая покровы к новым условиям обитания при переходе в нового хозяина (в том числе на уровне состава коллагенов), имеет большое значение для успешной инвазии у паразитических нематод (Viney, 2017). Однако экспериментальных данных, подтверждающих разный состав коллагенов при переходе личинок на новую стадию жизненного цикла, пока недостаточно. Во многом это связано с тем, что в большинстве протеомных исследований используют протоколы выделения белков, которые не позволяют эффективно экстрагировать нерастворимые белковые полимеры, такие как коллаген и кератин.

СРАВНЕНИЕ ПРОТЕОМОВ ГЕЛЬМИНТОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

Так как большинство паразитов имеет сложный жизненный цикл, зачастую сопровождающийся сменой хозяина, большой интерес представляет изучение профиля белков, которые экспрессируются при переходе паразита на новую стадию онтогенеза.

Большое количество исследований паразитов человека и животных *Schistosoma* spp. было проведено с использованием высокопроизводительных методов протеомики нового поколения (Liu et al., 2006; Hong et al., 2013; Wang et al., 2016, и др.). Так, всеобъемлющий анализ более чем 400 образцов белков трематоды *S. japonicum*, полученных на разных стадиях жизненного цикла червя, был проведен в работе Лиу и др. (Liu et al., 2006).

Было показано, что в яйцах шистосом, полученных из крови зараженных мышей, в большом количестве экспрессируются белки, участвующие в делении клеток (белок, ассоциированный с микротрубочками, регулятор сигнального каскада рецептора G-белка — RGS2) и эмбриональном развитии (твистер, ноктурнин, белок развития черепно-лицевого отдела I и энхансер TLE3). Только на этой стадии были также обнаружены некоторые белки, ассоциированные с обменом кальция (кальциевый канал высокого напряжения, кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II). Данный белковый профиль может отражать процесс активного созревания внутри яйца следующей стадии развития червя — свободноплавающей личинки мирацидия. К моменту попадания яиц во внешнюю среду внутри в большинстве случаев находятся уже сформированные покоящиеся личинки (Liu et al., 2006). Отдельно в этой работе был исследован состав оболочки яйца. Помимо структурных белков, а также специализированных белков (p48 белок оболочки яйца, p40 главный антиген яйца, 21.7 kDa антиген, SM22.6 антиген), здесь обнаружено много шаперонов, тиоредоксин пероксидаза и другие белки, участвующие в восстановительных реакциях. Это свидетельствует о том, что эта ткань представляет собой биохимический барьер, защищающий личинку от окислительного стресса. В составе оболочки яйца также присутствуют белки, связанные с иммунным ответом (эндоплазмин, иммунофилин, транскрипты, ассоциированные с антигенами главного комплекса гистосовместимости, тромбоцитарный гликопротеин IIIa). Наличие белков, привлекающих иммунные клетки, способствует развитию хронического воспаления и образованию вокруг паразита специфической морфологической структуры — гранулемы. Возможно, стимуляция иммунного ответа может быть полезна гельминту на стадии инцистирования в ткани, так как способствует образованию вокруг него клеток хозяина защитной фибриновой оболочки капсулы.

У недавно вылупившихся мирацидиев *S. japonicum* 45 % белков совпадает с белками яйца, а 237 были обнаружены только на этой стадии (Liu et al., 2006). Предположительно, часть из них (Notch рецепторы, GABA рецепторы, диоксиновые рецепторы и ацетилхолиновые рецепторы) нужны для восприятия свободноплавающей личинкой химических сигналов, в том числе от промежуточного хозяина — улитки. С составом более чем 2000 белков мирацидиев другого вида — *S. mansoni* — можно ознакомиться в работе Ванга и др. (Wang et al., 2016). Среди них, помимо белков базо-

вого обмена, отмечается обилие белков теплового шока и разнообразных гликопротеинов (Wang et al., 2016).

Экспрессия только на стадии церкарии — свободноживущей, активно двигающейся личинки — была показана для 970 белков *S. japonicum*. Среди них был фоточувствительный фермент ДНК-фотолиаза, вероятно, защищающий свободноплавающую личинку от ультрафиолетового излучения. На данной стадии (хотя не только на этой) также экспрессируется большое количество рецепторных белков (куллин 5, диоксиновый рецептор и орфанный рецептор с неизвестной функцией), которые, по мнению авторов работы, могут способствовать обнаружению свободноплавающим паразитом своего хозяина. При этом в протеоме *S. japonicum* не был обнаружен фермент эластаза церкарий, тогда как у *S. mansoni* этот белок вовлечен в проникновение через кожу хозяина. Также уже на стадии спороцисты (в моллюске) и церкарии (свободноплавающая личинка) у *S. japonicum* обнаруживают ряд белков, отвечающих за половую дифференцировку (предполагаемый половой фактор Y (SRY), семенник-определяющий фактор), что говорит о том, что закладка половых признаков у паразита происходит задолго до достижения половой зрелости в окончательном хозяине (Liu et al., 2006).

На стадии печеночной шистосомулы, после проникновения в окончательного хозяина — теплокровное млекопитающее — отмечается повышенное содержание белков, связанных с нейрональным развитием (убиквитинлигаза NEDD4-like, белок-прион взаимодействующий фактор, ядерный переносчик кариоферин, серин/треонин-протеинкиназа BUB1, гистон метилтрансфераза Su (var) 3-9), что, возможно, связано с активной деятельностью паразитов во время их миграции из печени в брызжеечные вены, где в основном пребывают половозрелые особи. Также имеется много ферментов расщепления гемоглобина, необходимых печеночной шистосомуле для питания кровью хозяина (Liu et al., 2006). Сходные результаты получены для 8-дневных шистосомул *S. mansoni* (Hong et al., 2013). На этой стадии было выявлено большое количество белков, участвующих в адаптации к стрессу: белки теплового шока (HSP90), тиоредоксин пероксидаза, а также белков, участвующих в процессах развития и белковом обмене.

Состав конститутивных белков половозрелых стадий *Schistosoma* spp. в общих чертах был описан выше. Однако следует отметить присутствие в протеоме раздельнополых шистосом специфических белков, отвечающих за половое созревание (транскрипционный фактор Fez1, гонадный гистон H2A, белок оболочки яйца). Для самок характерна повышенная экспрессия предполагаемого рибофорина II, внеклеточной супероксиддисмутазы, белка, специфичного для самок 800, а для самцов — белка гинекофорного канала, амидазы, F-box белка.

