

УДК 576.895.122.21

**СЕКРЕТОМ МАРИТЫ ПЕЧЕНОЧНОГО СОСАЛЬЩИКА
OPISTHORCHIS FELINEUS**

© М. Н. Львова,¹ Т. Г. Дужак,² Ю. П. Центалович,³ А. В. Катохин,¹
В. А. Мордвинов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН
пр. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090
E-mail: lvovamaria@mail.ru

² Институт «Международный томографический центр» СО РАН
ул. Институтская, 3А, Новосибирск, 630090

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090
Поступила 23.04.2014

O. felineus (кошачья или сибирская двуустка) — трематода сем. Opisthorchiidae, паразитирующая в желчных протоках, желчном пузыре или поджелудочной железе рыбоядных млекопитающих и человека. Известно, что белки, выделяемые трематодами (секретом), играют ключевую роль в различных аспектах взаимоотношений паразит—хозяин. В нашей работе с помощью масс-спектрометрии высокой точности и разрешения (LTQ-FT-ICR) мы определили 37 белков — компонентов экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*, относящихся к следующим группам: антиоксидантные (Cu/Zn супероксиддисмутаза, 4 изоформы глутатион-S-трансфераз, тиоредоксин пероксидаза, тиоредоксин), белки цитоскелета (бета-тубулин, параамиозин), ферменты углеводного обмена (фруктозо-1,6-бисфосфатаза, фосфоенолпируват-карбоксилаза, фруктозо 1,6-бисфосфат альдолаза, енолаза, лактатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза), транспортные белки (миоглобин, ферритин, белок, связывающий жирные кислоты), протеолитические ферменты (катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2), белки с неизвестной функцией и др. Также в составе ЭСП описторхид нами впервые определен белок (Of-HDM), принадлежащий к новому семейству защитных молекул гельминта. Представленные в данной работе результаты показывают, что секретом *O. felineus* содержит широкий спектр многофункциональных белков. Эта информация может быть полезной для дальнейшего исследования молекулярных механизмов патогенеза описторхоза, и некоторые из определенных нами белков могут представлять интерес как потенциальные антигены для разработки вакцин и иммунодиагностики, так и потенциальные мишени для новых антигельминтных препаратов.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, печеночный сосальщик, секретируемые белки, секретом, защитные молекулы гельминта.

Описторхоз остается серьезной проблемой здравоохранения стран Азии и Восточной Европы. *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) — трематода сем. Opisthorchiidae (Looss, 1899), возбудитель описторхоза — распространен преимущественно на территории России и стран ближнего зарубежья (Украина, Белоруссия, Казахстан и страны Прибалтики) (Беэр, 2005). Обь-Иртышский бассейн является самым обширным и интенсивным очагом этого гельминтоза в мире. У человека описторхоз, вызванный *O. felineus*, отличается длительным течением и развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, стриктуры желчевыводящих путей, абсцессы печени, панкреатит, а также, по данным ряда авторов, может способствовать возникновению холангиокарциномы (рака желчных протоков) (Бражникова, Толкаева, 2002; Бражникова, Цхай, 2004). Международное агентство по исследованию рака (IARC) признало двух представителей сем. Opisthorchiidae — *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) канцерогенами 1 группы, т. е. хроническая инфекция этими гельминтами может приводить к развитию холангиокарциномы (IARC monograph., 2012). Роль же *O. felineus* в развитии опухолевого процесса печени и желчевыводящих путей на сегодняшний день нельзя считать доказанной. Хотя некоторые отечественные авторы не подвергают сомнению связь между описторхозом, вызванным *O. felineus*, и опухолями печени (Бражникова, Толкаева, 2002). Исследование механизмов развития патологических изменений, в том числе и канцерогенеза, в гепатобилиарной системе окончательных хозяев при описторхозе показало, что значительный вклад в их возникновение и развитие вносит секретом, т. е. белки, секретируемые паразитами в составе так называемого экскреторно-секреторного продукта — ЭСП (Sripa, Kaewkes, 2000). Компонентами ЭСП гельминтов могут являться и другие секретируемые вещества: продукты жизнедеятельности, содержимое кишечника, вещества, которые высвобождаются с поверхности тегумента и др. Однако показано, что белки, входящие в состав ЭСП у трематод, играют ключевую роль в различных аспектах взаимоотношений паразит—хозяин, например способствуют проникновению паразита через ткани хозяина (Robinson et al., 2009), позволяют избежать или модулировать иммунный ответ последнего (Loukas et al., 2001; Donnelly et al., 2005; Park et al., 2009), участвуют в морфофункциональной перестройке окружающих тканей и обеспечении паразита питательными веществами (Berasain et al., 1997; Robinson et al., 2009; Smout et al., 2009; Daoguang et al., 2012; Liang et al., 2013). В свою очередь все это способствует длительному паразитированию гельминтов в организме окончательного хозяина.

Определению белкового состава ЭСП различных трематод посвящено большое количество работ, выполненных с применением протеомных методов исследований (Curwen et al., 2004; Knudsen et al., 2005; Morphey, 2007), в том числе для *O. viverrini* и *C. sinensis* (Ju et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Полученные данные используют при поиске мишеней для усовершенствования иммунодиагностики (Ju et al., 2009), разработки новых вакцин и лекарственных средств (Wei et al., 2010). Белковый состав ЭСП *O. felineus* ранее был охарактеризован Котелкиным и др. (1997). Ими было определено 11 белков различной молекулярной массы: p105, p80, p74, p70, p66, p50, p40, p34, p33, p24, p10. Авторы показали, что наиболее иммуногенными являлись белки p74, p70, p66 и особенно

p105 и рекомендовали их, как перспективные для совершенствования методов иммунодиагностики описторхоза (Котелкин и др., 1997).

