

УДК 577.112.083; 576.89

СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЯ БЕЛКОВ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЦЕСТОДЫ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ХОЗЯЕВ

А. А. Кочнева¹, Е. В. Борвинская^{1,2}, Д. С. Бедулина², И. В. Суховская¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² НИИ биологии Иркутского государственного университета, Россия

Исследован спектр белков паразитических цестод *Triaenophorus nodulosus* (стадия плероцеркоида), извлеченных из печени разных видов рыб: окуня *Perca fluviatilis* L., ерша *Gymnocephalus cernuus* L. и налима *Lota lota* L. При сравнении белковых экстрактов после разделения методом двумерного электрофореза были выявлены 18 белков, концентрация которых статистически значимо различалась у личинок из разных видов рыб. С помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF/TOF, LC-MS) из них удалось идентифицировать четыре белка: фермент углеводного обмена триозофосфатизомеразу, компоненты микротрубочек субъединицы тубулина α и β и сигнальную молекулу G-белок. Повышенное содержание компонентов сигнального пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточной морфологии (тубулинов и G-белка) у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима может свидетельствовать о более динамичном цитоскелете, более активных процессах пролиферации и дифференцировки клеток и, возможно, большей степени зрелости личинок из этого вида рыб. Более высокий уровень экспрессии ключевого фермента гликолиза и передачи сигнала триозофосфатизомеразы у плероцеркоидов окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима указывает на большую метаболическую активность в тканях личинок из окуня. Полученные результаты свидетельствуют, что среда обитания оказывает влияние на содержание некоторых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*.

Ключевые слова: протеомика; гельминты; *Triaenophorus*; Cestoda; промежуточные хозяева.

A. A. Kochneva, E. V. Borvinskaya, D. S. Bedulina, I. V. Sukhovskaya. A COMPARISON OF THE PROTEIN PROFILE OF *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* PLEROCERCIDS FROM DIFFERENT INTERMEDIATE HOSTS

The spectrum of proteins was studied in plerocercoids of parasitic cestodes *Triaenophorus nodulosus* collected from the liver of different species of fish: perch *Perca fluviatilis* L., ruffe *Gymnocephalus cernuus* L. and burbot *Lota lota* L. A comparison of protein extracts separated by 2D electrophoresis revealed 18 proteins whose concentrations differed among larvae of different fish species. Of these, 4 proteins were identified by using mass-spectrometric methods (MALDI-TOF/TOF, LC-MS): a carbohydrate metabolism enzyme triosephosphate isomerase, the proteins of microtubules tubulin α and β , and the G-protein signaling molecule. The elevated content of components of the G-protein pathway of the cytoskeleton and cell morphology regulation (tubulin and G-protein) in plerocer-

coids from perch in comparison with plerocercoids from burbot indicate a more dynamic cytoskeleton, increased cell proliferation and differentiation processes, and possibly more mature larvae in the former species. A higher level of expression of the key enzyme of glycolysis and signal transmission in plerocercoids from perch compared to plerocercoids from burbot indicates a greater metabolic activity in larvae from perch. The obtained results indicate that the expression of some proteins in *T. nodulosus* larvae is influenced by the habitat.

Key words: proteomics; helminths; *Triaenophorus*; Cestoda; intermediate hosts.

Введение

Ленточные черви (Cestoda) – широко распространенные и высокоспециализированные облигатные паразиты наземных и водных животных. Это одна из крупнейших и древнейших групп паразитических организмов на Земле, и весьма успешная, так как представители этого класса освоили в качестве среды обитания ткани и органы самых разнообразных животных. Их окончательными хозяевами главным образом являются различные позвоночные животные (в т. ч. человек), промежуточными – позвоночные и беспозвоночные организмы.

Жизненный цикл у ленточных червей сложный и включает последовательное заражение паразитом нескольких видов хозяев, зачастую очень далеких в систематическом отношении. Новый хозяин может сильно отличаться от предыдущего по образу жизни, составу внутренней среды, строению тела, а также по органу локализации паразита. Таким образом, для цестод характерна большая экологическая пластичность, в основе которой лежит способность паразитов при переходе на новый этап развития включать и выключать разные функциональные части генома, запуская соответствующие адаптивные биохимические, физиологические и морфологические изменения [Жигилева, 2017].

Кроме того, многие гельминты отличаются полигостальностью, то есть способностью на одной стадии жизненного цикла паразитировать на нескольких видах хозяев. Это свойство способствует устойчивости вида, так как позволяет паразитам выживать при сокращении численности одного из видов хозяев и расширять ареал обитания. При этом на разных этапах развития червя избирательность в отношении выбора хозяина может быть разной. Так, например, объекты данного исследования цестоды *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) на стадии личинки – корацидия – могут заражать более 19 видов планктонных рачков отрядов *Cyclopoida* и *Calanoida*, на стадии плероцеркоида инвазируют рыб из 6 отрядов и 18 семейств (*Percidae*, *Gadidae*, *Esocidae*, *Salmon-*

idae, *Osmoridae*, *Thymallidae*, *Cottidae*, *Cyprinidae* и др.), тогда как гермафродитное половозрелое поколение паразитирует почти исключительно в кишечнике щук *Esox* sp. [Куперман, 1973; Kuchta et al., 2007].