Большое количество работ посвящено изучению молекулярных основ жизнедеятельности других паразитов человека — представителей рода *Echinococcus*. Подробное описание протеома плероцеркоидов *E. granulosus* и *E. multilocularis* приведено в работах Шу Джан Цуй и др. (Cui S.J. et al., 2013) и Ванга и др. (Wang et al., 2009).

На рис. 4 представлена гистограмма встречаемости различных белков в протеомах личинок обоих видов, обитающих во внутренних органах теп-

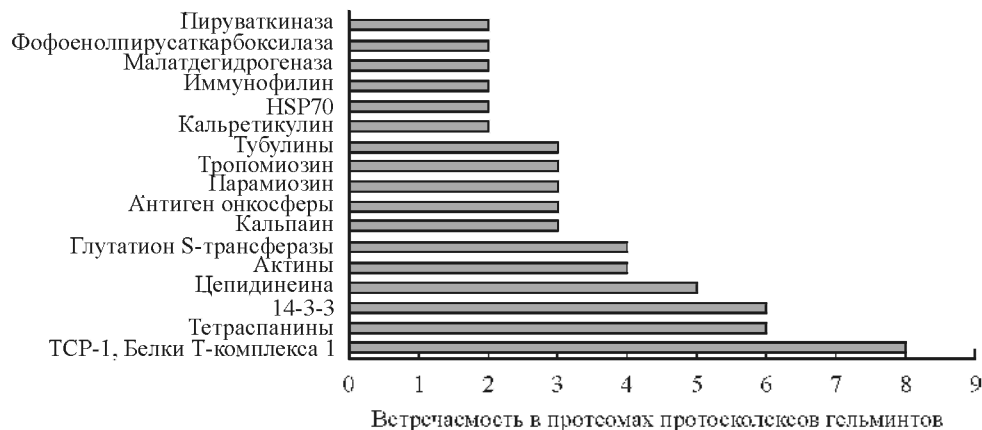


Рис. 4. Наиболее часто встречающиеся белковые семейства в протеомах протосколексов *Echinococcus granulosus* и *E. multilocularis* (по результатам протеомных исследований Cui et al., 2013 и Wang et al., 2009).

Fig. 4. The most frequent protein families proteomes of protoscolexes *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* (according to the results of proteomic studies Cui et al., 2013 and Wang et al., 2009).

локровных млекопитающих. Больше всего (8 различных форм) среди всех идентифицированных белков представлены белки T-комплекса — молекулярные шапероны, ответственные за правильную укладку актина и тубулина (Seo et al., 2010). На втором месте по встречаемости среди идентифицированных белков — тетраспанины, которых было выявлено 6 различных форм. Тетраспанины участвуют во множестве клеточных процессов, включая дифференциацию, адгезию, агрегацию, сигнальные пути (Helmer et al., 2003; Gordón-Alonso et al., 2006; Silvie et al., 2006; Yalaoui et al., 2008), а также вовлечены во множество патогенных процессов (Zoller, 2008). Показано, что тетраспанины вовлечены в процессы развития, созревания и стабильности тегумента и избегания иммунного ответа у трематод (Cai et al., 2008; Tran et al., 2010; Walker, 2011; Piratae et al., 2012; McWilliam et al., 2014).

В целом протеом протосколексов характеризуется обилием структурных белков (парамиозин, тропомиозин, динеин, актин, тубулин, белок тегумента), белков углеводного и энергетического обмена (MDG, PEPCK, фосфофруктокиназа (PFK), пируваткиназа (PyK), GAPDH, енолаза, транскетолаза), регуляторных молекул (регуляторные белки семейства 14-3-3, кальретикулин). Также обнаружен ряд белков, участвующих в ответе на стресс (HSP70, супероксиддисмутаза, GST, TPx), и протеолитические ферменты (катеписин B, кальпаин, сериновая протеиназа 3 (антиген P-29)). Эти белки могут принимать участие в выживании гельминта при стрессе, индуцированном иммунной реакцией хозяина (Vibanco-Pérez et al., 1998; Berggren et al., 2001; Sheehan et al., 2001).

Интересные данные о белковом составе стенок и содержимого цист *E. granulosus* были получены в работе Монтеро и др. (Monteiro et al., 2010). Белки, секретируемые гельминтом в капсулу, включали белки цитоскелета (актин), шапероны, антиоксидантные ферменты (TPx), гистоны

и белки, участвующие в метаболизме (цитратсинтаза). Стенка капсулы содержала актин, белок тегумента EgTeg, параамиозин, кальций-связывающий белок, GST, TPx, ферритин и ферменты энергетического обмена: цитратсинтазу, альдолазу, митохондриальную НАДФ⁺ изоцитратдегидрогеназу, лактатдегидрогеназу (LDH), MDH, орнитинаминотрансферазу, PEPCK, пируватдегидрогеназу (PDG), УДФ-глюкоз-4-эпимеразу. Результаты исследования наглядно демонстрируют, что стенка цисты *E. granulosus* — это не просто «мертвая» оболочка, механически выполняющая барьерную функцию, а метаболически очень активное образование, играющее важную роль в поддержании жизнедеятельности паразита.