Несмотря на широкое распространение и медицинскую значимость инфекции, вызванной *O. felineus*, на сегодняшний момент этот возбудитель является наименее изученным видом с точки зрения протеомики среди эпидемиологически значимых представителей семейства (*O. viverrini*, *O. felineus*, *C. sinensis*).

Целью нашего исследования было определение белкового состава ЭСП *O. felineus*, полученного в условиях культивирования *in vitro*, с помощью протеомного подхода высокой точности и разрешения — метода масс-спектрометрии с использованием масс-анализатора ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием. В данной работе нами впервые протеомными методами был исследован секретом *O. felineus*, обсуждается возможная роль некоторых белков, интересных с точки зрения как изучения патогенеза морфофункциональных изменений в гепатобилиарной системе, так и в качестве потенциальных мишеней для усовершенствования иммунодиагностики и вакцинопрофилактики. Обсуждаются пути секреции белков на поверхность тегумента и в просвет желчных протоков. Также в составе ЭСП описторхид нами впервые определен белок (Of-HDM), принадлежащий к новому белковому семейству защитных молекул гельминта (Helminth Defense Molecules — HDMs).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение марит *O. felineus*

Метацеркарий *O. felineus* выделяли из зараженных язей (*Leuciscus idus* L., 1758), обитающих в р. Обь в черте г. Новосибирска. Рыбный фарш подвергали ферментативной обработке (пепсин — HCl) в течение ночи при 37 °C. После выделения метацеркарии идентифицировали под световым микроскопом. Хомячков (*Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839)) в возрасте 3 мес. заражали перорально по 50 метацеркарий. Через 3 мес. после инфицирования животные были эвтаназированы путем декапитации в асептических условиях. Половозрелых марит выделяли из желчных протоков. Мариты были промыты несколько раз стерильным физиологическим раствором, содержащим пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) для отмывки остатков тканей хозяина и крови, а также для предотвращения бактериального загрязнения. Целостность гельминтов была проверена под световым микроскопом. Содержание животных и эксперименты проводили по протоколу № 7 от 19.12.2011, утвержденному биоэтической комиссией ИЦиГ СО РАН.

Получение белков ЭСП марит *O. felineus*

Неповрежденных живых червей культивировали в чашках Петри (10 особей в мл) в среде RPMI1640, содержащей пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 24 ч.

После инкубации среду собирали, добавляли коктейль ингибиторов протеаз (protease inhibitor mix, GE Healthcare, USA) и центрифугировали $700 \times g$ 15 мин, затем супернатант еще раз центрифугировали $15\,000 \times g$, 30 мин при $4\text{ }^\circ\text{C}$ для того чтобы избавиться от яиц паразитов. Затем выделяли белки с помощью метода, описанного Вессель и Флюге (Wessel, Flügge, 1984), с небольшими модификациями. Кратко, к 1 мл среды с ЭСП добавляли 4 мл метанола, перемешивали, добавляли 1 мл хлороформа, перемешивали и затем добавляли 3 мл дистиллированной воды для разделения фаз. Полученную смесь энергично перемешивали и центрифугировали 1 мин при $9000 \times g$. Затем интерфазу и нижнюю фазу аккуратно переносили в 1.5 мл пробирки, добавляли 0.3 мл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 2 мин $9000 \times g$, чтобы белки выпали в осадок. Полученные осадки растворяли в аммоний бикарбонатном буфере. Концентрацию белка оценивали по методу Бредфорда (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories).

Трипсинолиз белков в растворе

Трипсинолиз полученных белков проводили по стандартной методике, описанной Ресенде и др. (Resende et al., 2013), с небольшими модификациями. Кратко, к 2 мкг белка, растворенного в 20 мкл 40 мМ аммоний бикарбонатного буфера (pH 8.0), добавляли трис (2-карбокситил) фосфин гидрохлорид (TCEP; Pierce, USA) до конечной концентрации 10 мМ. Белки денатурировали 10 мин при $95\text{ }^\circ\text{C}$. После остывания образцов цистеиновые остатки алкилировали 15 мМ иодацетамидом в темноте в течение часа. Трипсин (Promega, USA) добавляли в концентрации 30 нг на образец в аммоний бикарбонатном буфере и инкубировали 16—18 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Масс-спектрометрический анализ гидролизата белков ЭСП мари *O. felineus*

Масс-спектрометрический анализ гидролизата белковой фракций ЭСП проводили методом комбинированного анализа, включающего:

- 1) разделение гидролизованных пептидов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на обращенно-фазовой колонке ($0.3 \times 150\text{ mm}$, Рертар C_{18}) при скорости потока 5 мкл/мин и линейном градиенте от 5 до 65 % ацетонитрила и 0.06 % муравьиной кислоты, используя жидкостный хроматограф LC Packings Ultimate Chromatograph (Dionex, USA);

- 2) фрагментацию элюированных с колонки пептидов (MS/MS) проводили на LTQ-FT-ICR-масс-спектрометре, сочетающем в себе технологии линейной квадрупольной ионной ловушки и ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (hybrid linear quadrupole ion trap Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) (Thermo Finnigan, Germany).

Биоинформатический поиск и базы данных

Полученные масс-спектры обрабатывали с использованием программы BioWorks 3.2 (Thermo Scientific, USA), после чего следовала идентификация пептидов/белков с помощью программ Mascot версия 2.2.04 (Matrix Science, UK) с привлечением баз данных, описанных ниже. При поиске использовали следующие параметры: точность определения материнского иона — 0.2 ppm (миллионных долей), точность определения дочерних (фрагментных) ионов — 5.0 ppm, гидролизующий фермент — трипсин, допускался один пропущенный сайт гидролиза трипсином на пептид, зарядовое состояние ионов пептида 1+, 2+ и 3+, из предполагаемых модификаций в пептидах учитывали карбамидометилирование остатков цистеина и окисление остатков метионина. Порог значимости в программе Mascot был установлен на значении $p < 0.05$, и только пептиды с индивидуальным скором выше этого значения использовали для идентификации белка. Белок считался определенным, если хотя бы один уникальный пептид имел скор выше порога значимости и общий скор белка превышал 50. Идентификацию белков проводили с использованием базы данных ESTs *O. felineus*, полученных в нашей лаборатории, состоящей из 2648 последовательностей и 267 контигов (Pomaznoy et al., 2013). Далее для идентификации белков были использованы сконструированные нами на основе доступных источников (NCBI nr, SwissProt, декабрь 2013 г.) специализированные базы данных для близкородственных гельминтов подкласса Digenea (Caigus, 1863): 72480 нуклеотидных последовательностей (Digenea_nr) и 45161 аннотированных белковых последовательностей (Digenea_prot).

Поиск сигнальных пептидов (СП) осуществляли с помощью программы SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Поиск консервативных доменов и мотивов в аминокислотных последовательностях выполняли с помощью программы InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводилось программой ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Анализ спиральных структур белка (helical wheel analysis) выполнен с помощью программы HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Протеомный анализ ЭСП *O. felineus*, полученного после культивирования *in vitro*

По мере накопления значительного количества геномных и транскриптомных данных и развития масс-спектрометрии стали широко применяться протеомные методы для анализа секретомов различных гельминтов, в том числе и трематод, на различных стадиях развития (Curwen et al., 2004; Knudsen et al., 2005; Ju et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Тем не менее исследователи сталкиваются с рядом проблем: (i) невозможность в подавляющем большинстве случаев исследовать ЭСП *in vivo*; (ii) небольшое количество анализируемого белка; (iii) ограниченность доступных нуклеотидных и белковых последовательностей для трематод, в том

числе и для *O. felineus* (2563 ESTs, 582 белка на декабрь 2013 г. в базе данных NCBI), что затрудняет анализ полученных масс-спектрометрических данных. Учитывая это, мы использовали: (i) культивирование половозрелых марит *O. felineus* в течение 24 ч *in vitro*, как наиболее распространенную модель эксперимента при изучении секретомов трематод, (ii) LTQ-FT-ICR-масс-спектрометр как наиболее подходящий для анализа малых количеств белка в смеси и, наконец (iii) несколько баз данных для *O. felineus* (ESTs *O. felineus* (Pomaznoy et al., 2013), *Digenea_nr* и *Digenea_prot*).

Во фракции ЭСП, полученной через 24 ч после культивирования *O. felineus in vitro*, при анализе против ESTs, полученных в нашей лаборатории, нами было идентифицировано 14 белков. Такое небольшое число обусловлено небольшим количеством опубликованных ESTs. Далее с использованием сконструированных для подкласса *Digenea* баз данных мы выявили 32 белка. В общей сложности нам удалось определить 37 белков (см. таблицу), которые можно разделить на группы в соответствии с их биологической функцией: белки цитоскелета, антиоксидантные, транспортные белки, протеолитические, метаболические ферменты, ингибиторы протеаз, белки с неизвестной функцией и др.

Белки цитоскелета (бета-тубулин, парамиозин), обнаруженные в ЭСП *O. felineus*, характерны также для секретомов других трематод (Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Известно, что тегументальная форма парамиозина (структурного белка мышц беспозвоночных) у гельминтов способна играть роль иммуномодулятора. Хотя механизмы действия парамиозина на иммунную систему хозяина при описторхозе, вызванном *O. felineus*, пока не изучены, для других трематод, в частности для *S. mansoni* (Sambon, 1907) и *C. sinensis*, показано, что он блокирует классический путь активации комплемента через конкурентное связывание коллагеноподобного региона C1q (Laclette et al., 1992), а также связывает C8 и C9, препятствуя формированию мембран-атакующего комплекса (Park et al., 2009). Также показано, что шистосомы адсорбируют на поверхности тегумента большое количество белков хозяина в качестве маскировки от его иммунной системы и что парамиозин выступает в этом случае как белок, присоединяющий Fc-фрагменты (Loukas et al., 2001). Парамиозин предлагался как кандидат для разработки вакцин и усовершенствования иммунодиагностики для трематод, в том числе и близкородственного вида *C. sinensis* (Park et al., 2009). Котелкин и др. (1997), исследуя антигенный состав ЭСП *O. felineus*, также показали, что одним из наиболее перспективных для усовершенствования иммунодиагностики описторхоза может быть белок 105 кДа, который по молекулярной массе может соответствовать парамиозину.