Представление о биохимическом взаимодействии между паразитом и его хозяином можно получить при анализе белков хозяина, экстрагирующихся вместе с белками червя. Например, разный набор белков промежуточного хозяина (овца *Ovis aries*, паразит обитает в печени) и окончательного хозяина (собака *Canis lupus familiaris*, паразит находится в кишечнике) был обнаружен в экстрактах *E. granulosus* (Cui S. J. et al., 2013). Белки окончательного хозяина были представлены структурными белками: актином, кератином, гистоновыми белками и некоторыми ферментами метаболизма. При этом не выявлены иммуногенные молекулы, что, как предположили авторы, указывает на слабовыраженное местное воспаление. Среди белков промежуточного хозяина, помимо структурных белков и метаболических ферментов, присутствовали белки воспалительной реакции и апоптоза (иммуноглобулины (IgG), гемоглобин, сывороточный альбумин, дезоксирибонуклеаза 1). Показано присутствие гликогенфосфорилазы хозяина, что может указывать на интенсивное высвобождение глюкозы в непосредственной близости от гельминта и, вероятно, вызвано ее дефицитом в ткани печени из-за потребления паразитом. Наличие компонентов крови хозяина (свиньи *Sus scrofa domesticus*) было показано в экстрактах метацестод свиного цепня *Taenia solium* (иммуноглобулины, гемоглобин, сывороточный альбумин). Помимо этого, цистой поглощались регуляторные и транспортные белки: аденозил гомоцистеиназа, углеродная ангидраза 3, цистеинкиназа типа М, аполипопротеин А-I, транстиретин, гемопексин, трансферин, гаптоглобин, трипсин, альфа-1-антитрипсин, ингибитор эластазы лейкоцитов, интер-альфа-ингибитор трипсина, альфа-2-НС-гликопротеин, протегрин (Victor et al., 2012). Такое изобилие белков с важными для жизнеобеспечения функциями может говорить об активной химической коммуникации между паразитом и его хозяином, возможно, простимулированной сигнальными молекулами паразита.

Наличие специфических метаболических потребностей на разных стадиях жизненного цикла показано на примере еще одной цестоды — *Spirometra erinacei* (Kim et al., 2009). У 8-дневных неполовозрелых особей солитера из кишечника кошки было обнаружено 8 белков, которые отсутствовали на других стадиях жизненного цикла червя (протосколексах из змеи и половозрелых особей из кошки). Большая их часть участвует в метаболизме ДНК и РНК (белок, содержащий цинковый палец, синатаксин, туфтелин-взаимодействующий белок 11 (TFIP11), септин и туфтелин-взаимодействующий белок 1 (STIP-1)), и их экспрессия свидетельствует об активном росте и развитии личинок после проникновения в окончательного хозяина. Присутствие пропионил КоА-карбоксилазы, вовле-

ченной в катаболизм цепей жирных кислот и разветвленных аминокислот, по-видимому, обеспечивает получение энергии для активного роста. Большое содержание структурного белка небулетта, а также повышенное по сравнению с половозрелыми червями содержание миозина и тубулина отражают морфологические перестройки, происходящие во время созревания. По сравнению с половозрелой стадией у личинок также содержится больше белка копина 5, который участвует в развитии нервной системы. Также активные метаболические процессы у личинок сопровождаются синтезом белков, для созревания которых на данной стадии синтезируется молекулярный шаперон (UP3) и иммунофилин. Ряд белков, содержание которых повышено у личинок, участвует в адаптации паразита к обитанию в окончательном хозяине. Среди них предшественник белка, содержащего домен тиоредоксина, выполняющий функцию защиты от активных форм кислорода и аденин-цистеиновая протеиназа, вероятно, задействованная в расщеплении белков хозяина и защите от иммунного ответа.

У нематод в ходе прохождения жизненного цикла не происходит значительных морфологических изменений (метаморфоза), однако имеет место процесс сбрасывания внешнего покрова тела — кутикулы. Значение этого процесса для успешного паразитирования обсуждалось выше. Можно лишь добавить, что у паразитических нематод этот процесс часто синхронизирован с заселением в хозяина или сменой дислокации внутри него и стимулируется химическим окружением внутри хозяина (например, изменением кислотности в желудочно-кишечном тракте, температуры и уровня углекислого газа) (Ondrovics et al., 2016). У нематод, паразитирующих в животных, таких как *Oesophagostomum dentatum*, имеется специфическая адаптация, которая заключается в том, что на стадии инфицирования личинка не до конца сбрасывает старую кутикулу, таким образом окружая себя двойной оболочкой для защиты от агрессивной среды хозяина.

Интересное исследование роли различных белков в процессе линьки у нематод с использованием протеомного подхода представлено в работе Ондровикс и др. (Ondrovics et al., 2016). Исследователи в искусственной среде подавляли линьку *O. dentatum* на стадии, когда личинка в естественных условиях внедряется в слизистую кишечника хозяина. Затем профиль белков личинок, которые не смогли перелинять, сравнивали с профилем белков линяющих личинок. Различия были получены по содержанию 28 белков, синтез 25 из которых был значительно выше у контрольных личинок. Среди них были белки, специфичные для круглых червей и непосредственно участвующие в процессе линьки, такие как транстиретин-подобный белок 5, ингибитор аспартил протеаз, кутиктин. Транстиретин-подобный белок 5 участвует в транспорте гормонов и передаче сигнала, ингибитор аспартил протеаз также является сигнальной молекулой и, в том числе, обладает иммуномодуляторными свойствами, кутиктин является нерастворимыми компонентами кутикулы у нематод и определяют структуру и форму тела червей. У линяющих личинок было повышено содержание циклофилина (иммунофилина), белка с шапероновой активностью, который у нематод задействован в метаболическом пути биосинтеза коллагена — основного компонента кутикулы. Повышенное содержание синтеза структурных и двигательных белков у линяющих личинок (актина, промежуточного белка филамента В, тропомиозина и тропонина)

свидетельствует о роли мышечных сокращений для сбрасывания старой кутикулы. Промежуточный белок филамента В и тропомиозин, кроме того, необходимы для присоединения мускульного мешка к новой кутикуле (Ondrovics et al., 2016).

Значительные изменения у линяющих личинок происходят и в основном обмене веществ. У них значительно повышается синтез ферментов, вовлеченных в энергетический обмен, в особенности обмен углеводов (альдолазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилтрансферазы, 4-гидроксипутират-КоА трансферазы, MDG, пропионил КоА-карбоксилазы, PEPCK и PDG), указывая на то, что линька является очень энергозатратным процессом. Помимо этого повышенным было содержание ряда регуляторных молекул (14-3-3 белок, ингибитор диссоциации гуанозин-нуклеотидов (GDI), рецептор активированной протеинкиназы C1 (RACK-1), анионселективный канал VDAC), которые регулируют жизненно важные клеточные сигнальные пути, в том числе транспорт белков и везикул (Ondrovics et al., 2016).