Следующая группа белков — антиоксидантные белки (Cu/Zn супероксиддисмутаза (SOD), глутатион-S-трансферазы (GST), тиоредоксин пероксидаза, тиоредоксин). Из этой группы заслуживают особого внимания GST, так как в ЭСП *O. felineus* их содержится 4 изоформы: мю класса — 26 кДа; сигма класса — 28 и 24 кДа и GST омега-1. Это больше, чем в любых описанных в литературе секретомов других трематод. GST — обширное семейство белков, которые защищают клетки, связывая глутатион и эндогенные или экзогенные электрофильные компоненты, такие как ле-

Белки, идентифицированные в ЭСП марты *O. felineus*, с помощью программы Mascot (Matrix Science) против ESTs *O. felineus*, *Digenea_nr* и *Digenea_prot*

Proteins identified in the excretory-secretory products of *O. felineus* adult worms identified with Mascot (Matrix-Science) search engine using *O. felineus* ESTs and custom build data bases (*Digenea_nr*, *Digenea_prot*)

Аннотация ¹	Вид	Идентификатор ²	Скор ³	СП ⁴
Белки цитоскелета				
Бета-губулин	<i>C. sinensis</i>	GAA38205	242	
Парамиозин	То же	ABN79674	65	
Антиоксидантные белки				
26 кДа GST	» »	3ISO	2960	
28 кДа GST	» »	AAD17488	1865	
GST	<i>O. viverrini</i>	AAL23713	1611	
Тиоредоксин пероксидаза	<i>C. sinensis</i>	GAA30671	706	Есть
GST омега 1	То же	GAA34234.2	78	
Тиоредоксин	» »	GAA55399	77	
Cu/Zn супероксиддисмутаза	» »	GAA54059	53	
Метаболические ферменты				
Ретинол-дегидрогеназа	» »	GAA49763	1142	
Фруктозо 1,6-бисфосфат альдолаза	» »	GAA50927	422	
Фруктозо-1,6-бисфосфатаза	» »	GAA56894	384	
Енолаза	» »	GAA51601	235	
Триозофосфатизомераза	» »	GAA50993	98	
Лактатдегидрогеназа	» »	AAV80238	92	
Уроканат гидратаза	» »	GAA31650	86	
Фосфоенолпируват-карбоксилаза	» »	<i>O. felineus</i> c045 (GAA38235)	62	
Глюкозо-6-фосфат изомераза	» »	GAA28387	61	
Глутаматдегидрогеназа	» »	GAA53751	50	
Транспортные белки				
Миоглобин	» »	AAN28366	5501	
Ферритин	» »	AAS92978	458	
FABP	» »	<i>O. felineus</i> c126 (Q8MUC1)	74	
Протеолитические ферменты				
Катепсин F предшественник	» »	ABK91811	531	Есть
Лейцинаминопептидаза 2	» »	ACR27085	184	
Катепсин В1	» »	ABM47070	56	»
Цистеиновая протеаза	» »	<i>O. felineus</i> c059 (ABC69434)	54	»
Ингибиторы протеаз				
цистеиновой (putative cys1 protein)	» »	GAA51719	214	
сериновой (leukocyte elastase inhibitor)	» »	GAA48350	62	
Прочие				
Перлекан	» »	GAA54374	825	
Периостин	» »	GAA53413	825	
Циклофилин А	» »	ADY88065	715	
Белок семейства rutC (PH0854)	» »	GAA48115	530	

Аннотация ¹	Вид	Идентификатор ²	Скор ³	СП ⁴
Коллаген альфа-1 (IV) цепь	<i>C. sinensis</i>	GAA31679	122	
ГФИ — якорный гликопротеин	То же	GAA49598	52	Есть
Белки с неизвестной функцией				
Неизвестный белок	<i>S. japonicum</i>	CAX74647	699	
Неизвестный белок	<i>C. sinensis</i>	O felineus c061 (AAM55183)	512	»
Неизвестный белок CLF_101969	То же	O felineus c104 (GAA48735)	51	»

Примечание. ¹ — Аннотация — описание белка. В случае поиска против ESTs *O. felineus* аннотация контпгов проводилась с помощью программы BlastX при условии совпадения позиции открытой рамки считывания в обеих программах BlastX и Mascot. ² — Идентификатор — номера из баз данных NCBI и SwissProt (отмечено звездочкой). Также в таблице перечислены номера мРНК-контпгов для белков, которые удалось определить только с помощью ESTs, тогда в скобках указан идентификатор соответствующего белка *C. sinensis*. ³ — Скор — скор программы Mascot (Matrix Science). Указан лучший скор из поисков против всех баз данных. ⁴ — СП — сигнальный пептид. Наличие сигнального пептида в белке обозначено словом «есть».