Также у *O. dentatum* во время линьки сильно повышается производство белков защиты от стресса и иммунного ответа хозяина (ингибитора аспартил протеаз, кальретикулина, HSP-12.6, HSP-60, HSP-70 и пероксиредоксина). Авторы предполагают, что эти белки непосредственно связаны с паразитизмом у *O. dentatum* и усиленно экспрессируются у линяющей личинки, чтобы подавить иммунный ответ хозяина сразу после того, как личинка сбрасывает старую кутикулу и становится более уязвимой (Ondrovics et al., 2016).

Можно заключить, что использование протеомных методов позволило выявить основные тенденции перестроек состава белков организма гельминтов в ходе прохождения жизненного цикла. Наблюдается включение экспрессии белков роста, развития и дифференцировки на стадиях активного роста личинок, рецепторных молекул на стадии свободноплавающих личинок, протеолитических ферментов на стадиях активного внедрения в ткани хозяина и питания его белками. Большое значение для обеспечения жизнедеятельности на разных стадиях жизненного цикла сохраняется у белков с антиоксидантной активностью и всевозможных белков с шапероновой активностью.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ СПЕКТРОВ СЕКРЕТОРНО-ЭКСКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ ГЕЛЬМИНТОВ

В процессе жизнедеятельности паразиты выделяют во внешнюю среду множество биологически активных веществ. Комплекс белков, обнаруживаемых в экскреторно-секреторных продуктах (ЭСП), называется секретомом (Sripa, Kaewkes, 2000). Белки секретома играют важную роль в подавлении иммунного ответа, отвечают за процесс пенетрации в ткани хозяина и даже участвуют в перестройке его метаболизма под собственные нужды (Robinson et al., 2009). Взаимодействие между паразитом и его хозяином происходит на границе соприкосновения двух организмов, на уровне микроокружения паразита, химический состав которого непосредственно определяет состав секретома.

Согласно опубликованным на настоящий момент данным, в секретах гельминтов преобладают протеолитические ферменты, белки метаболизма глюкозы и пластического обмена, структурно-мышечные и регуляторные белки и белки антиоксидантной защиты.

Протеолитические ферменты являются важнейшим компонентом секрета. Первичная функция протеолитических ферментов связана с питанием, так как они способствуют расщеплению и усвоению белков хозяина. Многие протеолитические ферменты оказывают иммуномодулирующее действие и способны защитить червя от иммунного ответа. Также протеолитические ферменты очень важны для успешной инвазии паразитов, так как необходимы для проникновения через тканевые барьеры хозяина. Например, у церкарий *S. japonicum* было обнаружено 46 протеаз, экспрессия 25 из которых прекращалась после проникновения через кожу мыши и перехода на стадию шистосомулы. Для двух из протеиназ *S. japonicum* экспрессия только на стадии церкарии была доказана экспериментально (Liu et al., 2015). У самок нематоды *Strongyloides ratti*, извлеченных из кишечника мышей, по сравнению с червями, выращенными в культуре, в составе секрета было повышенное содержание металлопептидаз астацинов, наряду с иммуномодуляторными белками SCP/TAPS (Hunt et al., 2016). И у паразитирующих, и у живущих в культуре *S. ratti* в составе ЕСП также обнаружено присутствие пролилэндопептидаз. Взрослые нематоды живут в туннелях в слизистой оболочке кишечника, и пептидазы могут использоваться ими для продвижения в плотной среде и переваривания белков хозяина.

В свою очередь гельминтам приходится самим защищаться от действия протеолитических ферментов хозяина. Для этого многие из них секретируют специфические ингибиторы протеиназ, которые защищают их от переваривания пищеварительными соками хозяина или обладают иммуноподавляющим действием (Chen et al., 2017). Таким образом, для осуществления собственной протеолитической активности гельминтам требуются специфичные, уникальные по строению протеиназы, не подверженные действию вырабатываемых ими ингибиторов. Широкий ряд таких протеолитических ферментов представлен серин-, аспарагин-, цистеин- и металлопротеиназами (Dzik et al., 2006). С подробным описанием протеолитических ферментов, известных для паразитических червей, можно ознакомиться в обзоре Торты и др. (Tort et al., 1999). В секретах метацеркарий трематоды *F. hepatica* было показано присутствие как минимум четырех форм протеазы катепсина L (Jefferies et al., 2001), катепсины F и B1, а также цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2 были идентифицированы в секрете мариты трематоды *Opisthorchis felineus* (Львова и др., 2014). В секретах печеночной шистосомулы *Schistosoma japonicum* через 14 дней после заражения окончательного хозяина (кролик) были выявлены белки протеолитической деградации протеин бисульфит-изомераза и субъединицы протеосом (Сао et al., 2015). Многочисленные белки, связанные с протеолизом, были выявлены в составе ЭСП метастод свиного цепня *Taenia solium* (Victor et al., 2012), в частности, протеазы цистеинового типа (катепсин L-подобная цистеин протеаза) и треонинового типа (протеасомная субъединица альфа). Наличие протеолитической активности было установлено у цестод *Triaenophorus nodulosus*, *Eubothrium rugo-*

sum, *Cariophyllaeus laticeps*, *Alcataenia larina* и *Tetrabothrius minor* (Кузьмина и др., 2000; Извекова, Фролова, 2016). Присутствие трех видов сериновых протеиназ было показано в ЭСП взрослых особей нематод *Trichinella spiralis* (Liu et al., 2016), а пептидаза семейства M1 была идентифицирована в ЭСП самок *Ascaris suum* (Geary et al., 2012).

Помимо протеаз, в секретах гельминтов идентифицируют белки углеводного обмена, такие как фруктозо-1,6-дифосфатаза, фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPC), фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза, енолаза, LDH, триозофосфатизомераза, альдегиддегидрогеназа, MDH, глюкозофосфат изомераза, фосфоглицераткиназа, гликозил-гидролаза, альдолаза и другие. В большом количестве идентифицированы транспортные белки (миоглобин, ферритин, белок, связывающий жирные кислоты, гельзолин), кальций-связывающие белки (аннексии, кальций-связывающий белок), актин-связывающие белки, ДНК-связывающие, кислород- и антигенсвязывающие белки (Victor et al., 2012; Chehayeb et al., 2014; Cao et al., 2015). Как уже отмечалось выше, белки транспорта липидов имеют большое значение для обеспечения жизнедеятельности паразитических нематод. В том числе они широко представлены в их секрете. Так, в составе ЭСП самок *Ascaris suum* были обнаружены аллерген АВА-1, связывающий жирные кислоты, и белок BM20, связывающий жирные кислоты и ретинол (Chehayeb et al., 2014), а белок с такими же функциями LL20 15кДА был идентифицирован в секрете *Dirofilaria immitis* (Geary et al., 2012).

В секретах цисты *E. granulosus*, метацестод свиного цепня *Taenia solium*, легочных шистосомул *S. mansoni* и др. было обнаружено наличие структурных и мышечных белков (парамиозин, динеин, тубулин, актин и т. д.), функциональное значение секреции которых не очень понятно (El Ridi, Tallima, 2009; Monteiro et al., 2010; Cao et al., 2015).

Во всех исследуемых секретах гельминтов, как и в экстрактах червей различных стадий, в большом количестве идентифицировали ферменты антиоксидантной системы (изоформы GST, тиоредоксинпероксидаза, тиоредоксин, SOD, глутатионпероксидаза, пероксидазин, пероксиредоксин, ферритин, альдо-кеторедуктаза) и молекулярные шапероны (HSP70, HSP90). Как уже было указано, компоненты этих систем выполняют защитную функцию против иммунной реакции организма хозяина, чем обусловлено присутствие данных белков в секрете (Jefferies et al., 2001; El Ridi, Tallima, 2009; Geary et al., 2012; Cao et al., 2015).

Онтологический анализ состава секрета взрослых особей цестод *Hymenolepis diminuta* (Bien et al., 2016) позволил выявить 39 полипептидов, которые, согласно классификатору системы Gene Ontology, были сгруппированы по молекулярной функции, присутствию в той или иной части клетки и участию в специфических биологических процессах (Bien et al., 2016). По данной классификации 13 из 39 идентифицированных белков ЭСП *H. diminuta* были включены в категорию «клеточная локализация», включающую 7 подкатегорий, из которых наиболее многочисленными были белки в категориях «мембранные» и «базовая структурная и функциональная составляющая клетки». В свою очередь 31 из 39 белков *H. diminuta* по молекулярной функции были разнесены по 14 категориям: оксидоредуктазная активность, гидролазная активность, лиазная активность, пероксидазная активность, транспортные компоненты, кальций-зависимое

связывание фосфолипидов, связывание с малыми молекулами, ионное связывание, связывание коэнзима и других кофакторов, связывание органического циклического соединения, связывание с углеводным производным, связывание гетероциклического соединения, регуляция активности ферментов. По участию в определенном биологическом процессе 26 белков были отнесены к 13 подкатегориям: фосфолипид-транслоцирующая активность АТФаз, реакция на стресс, каталитическая активность, метаболизм азотистых соединений, катаболизм, биосинтез, клеточный метаболизм, первичный метаболизм, клеточный рост, метаболизм органических веществ, биологический процесс, локализация, биологическая регуляция. Большая часть идентифицированных белков, согласно их биологической активности, относится к молекулам с каталитической активностью (22 белка) и белкам метаболизма (17 белков).

Следует отметить, что все компоненты протеома являются первоочередными кандидатами в мишени для создания антигельминтных вакцин, так как представлены на поверхности тела паразита и доступны для распознавания иммунными клетками. Помимо перечисленных выше, в секретах отдельных видов паразитов были идентифицированы и другие белки, которые могут быть хорошими кандидатами при разработке вакцин, диагностики или химиотерапии. Так, в составе секрета мариты трематоды *Opisthorchis felinus* был найден белок Of-HDM (*O. felinus* — helminth defense molecule), который относится к особому семейству защитных молекул, характерных для данного паразита (Львова и др., 2014). В секрете печеночной шистосомулы *S. japonicum* и легочной шистосомулы *S. mansoni* была также идентифицирована АТФаза переходного эндоплазматического ретикулула, ряд белков биологической регуляции (цистатин-В, фактор элонгации 2, 14-3-3 белок) и другие (El Ridi, Tallima, 2009; Cao et al., 2015). В белковом составе ЭСП метацестод свиного цепня *Taenia solium* также определяли полипептиды, участвующие в передаче сигнала (14-3-3 белок, ГТФаза) (Victor et al., 2012).

Что касается секрета представителей круглых червей, то в составе ЭСП самок *Ascaris suum* были обнаружены такие белки, как внеклеточный глобин Glb-1, неописанные гипотетические белки Y75B7AR.1 и ASU_03636, антиген *Brugia malayi* Y Ag1, серпин В, основной белок половых клеток (major sperm protein), виттелогенин-4, белок, участвующий в локомоции сперматозоидов (sperm motility protein MFP2), коллаген альфа-5, лектин типа С, альфа/бета-глюкозидаза agdC, IgG Fc-связывающий белок (Chehayeb et al., 2014). У половозрелых нематод *Dirofilaria immitis* из 110 белков секрета 52 белка имели уникальную структуру, характерную только для данного вида (изоформа глутатион S-трансферазы 1, белок cre-rqp-85, α -актинин, эпоксидгидролаза 1, гомологичный предшественник фактора элонгации tu и т. д.); они тоже могут быть предложены для создания высокоспецифичных вакцин (Geary et al., 2012). У самок *Strongyloides ratti* экскреция ацетилхолинэстеразы и белков семейства sgrp-1 и sgrp-5 с неизвестной функцией была подтверждена на уровне транскриптома и протеома. Необходимым компонентом ЭСП нематод, похоже, являются транстиретин-подобные регуляторные белки, специфичные для круглых червей (Geary et al., 2012; Chehayeb et al., 2014; Hunt et al., 2016).

На основе литературных данных можно сделать вывод, что паразит выбрасывает в окружающие его ткани хозяина огромное количество биологически активных молекул. Среди белков секрета встречаются молекулы, облегчающие питание паразита (ферменты гликолиза и метаболизма жирных кислот, транспортные белки), проникновение в организм хозяина (протеазы), огромное количество защитных белков (антиоксидантные ферменты), иммуномодулирующие полипептиды (семейство HDM), а также белки биологической регуляции, которые, вероятно, как управляют развитием самого червя, так и могут оказывать влияние на его хозяина (цистатины, факторы транскрипции и др.).