карства или токсические метаболиты, продуцируемые при окислительном стрессе. Считается, что у паразитов ферменты этого семейства, а также SOD, тиоредоксин пероксидаза и тиоредоксин выполняют защитную детоксификационную функцию, обезвреживая активные формы кислорода, продуцируемые в процессе жизнедеятельности паразитов, а также клетками иммунной системы хозяина (Callahan et al., 1988; Donnelly et al., 2005). Как и большинство белков, обнаруженных в ЭСП гельминтов, эти ферменты многофункциональны. Так, протеомными методами была выделена фракция ЭСП *O. viverrini*, а в ней определена GST 28 кДа, обладающая митогенной активностью *in vitro*, путем задействования сигнальных путей ERK (один из каскадов с участием митоген-активируемых протеинкиназ) и АКТ (каскад, осуществляемый через белки семейства протеинкиназ B) в отношении клеточной линии мышинных фибробластов NIH-3T3 и линии человеческих холангиоцитов MMNK1 (Daoguang et al., 2012). GST 26 и 28 кДа предлагаются в качестве перспективных мишеней для разработки вакцин и совершенствования иммунодиагностики различных трематодозов (Wei et al., 2010). Тиоредоксин пероксидазу трематод также следует упомянуть, поскольку она вызывает альтернативную активацию макрофагов и проявляет еще и иммуномодулирующую активность (Donnelly et al., 2005).

К следующей группе белков относятся метаболические ферменты (уроканат гидратаза, глутаматдегидрогеназа, ретинол-дегидрогеназа), в том числе ферменты углеводного обмена (фруктозо-1,6-бисфосфатаза, фосфоенолпируват-карбоксилаза, фруктозо 1,6-бисфосфат альдолаза, енолаза, лактатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза). Хотя это традиционно цитозольные ферменты, они определяются у большинства трематод в ЭСП (Knudsen et al., 2005; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011; Marcilla et al., 2012). Для части ферментов описаны и другие функции. Например, енолаза некоторых трематод способна присоединять плазминоген, что, вероятно, помогает паразитам осуществлять протеолиз внеклеточного матрикса (Marcella et al., 2007). Белок фруктозо-1,6-бисфосфатаза *C. sinensis* может

специфически связываться с мембраной звездчатых клеток печени *in vitro* (клеточная линия LX-2), вызывая их пролиферацию и повышая уровень экспрессии ключевых факторов развития фиброза (Liang et al., 2013).

Другим важным компонентом секрета *O. felineus* являются транспортные белки: миоглобин, ферритин, белок, связывающий жирные кислоты (FABP — Fatty Acid Binding Proteins). Эти белки также характерны для ЭСП других представителей сем. Opisthorchiidae (Ju et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Миоглобин трематод участвует в транспорте кислорода, обладая большим сродством к кислороду, чем глобины хозяина, что может быть важным фактором обеспечения выживания паразитов в обедненной кислородом среде (Rashid et al., 1997). Ферритин играет центральную роль в поддержании молекул железа в растворимой и нетоксичной форме, минимизируя свободно-радикальные реакции и предотвращая повреждение клеток. FABP связывают помимо жирных кислот еще стеролы, лизофосфолипиды, гем и желчные пигменты, также выполняя детоксификационную функцию (Glatz, van der Vusse, 1996). Известно, что трематоды не могут синтезировать жирные кислоты *de novo* и должны получать их от хозяина. Поэтому FABP принимают участие в широком спектре биологических процессов паразитов (формирование мембран, созревание половой системы, продукция/созревание яиц и т. д.). Таким образом, FABP являются хорошими мишенями для разработки новых лекарств и вакцин (Wei et al., 2010).

В секрете *O. felineus* идентифицированы следующие протеолитические белки: катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2. Интересно, что спектр протеаз в ЭСП у представителей сем. Opisthorchiidae заметно различается (Ju et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Например, у *O. viverrini* обнаружен только катепсин D в минимальном количестве, что позволило авторам предположить, что протеазы не являются основным компонентом ЭСП этого паразита в отличие от других трематод, в том числе и близкородственных видов (Mulvenna et al., 2010). В секрете же *C. sinensis* разнообразие протеаз было больше: катепсины B, B2, цистеиновые протеазы, аминопептидаза, легумаин (Ju et al., 2009; Zheng et al., 2011). Легумаин при этом отмечен как мажорный антиген ЭСП, поэтому его рекомбинантная форма была рекомендована для усовершенствования иммунодиагностики клонорхоза (Ju et al., 2009). Хотя в EST-библиотеке (Romaznoy et al., 2013) присутствует несколько соответствующих этому белку транскриптов, легумаин не был обнаружен в ЭСП *O. felineus*. Более сложный состав протеаз в ЭСП *O. felineus* по сравнению с таковым *O. viverrini* может быть одной из причин более выраженной патогенности *O. felineus* при сравнительном исследовании патологических проявлений в печени на модели лабораторных животных при описторхозах, вызванных этими гельминтами (Lvova et al., 2012). Хотя у животных, зараженных *O. felineus*, наблюдался более выраженный фиброз, гиперплазия, метаплазия эпителия (Lvova et al., 2012), нам не удалось в ЭСП определить гранулин (гомолог ростового фактора человека), обнаруженный в ЭСП у *O. viverrini* (Mulvenna et al., 2010). Показано, что гранулин *O. viverrini* является митогеном в очень низких концентрациях (Smout et al., 2009).

Наряду с протеазами в ЭСП *O. felineus* присутствовали их ингибиторы, принадлежащие к семействам сериновых (leukocyte elastase inhibitor) и

цистеиновых (putative cys1 protein) ингибиторов иротеаз. Показано, что эти белки у гельминтов ингибируют активность как их собственных протеаз, так и иротеаз хозяина, а также обладают иммуномодулирующими свойствами (Dzik, 2006).