ВЫВОДЫ

Протеомика гельминтов в настоящее время стоит фактически в самом начале своего становления как самостоятельного раздела молекулярной биологии. В рамках этой дисциплины можно выделить следующие основные направления, по которым активно ведутся протеомные исследования.

1. Выяснение факторов, определяющих способность паразитов заражать хозяев. Прежде всего, это анализ экскреторно-секреторных белков, включая белки подавления иммунного ответа и апоптоза клеток хозяина. Большое значение для паразитирования имеют белки, связанные с работой разнообразных систем внедрения в организм хозяина.

2. Изучение сигнальных белков, способных «манипулировать» обменом веществ хозяина, и выяснение мишеней, на которые направлено действие секретиремых паразитами белков.

3. Профилирование белков хозяина при заражении паразитом и выяснение антигенных свойств белков паразита для изучения динамики развития паразитарной инфекции и выбора терапии.

4. Установление роли ранее не описанных, уникальных для паразитов белков в процессе заражения и на разных стадиях жизненного цикла.

5. Изучение метаболических перестроек в организме гельминтов на протяжении их жизненного цикла при переходе на новую стадию развития или при заселении нового хозяина и др.

Некоторые изученные детали этих процессов представлены в настоящем обзоре. Применение методов протеомики в совокупности с данными о геноме и транскриптоме паразитических червей позволило пролить свет на молекулярные аспекты адаптаций в системе паразит—хозяин. Имеющиеся данные позволяют создать предварительную модель устройства метаболизма паразитических червей и обозначить основные механизмы, которые позволяют им успешно противостоять арсеналу защитных реакций хозяина. Однако накопление информации в рамках этих направлений только начинается. Получение более подробной картины возможно только при использовании высокопроизводительных методов протеомики нового поколения и значительном расширении спектра изучаемых видов паразитов и их хозяев. Существенно продвинулись и технологии анализа данных, и в ближайшее время можно ожидать резкого увеличения количества сведений о белках гельминтов, а также прояснения особенностей функциониро-

вания метаболических путей у паразитов. Эта информация существенно расширит понимание молекулярных основ жизнедеятельности паразитов и химических взаимодействий, которые происходят между паразитом и его хозяином.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01700 «Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе жизнедеятельности и экологии представителей класса цестоды методами протеомики».

Список литературы

- Жигилева О. Н. 2017. Взаимосвязь зараженности гельминтами и генетического разнообразия популяций животных. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тюмень. 415 с.
- Извекова Г. И., Фролова Т. В. 2016. Протеолитические ферменты и их ингибиторы у цестод. В кн.: Галактионов К. В. (ред.). Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: сборник научных статей. Севастополь: Издатель Бондаренко Н. Ю. 75—77.
- Кузьмина В. В., Извекова Г. И., Куперман Б. И. 2000. Особенности физиологии питания цестод и их хозяев — рыб. Успехи современной биологии. 120 (4): 384—384.
- Львова М. Н., Дужак Т. Г., Центалович Ю. П., Катохин А. В., Мордвинов В. А. 2014. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. Паразитология. 48 (3): 169—184.
- Малютина Т. А. 2008. Взаимоотношения в системе паразит—хозяин: биохимические и физиологические аспекты адаптации (ретроспективный обзор). Российский паразитологический журнал. 1: 24—40.
- Шемарова И. В. 2009. Особенности передачи сигналов у паразитических низших эукариот. Цитология. 51 (11): 880—895.
- Abath F. G., Werkhauser R. C. 1996. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. Parasite Immunology. 18(1): 15—20.
- Bell A., Monaghan P., Page A. P. 2006. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. International Journal for Parasitology. 36 (3): 261—276.
- Benitez L., Harrison L. J., Parkhouse R. M., Garate T. 1998. Sequence and preliminary characterisation of a *Taenia saginata* oncosphere gene homologue of the small heat-shock protein family. Parasitology Research. 84 (5): 423—425.
- Berggren M. I., Husbeck B., Samulitis B., Baker A. F., Gallegos A., Powis G. 2001. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 392 (1): 103—109.
- Bien J., Salamatin R., Sulima A., Savijoki K., Conn D. B., Nareaho A., Mlodiccki D. 2016. Mass spectrometry analysis of the excretory-secretory (E-S) products of the model cestode *Hymenolepis diminuta* reveals their immunogenic properties and the presence of new E-S proteins in cestodes. Acta Parasitologica. 61 (2): 429—442.
- Boukli N. M., Delgado B., Ricaurte M., Espino A. M. 2011. *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: Identification of common proteins by comparative proteomic analysis. Journal of Parasitology. 97 (5): 852—861.
- Cai P., Bu L., Wang J., Wang Z., Zhong X., Wang H. 2008. Molecular characterization of *Schistosoma japonicum* tegument protein tetraspanin-2: sequence variation and possible implications for immune evasion. Biochemical and Biophysical Research Communications. 372: 197—202.