Также нами были определены такие белки, как циклофилин А, коллаген альфа-1. Впервые для описторхид в секретоме *O. felineus* были идентифицированы гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ) — якорный гликопротеин (GPI-anchored surface glycoprotein), перлекан (basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein, протеогликан гепаран сульфат) и периостин. Так, ГФИ — якорный гликопротеин, выделяемый *S. mansoni*, связывается с липопротеиновыми частицами хозяина. Антитела, атакующие белок паразита, образуют с ними иммунные комплексы. Клетки, несущие рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, захватывают эти комплексы, что приводит к накоплению в них значительного количества липопротеинов и нарушению липидного гомеостаза. В частности, это способствует снижению жизнеспособности нейтрофилов и, таким образом, вносит вклад в развитие неэффективного иммунного ответа против паразита (Sprong et al., 2006). Периостин — хорошо изученный белок человека, лиганд для интегринов, обеспечивает адгезию и миграцию эпителиальных клеток, участвует в ранозаживлении, отмечается его повышенная экспрессия в ряде опухолей, в том числе при холангиокарциноме, показано его значительное накопление в клетках стромы и опухоли (Morra, Moch, 2011). Роль периостина у гельминтов неизвестна.

Интересно, что как и в других исследованиях секретомов трематод, мы обнаружили в составе ЭСП *O. felineus* большое количество не секретируемых белков (см. таблицу), т. е. белков, не имеющих сигнальных пептидов (изоформы GST, цитозольные и цитоскелетные белки). Этому есть по крайней мере несколько объяснений. Хотя мариты *O. felineus* могут выживать в культуральной среде длительное время (1 мес. и более) (Кондинский, 1974), тем не менее условия *in vitro* для них не оптимальны. В естественных условиях происходит постоянное обновление поверхностного слоя тегумента, которое играет роль в избегании паразитом иммунного ответа хозяина (Hanna 1980; Robinson et al., 2009). Условия же *in vitro*, с одной стороны, являются стрессовыми для паразита, и скорость обмена поверхностного слоя тегумента может увеличиваться, а с другой, — возможно, нет полноценной замены «сброшенным» участкам поверхности тегумента, вследствие чего в культуральную среду могут попадать («подтекать») и накапливаться цитозольные и цитоскелетные белки (Morphew et al., 2007). С другой стороны, присутствие несекреторных белков в ЭСП может быть связано с новыми механизмами секреции. Так, для дрожжей с помощью различных экспериментальных подходов (генетических, цитологических и протеомики) было четко показано, что энолаза даже в отсутствие типичного сигнального пептида секретируется на поверхность, вероятно, с помощью новых (неизвестных на данный момент) секреторных механизмов (Lopez-Villar et al., 2006). Для энолазы *Echinostoma caproni* (Richard, 1964), не имеющей сигнального пептида и являющейся компонентом ЭСП, показано наличие на N-конце белка высоко консервативного региона, гомологичного таковому у нематоды *Trichinella spiralis* (Owen, 1835), который является предположительно альтернативой сигнальному

пептиду (Nakada et al., 2005; Marcilla et al., 2007). И наконец, последнее время широко исследуется секреция с помощью внеклеточных везикул, в том числе экзосом. Это пузырьки 30—100 нм в диам., с помощью которых осуществляется атипичная секреция белков у различных организмов, в том числе и паразитов (Marcilla et al., 2012). Так доказано, что *E. caproni* и *F. hepatica* секретируют большинство определенных в их ЭСП белков в пространство между паразитом и хозяином с помощью экзосомоподобных везикул и к тому же клетки хозяина активно их захватывают (Marcilla et al., 2012). Таким образом, эти везикулы играют значительную роль во взаимоотношениях между паразитами и хозяином (Silverman, Reiner, 2011; Marcilla et al., 2012). Для *O. felineus* показано, что тегумент мариты обладает высокой секреторной активностью, и в толще его находится большое количество везикул и электронно-плотных включений различной формы, выход которых на поверхность осуществляется мерокриновым способом (Куперман и др., 1991). Все это позволяет предположить наличие у *O. felineus* секреции с помощью экзосомоподобных везикул, но это требует дополнительных исследований.

Для значительной части пептидов так и не удалось выявить значимого сходства с какими-либо белками. Такая же ситуация описана другими авторами при исследовании белкового состава ЭСП трематод, проводимого с разделением смеси белков в полиакриламидном геле и затем масс спектрометрическим анализом полученных пятен (Curwen et al., 2004; Ju et al., 2009; Knudsen et al., 2005). При исследовании транскриптомов близкородственных видов *O. viverrini* и *C. sinensis* также оказалось, что около 70 % белковых последовательностей у каждого вида не имеют гомологов в существующих базах данных (Young et al., 2010). Авторы исследования предполагают, что эти белки являются специфичными для биологии этих печеночных паразитов, для их длительного существования в организме окончательного хозяина и, скорее всего, именно среди них следует искать потенциальные мишени для разработки новых лекарств и вакцин (Young et al., 2010).