- Cao X., Fu Z., Zhang M., Han Y., Han Q., Lu K., Li H., Zhu C., Hong Y., Lin J. 2016. Excretory/secretory proteome of 14-day schistosomula *Schistosoma japonicum*. *Proteomics*. 130: 221—230.
- Chalmers I. W., McArdle A. J., Coulson R. M., Wagner M. A., Schmid R., Hirai H., Hoffmann K. F. 2008. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics*. 9: 89.
- Chehayeb J. F., Robertson A. P., Martin R. J., Geary T. G. 2014. Proteomic analysis of adult *Ascaris suum* fluid compartments and secretory products. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8 (6): e2939.
- Chen L., He B., Hou W., He L. 2017. Cysteine protease inhibitor of *Schistosoma japonicum* — A parasite-derived negative immunoregulatory factor. *Parasitology Research*. 116 (3): 901—908.
- Chen N., Yuan Z. G., Xu M. J., Zhou D. H., Zhang X. X., Zhang Y. Z., Wang X. W., Yan C., Lin R. Q., Zhu X. Q. 2012. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*. 30 (23): 3478—3482.
- Cui J., Liu R. D., Wang L., Zhang X., Jiang P., Liu M. Y., Wang Z. Q. 2013. Proteomic analysis of surface proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasites & Vectors*. 6: 355.
- Cui S. J., Xu L. L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C. Y., Feng Z., Yang P. Y., Hu W., Liu F. 2013. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions. *Journal of Proteomics*, 84: 158—175.
- De la Torre Escudero E., Manzano-Román R., Valero L., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Hernández-González A., Siles-Lucas M. 2011. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *Journal of Proteomics*. 74 (9): 1534—1544.
- Dorris M., Viney M. E., Blaxter M. L. 2002. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology*. 32 (12): 1507—1517.
- Dzik J. M. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*. 53 (1): 3—64.
- El Ridi R., Tallima H. 2009. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. *Vaccine*. 27 (5): 666—673.
- Feng Y., Pan X., Sun W., Wang C., Zhang H., Li X., Ma Y., Shao Z., Ge J., Zheng F., Gao G. F., Tang J. 2009. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *The Journal of Infectious Diseases*. 200 (10): 1583—1592.
- Geary J., Satti M., Moreno Y., Madrill N., Whitten D., Headley S. A., Agnew D., Geary T., Mackenzie C. 2012. First analysis of the secretome of the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasites & Vectors*. 5 (140): 1—10.
- GO Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. 2017. *Nucleic Acids Research*. 45: D331—D338.
- González-Miguel J., Marcos-Atxutegi C., de Castello R. B., Carpani S., Morchón R., Simón F. 2013. Proteomic analysis of *Ascaridia galli*. Identification of immunoreactive proteins in naturally and experimentally infected hens. *Veterinary Parasitology*. 196 (3-4): 388—396.
- Gordón-Alonso M., Yanez-Mo M., Barreiro O., Alvarez S., Muñoz-Fernández M. A., Valenzuela-Fernández A., Sanchez-Madrid F. 2006. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *Journal of Immunology*. 177: 5129—5137.
- Hemler M. E. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 19: 397—422.

- Hong Y., Sun A., Zhang M., Gao F., Han Y., Fu Z., Shi Y., Lin J. 2013. Proteomics analysis of differentially expressed proteins in schistosomula and adult worms of *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*. 126 (1): 1—10.
- Hunt V. L., Tsai I. J., Coghlan A., Reid A. J., Holroyd N., Foth B. J., Tracey A., Cotton J. A., Stanley E. J., Beasley H., Bennett H. M., Brooks K., Harsha B., Kajitani R., Kulkarni A., Harbecke D., Nagayasu E., Nichol S., Ogura Y., Quail M. A., Randle N., Xia D., Brattig N. W., Soblik H., Ribeiro D. M., Sanchez-Flores A., Hayashi T., Itoh T., Denver D. R., Grant W., Stoltzfus J. D., Lok J. B., Murayama H., Wastling J., Streit A., Kikuchi T., Viney M., Berriman M. 2016. The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. *Nature Genetics*. 48 (3): 299—307.
- Jefferies J. R., Campbell A. M., van Rossum A. J., Barrett J., Brophy P. M. 2001. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*. 9 (1): 1128—1132.
- Kiger L., Rashid A. K., Griffon N., Haque M., Moens L., Gibson Q. H., Poyart C., Marden M. C. 1998. Trematode hemoglobins show exceptionally high oxygen affinity. *Biophysical Journal*. 75: 990—998.
- Kim J. H., Kim Y. J., Sohn W. M., Bae Y. M., Hong S. T., Choi M. H. 2009. Differential protein expression in *Spirometra erinacei* according to its development in its final host. *Parasitology Research*. 105 (6): 1549—1556.
- Liu R. D., Qi X., Sun G. G., Jiang P., Zhang X., Wang L. A., Liu X. L., Wang Z. Q., Cui J. 2016. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* adult worm excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Veterinary Parasitology*. 231: 43—46.
- Liu F., Lu J., Hu W., Wang S. Y., Cui S. J., Chi M., Yan Q., Wang X. R., Song H. D., Xu X. N., Wang J. J., Zhang X. L., Zhang X., Wang Z. Q., Xue C. L., Brindley P. J., McManus D. P., Yang P. Y., Feng Z., Chen Z., Han Z. G. 2006. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathogens*. 2: 268—281.
- Liu M., Ju C., Du X. F., Shen H. M., Wang J. P., Li J., Zhang X. M., Feng Z., Hu W. 2015. Proteomic analysis on cercariae and schistosomula in reference to potential proteases involved in host invasion of *Schistosoma japonicum* larvae. *Journal of Proteome Research*. 14 (11): 4623—4634.
- McWilliam H. E., Driguez P., Piedrafita D., McManus D. P., Meeusen E. N. 2014. Discovery of novel *Schistosoma japonicum* antigens using a targeted protein microarray approach. *Parasites & Vectors*. 7: 290.
- Merckelbach A., Wager M., Lucius R. 2003. Analysis of cDNAs coding for immunologically dominant antigens from an oncosphere-specific cDNA library of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*. 90 (6): 493—501.
- Mitreva M., McCarter J. P., Martin J., Dante M., Wylie T., Chiapelli B., Pape D., Clifton S. W., Nutman T. B., Waterston R. H. 2004. Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research*. 14 (2): 209—220.
- Monteiro K. M., de Carvalho Marcos O., Zaha A., Ferreira H. B. 2010. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*. 10 (10): 1985—1999.
- Ning K., Fermin D., Nesvizhskii A. I. 2012. Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *Journal of Proteome Research*. 11 (4): 2261—2271.
- Omenn G. S., Lane L., Lundberg E. K., Beavis R. C., Overall C. M., Deutsch E. W. 2016. Metrics for the Human Proteome Project 2016: Progress on identifying and characterizing the human proteome, including post-translational modifications. *Journal of Proteome Research*. 15: 3951—3960.
- Ondrovics M., Gasser R. B., Joachim A. 2016. Advances in elucidating nematode molting — prospects of using *Oesophagostomum dentatum* as a model. *Advances in Parasitology*. 91: 233—264.