Белок Of-HDM семейства защитных молекул гельминта в ЭСП *O. felineus*

Наше внимание привлек белок — компонент 24-часовой фракции ЭСП *O. felineus*, гомологичный белку *C. sinensis* (GenBank номер AAM55183) с неизвестной функцией. Было определено, что этот белок с молекулярной массой 8 кДа содержит 90 аминокислот, причем первые 20 аминокислот являются сигнальным пептидом. Анализ аминокислотной последовательности этого белка с помощью ресурса InterPro показал отсутствие каких-либо консервативных доменов или мотивов. Однако предсказанная вторичная структура была схожа с таковой белка FhHDM-1 (*F. hepatica* Helminth Defense Molecule-1) (GenBank номер CCA61804.1), и проведенное выравнивание аминокислотных последовательностей этих двух белков подтвердило их гомологию (см. рисунок, А). Анализ спиральных структур белка (helical wheel analysis) показал, что пептиды на С-конце (с 67 по 89 аминокислоту) обоих белков формируют четкую амфипатиче-

ном бактерий, связывая и нарушая его взаимодействие с рецепторами на поверхности макрофагов и предотвращая секрецию медиаторов воспаления. Однако FhHDM-1 не обладает прямой антимикробной и гемолитической активностью, в отличие от кателицидинов хозяина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши результаты показывают, что состав секрета *O. felineus* сложный и содержит широкий спектр многофункциональных белков. Эти данные вносят важный вклад в понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе модулирования иммунной системы и морфофункциональных патологических изменений в окружающих паразита тканях при хроническом описторхозе. Впервые в составе ЭСП описторхид был определен белок (Of-HDM), принадлежащий к новому семейству защитных молекул гельминта. Так как ЭСП *O. felineus* является наиболее перспективным в отношении иммунодиагностики, дальнейшие исследования иммуногенных свойств определенных нами белков помогут в разработке высокоэффективной диагностики на основе их рекомбинантных форм. Пополнение наших знаний о составе транскриптома *O. felineus*, несомненно, приведет к более полной идентификации и функциональной аннотации его секрета.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН VI. 60.1.1 (№ гос. регистрации 01201280335).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бражникова Н. А., Толкаева М. В. 2002. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе. Бюл. сиб. мед. (2) : 71—76.
- Бражникова Н. А., Цхай В. Ф. 2004. Клиника, диагностика и лечение осложнений описторхоза. Анналы хирургической патологии. 9 (2) : 40—44.
- Безр С. А. 2005. Биология возбудителя описторхоза. М.: Товарищество научных изданий КМК. 336 с.
- Кондинский Г. В. 1974. О культивировании половозрелых описторхисов. В сб.: Кузовлетов А. П. (ред.). Вопросы краевой инфекционной патологии. Тюмень. 169—170.
- Котелкин А. Т., Разумов И. А., Покровский И. В., Локтев В. Б. 1997. Сравнительное изучение соматического, экскреторно-секреторного и яичного антигенов *Opisthorchis felinus*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. (1) : 12—16.
- Куперман Б. И., Гиновкер А. Г., Володин А. В., Поддубная Л. Г., Кривенко В. В. 1991. Ультраструктура взрослых трематод *Opisthorchis felinus*. Докл. АН СССР. 317 (2) : 462—464.
- Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J. P., Frangione B., Carmona C. 1997. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. The Journ. of Parasitol. 83 (1) : 1—5.
- Callahan H. L., Crouch R. K., James E. R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? Parasitology Today. 4 (8) : 218—225.

- Curwen R. S., Ashton P. D., Johnston D. A., Wilson R. A. 2004. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 138 (1) : 57—66.
- Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. 2012. Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma. *Parasitology International*. 61 (1) : 155—161.
- Donnelly S., O'Neill S. M., Sekiya M., Mulcahy G., Dalton J. P. 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*. 73 (1) : 166—173.
- Dzik J. M. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*. 53 (1) : 33—64.
- Glatz J. F., van der Vusse G. J. 1996. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Progress in Lipid Research*. 35 (3) : 243—282.
- Hanna R. E. 1980. *Fasciola hepatica*: an immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. *Experimental Parasitology*. 50 (2) : 155—170.
- IARC monograph. 2012. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 100 (Pt B) : 1—441.
- Ju J. W., Joo H. N., Lee M. R., Cho S. H., Cheun H. I., Kim J. Y., Lee Y. H., Lee K. J., Sohn W. M., Kim D. M., Kim I. C., Park B. C., Kim T. S. 2009. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms. *Proteomics*. 9(11) : 3066—3078.
- Knudsen G. M., Medzihradzky K. F., Lim K. C., Hansell E., McKerrow J. H. 2005. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Molecular & Cellular Proteomics*. 4 (12) : 1862—1875.
- Laclette J. P., Shoemaker C. B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D., Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology*. 148 (1) : 124—128.
- Liang P., Sun J., Huang Y., Zhang F., Zhou J., Hu Y., Wang X., Liang C., Zheng M., Xu Y., Mao Q., Hu X., Li X., Xu J., Lu G., Yu X. 2013. Biochemical characterization and functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase from *Clonorchis sinensis*. *Molecular Biology Reports*. 40 (7) : 4371—4382.
- Lopez-Villar E., Monteoliva L., Larsen M. R., Sachon E., Shabaz M., Pardo M., Pla J., Gil C., Roepstorff P., Nombela C. 2006. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. *Proteomics* 6 (Supplement 1) : S. 107—118.
- Loukas A., Jones M. K., King L. T., Brindley P. J., McManus D. P. 2001. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infection and Immunity*. 69 (6) : 3646—3651.
- Lvova M. N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A. V., Mordvinov V. A., Sripa B. 2012. Comparative histopathology of *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. *Parasitology International*. 61 (1) : 167—172.
- Marcilla A., Perez-Garcia A., Espert A., Bernal D., Munoz-Antoli C., Esteban J. G., Toledo R. 2007. *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Experimental Parasitology*. 117 (1) : 57—64.
- Marcilla A., Trelis M., Cortes A., Sotillo J., Cantalapiedra F., Minguéz M. T., Valero M. L., Sanchez del Pino M. M., Munoz-Antoli C., Toledo R., Bernal D. 2012. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One*. 7 (9) : e45974.
- Morra L., Moch H. 2011. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Archiv*. 459 (5) : 465—475.

- Morphew R. M., Wright H. A., LaCourse E. J., Woods D. J., Brophy P. M. 2007. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6 (6) : 963—972.
- Mulvenna J., Sripa B., Brindley P. J., Gorman J., Jones M. K., Colgrave M. L., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiaprapa S., Smout M. J., Loukas A. 2010. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics*. 10 (5) : 1063—1078.
- Nakada T., Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. 2005. Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*. 96 (6) : 354—360.
- Park T. J., Kang J. M., Na B. K., Sohn W. M. 2009. Molecular cloning and characterization of a paramyosin from *Clonorchis sinensis*. *Korean Journal of Parasitology*. 47 (4) : 359—367.
- Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Guselnikov S., Vasilev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. 2013. Adult *Opisthorchis felineus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*. *Experimental Parasitology*. 135 (2) : 297—306.
- Rashid A. K., van Hauwaert M. L., Haque M., Siddiqi A. H., Lasters I., De Maeyer M., Griffon N., Marden M. C., Dewilde S., Clauwaert J., Vinogradov S. N., Moens L. 1997. Trematode myoglobins, functional molecules with a distal tyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (5) : 2992—2999.
- Resende V., Vasilj A., Santos K., Palma M., Shevchenko A. 2013. Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms. *Proteomics*. 13 (17) : 2638—2648.
- 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.
- Robinson M. W., Donnelly S., Hutchinson A. T., To J., Taylor N. L., Norton R. S., Perugini M. A., Dalton J. P. 2011. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathogens*. 7 (5) : e1002042.
- Silverman J. M., Reiner N. E. 2011. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cellular Microbiology*. 13 (1) : 1—9.
- Smout M. J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiaprapa S., Jones A., Brindley P. J., Loukas A. 2009. A granulin-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. *PLoS Pathogens*. 5 (10) : e1000611.
- Sprong H., Suchanek M., van Dijk S. M., van Remoortere A., Klumperman J., Avram D., van der Linden J., Leusen J. H., van Hellemond J. J., Thiele C. 2006. Aberrant receptor-mediated endocytosis of *Schistosoma mansoni* glycoproteins on host lipoproteins. *PLoS Medicine*. 3(8) : e253.
- Sripa B., Kaewkes S. 2000. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *International Journal for Parasitology*. 30 (6) : 735—740.
- Wei F., Zhai Y., Jin H., Shang L., Men J., Lin J., Fu Z., Shi Y., Zhu X. Q., Liu Q., Gao H. 2010. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from *Schistosoma japonicum*. *Vaccine*. 28 (32) : 5161—5166.
- Wessel D., Flugge U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*. 138 (1) : 141—143.

- Young N. D., Campbell B. E., Hall R. S., Jex A. R., Cantacessi C., Laha T., Sohn W. M., Sripa B., Loukas A., Brindley P. J., Gasser R. B. 2010. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 4 (6) : e719.
- Zheng M., Hu K., Liu W., Hu X., Hu F., Huang L., Wang P., Hu Y., Huang Y., Li W., Liang C., Yin X., He Q., Yu X. 2011. Proteomic analysis of excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization and serological reactivity of an excretory-secretory antigen-fructose-1,6-bisphosphatase. Parasitology Research. 109 (3) : 737—744.

SECRETOME OF THE ADULT LIVER FLUKE OPISTHORCHIS FELINEUS

M. N. Lvova, T. G. Duzhak, Yu. P. Tsentalovich, A. V. Katokhin, V. A. Mordvinov

Key words: trematode, *Opisthorchis felineus*, secreted proteins, excretory-secretory product, helminth defence molecule.

SUMMARY

The opisthorchiasis caused by *Opisthorchis felineus*, the Siberian liver fluke remains a serious public health problem in Russia and Eastern Europe. Proteomic identification of the proteins in the excretory-secretory products (ESPs) released by *O. felineus* is an important key for the investigation of host-parasite interactions and understanding the mechanisms involved in parasite survival within the host. In the ESP of *O. felineus* we have identified 37 proteins using high-resolution proteomics approach (LTQ-FT-ICR mass spectrometer). The *O. felineus* secretes either excretes a complex mixture of proteins including: glycolytic enzymes (enolase, aldolase, fructose-1,6-bisphosphatase and other); detoxification proteins (4 isoform of glutathione S-transferases, Cu/Zn superoxide dismutase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin); cytoskeletal proteins (beta tubulin and paramyosin); a number of proteases (cathepsin F, B1, leucin aminopeptidase 2); protease inhibitors (putative cys1 protein, leukocyte elastase inhibitor), binding proteins (ferritin, myoglobin, FABP) and other. In the *O. felineus* ESP we also identified Of-HDM protein belonging to a novel family «helminth defence molecules» (HDMs). The *O. felineus* proteins identified in this study provide necessary information for the further investigation of molecular mechanisms of opisthorchiasis pathogenesis and some of them would be of interest as potential antigens for vaccine and immunodiagnosics development and as potential new anthelmintic drug targets.