- Pérez-Sánchez R., Valero M. L., Ramajo-Hernandez A., Siles-Lucas M., Ramajo-Martin V., Oleaga A. 2008. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 161 (2): 112—123.
- Piratae S., Tesana S., Jones M. K., Brindley P. J., Loukas A., Lovas E., Eursitthichai V., Sripa B., Thanasuwan S., Laha T. 2012. Molecular characterization of a tetraspanin from the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6 (12): e1939.
- Robinson M. W., Menon R., Donnelly S. M., Dalton J. P., Ranganathan S. 2009. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular and Cellular Proteomics*. 8 (8): 1891—1907.
- Seo S., Baye L. M., Schulz N. P., Beck J. S., Zhang Q., Slusarski D. C., Sheffield V. C. 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 1488—1493.
- Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Dowd C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. 15 (1): 1—16.
- Silvie O., Charrin S., Billard M., Franetich J. F., Clark K. L., van Gemert G. J., Sauerwein R. W., Dautry F., Boucheix C., Mazier D., Rubinstein E. 2006. Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *Journal of Cell Science*. 119 (10): 1992—2002.
- Smith R. E., Spithill T. W., Pike R. N., Meeusen E. N., Piedrafita D. 2008. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: cloning and characterisation of 70 kDa heatshock proteins reveals variation in HSP70 gene expression between parasite species recovered from sheep. *Experimental Parasitology*. 118: 536—542.
- Sotillo J., Valero M. L., Sánchez del Pino M. M., Fried B. J., Esteban J. G., Marcilla A., Toledo R. 2011. Proteomic analysis of the adult stage *Zygodontia cyclops*. *Experimental Parasitology*. 128: 133—137.
- Sotillo J., Trelis M., Cortés A., Valero M. L., del Pino M. S., Guillermo Esteban J., Marcilla A., Toledo R. 2012. Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats. *Parasitology International*. 61 (4): 561—564.
- Sripa B., Kaewkes S. 2000. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *International Journal for Parasitology*. 30 (6): 735—740.
- Sun J., Zhang G. L., Li S., Ivanov A. R., Fenyó D., Lisacek F., Murthy S. K., Karger B. L., Brusic V. 2014. Pathway analysis and transcriptomics improve protein identification by shotgun proteomics from samples comprising small number of cells — a benchmarking study. *BMC Genomics*. 15 (Suppl 9): S1.
- The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. 2017. *Nucleic Acids Research*. 45: D158—D169.
- Tran M. H., Freitas T. C., Cooper L., Gaze S., Gatton M. L., Jones M. K., Lovas E., Pearce E. J., Loukas A. 2010. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover. *PLoS Pathogens*. 6: e1000840.
- Tort J., Brindley P. J., Knox D., Wolfe K. H., Dalton J. P. 1999. Proteinases and associated genes of parasitic helminthes. *Advances in Parasitology*. 43: 161—266.
- Tsai I. J., Zarowiecki M., Holroyd N., Gasciarrubio A., Sanchez-Flores A., Brooks K. L., Tracey A., Bobes R. J., Fragoso G., Sciutto E., Aslett M., Beasley H., Bennett H. M., Cai X., Camicia F., Clark R., Cucher M., De Silva N., A Day T., Deplazes P., Estrada K., Fernández C., Holland P. W. H., Hou J., Hu S., Huckvale T., Hung S. S., Kamenetzky L., Keane J. A., Kiss F., Koziol U., Lambert O., Liu K., Luo X., Luo Y., Macchiaroli N., Nichol S., Paps J., Parkinson J., Pouchkina-Stantcheva N.,

- Riddiford N., Rosenzvit M., Salinas G., Wasmuth J. D., Zamanian M., Zheng Y. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 496 (7443): 57—63.
- Vibanco-Pérez N., Landa-Piedra A. 1998. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40 (1-2): 73—85.
- Victor B., Kanobana K., Gabrie S., Polman K., Deckers N., Dorny P., Deelder A. M., Palmblad M. 2012. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics*. 12: 1860—1869.
- Viney M. 2017. How can we understand the genomic basis of nematode parasitism? *Trends in Parasitology*. 33 (6): 444—452.
- Vogel C., Marcotte E. M. 2013. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*. 13 (4): 227—232.
- Walker A. J. 2011. Insights into the functional biology of schistosomes. *Parasites & Vectors*. 4: 203.
- Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. 2009. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental Parasitology*. 123 (2): 162—167.
- Wang T., Zhao M., Rotgans B. A., Strong A., Liang D., Ni G., Limpanont Y., Ramasoota P., cManus D. P., Cummins S. F. 2016. Proteomic analysis of the *Schistosoma mansoni* miracidium. *PLoS One*. 11 (1): e0147247.
- Weinstein S. B., Kuris A. M. 2016. Independent origins of parasitism in Animalia. *Biology Letters*. 12 (7): pii: 20160324.
- Yalaoui S., Zougbede S., Charrin S., Silvie O., Arduise C., Farhati K., Bouchaix C., Mazier D., Rubinstein E., Froissard P. 2008. Hepatocyte permissiveness to *Plasmodium infection* is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathogens*. 4: e1000010.
- Zhang S., Guo A., Zhu X., You Y., Hou J., Wang Q., Luo X., Cai X. 2015. Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. *Acta Tropica*. 144: 31—40.
- Zöllner M. 2008. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 9: 40—55.

PROTEOMICS RESEARCH OF FEATURES OF LIFE ACTIVITY OF PARASITIC WORMS

A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, D. S. Bedulina,
L. P. Smirnov, I. V. Sukhovskaya

Key words: proteomic, proteins, helminthes, Cestoda, Trematoda, Nematoda.

SUMMARY

The study of the composition of proteins (proteome) of helminths is necessary for revealing of molecular basis of life of a parasitic organisms and clarifying of biochemical mechanisms underlying «parasite-host» relationships. It is useful for determination of potential targets for the chemotherapy and drug design. The review demonstrates the insights in the proteomic research of helminthes. The major groups of proteins were described, such as structural proteins, carbohydrate metabolism enzymes and proteins of stress response. Comparative studies of proteins at various stages of the life cycle of helminthes reveal proteins with different expression level at larval and sexually mature individuals. Particular attention is drawn for secretory proteins of parasites, called secretome. Proteins of secretome (various proteolytic enzymes, proteins of the detoxification system, etc.) play an important role in parasite's defense against host immunity, feeding and penetration through the host tissue barriers.