Несмотря на то что хозяева, заражаемые паразитом в конкретном периоде онтогенеза, обычно близки филогенетически и экологически, их внутренняя среда может существенно различаться и быть неодинаково благоприятной для развития гельминта. Эти вариации включают в себя разную интенсивность иммунного ответа на инвазию, разную метаболическую активность тканей [Крылов и др., 1993] и разный химический состав внутренней среды (доступность питательных веществ, наличие регуляторных и сигнальных молекул) и т. д. В результате, как было показано в экспериментальных условиях, один и тот же вид паразита с разной эффективностью заражает разные виды хозяев [Куперман, 1973]. В свою очередь, особи паразитов, заселившие разные виды, могут сильно отличаться друг от друга, вплоть до приобретения специфических морфологических признаков [Куперман, 1973; Гиценко, 1995; Аникиева, 1995, 1998; Аникиева, Доровских, 2009; Аникиева и др., 2015]. Таким образом, способность к полигостальности означает высокий уровень приспособительной изменчивости вида, то есть подразумевает наличие у паразита способности к существенным физиологическим и биохимическим перестройкам при адаптации к среде обитания.

В первую очередь подобные специфические изменения происходят на уровне профиля белков (протеома), так как именно белки реализуют генетически заданные программы и под действием факторов среды формируют фенотип особей. Поэтому сравнительный анализ протеомов гельминтов в зависимости от условий среды обитания является перспективным подходом для объяснения различной патогенности паразитов и их неодинаковой способности заражать разные виды хозяев.

В данной работе был исследован спектр белков личинок *T. nodulosus* (стадия плероцеркоида), извлеченных из печени разных видов

рыб: окуня *Perca fluviatilis*, ерша *Gymnocephalus cernuus* и налима *Lota lota*. Целью работы было выявление белков, содержание которых различается у червей, заразивших разных хозяев. Для этого проведено разделение экстрактов растворимого белка плероцеркоидов *T. nodulosus* методом двумерного электрофореза, сделан сравнительный анализ полученных электрофореграмм и масс-спектрометрическими методами осуществлена частичная идентификация белков гельминта.

Материалы и методы

Сбор и хранение образцов

Плероцеркоиды гельминтов были собраны из рыб, выловленных из водоемов Республики Карелия: в сентябре 2015 г. в Ладожском озере (окунь *Perca fluviatilis*, ерш *Gymnocephalus cernuus*); в феврале-марте 2016 г. в Онежском озере (налим *Lota lota*). Капсулы с плероцеркоидами извлекали после вскрытия из печени рыб. Затем капсулу надрезали хирургическими ножницами и вынимали личинку. Червя промывали в физиологическом растворе и осматривали под микроскопом. Живых, активно двигающихся личинок с хорошо различимым головным отделом (сколексом) отбирали и замораживали в жидком азоте до анализа.

Выделение и очистка растворимых белков *T. nodulosus*

Замороженных гельминтов растирали пес­тиком в ступке с жидким азотом с добавлением 0,1 М трис-НСl буфера, рН 7,6; коктейля ингибиторов протеаз (Protease inhibitor cocktail, Amresco) и фенолметансульфонилфторида (Sigma) до состояния порошка. После оттаивания и центрифугирования (7000 г при 3–4 °С, 15 мин) водорастворимую фракцию (супернатант) переносили в чистые пробирки, из которых отбирали аликвоты по 5 мкл для определения содержания белка в пробе [Bradford, 1976]. Белок из оставшегося супернатанта осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация 10 %). Затем осадок промывали ледяным 80% этанолом и двумя объемами холодного ацетона. После удаления ацетона высушенные осадки хранили до анализа при температуре –80 °С.

Разделение белков *T. nodulosus*

В день анализа очищенный белок растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины,

2% Triton X-100, 0,05 М дитиотриетол, 0,5% амфолиты с диапазоном рН 3,5–10 (BioRad) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фенолметансульфонилфторида (до конечных концентраций в растворе 1 %) [O'Farrell, 1975]. Образцы с содержанием общего белка 0,4–0,45 мг вносили в стеклянные капилляры, заполненные 3,84% полиакриламидным гелем с добавлением смеси амфолитов с диапазоном рН 3–10 и 5–7 (BioRad). Изоэлектрофокусирование проводили при помощи модифицированной системы BioRad Protean II Xi cell (США) в течение 18 ч, постепенно повышая силу тока от 100 до 900 мА. Затем гели извлекали из капилляров и инкубировали в растворе Лэммли (9% SDS, 6% β-меркаптоэтанол (объем/объем), 10% глицерин (объем/объем) с добавлением 2–5 мг бромфенолового синего в 0,2 М Трис-НСl, рН 6,7). Гели, полученные после изофокусирования, накладывали на 10% ПААГ-гели и проводили денатурирующий электрофорез по Лэммли [Laemmli, 1970] в ячейке системы BioRad Protean II Xi cell (США) с охлаждением. После проведения электрофореза гели были окрашены в течение 30 мин в растворе 0,2 % Кумасси G-250 в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте. Затем гели отмывали в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте 2 раза по 30 мин и помещали в дистиллированную воду на ночь. Окрашенные гели фотографировали при помощи системы гель-документации MiniLumi (Berthold Technologies).

Идентификация белков масс-спектрометрическими методами

Фрагменты геля, содержащие целевые белки, вырезали и измельчали ножницами. Для вымывания красителя и SDS фрагменты геля трижды промывали раствором 30 мМ Трис (Sigma), рН 8,2, в 50% ацетонитриле (LC-MS grade, LiChrosolv) в течение 15 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем фрагменты геля дегидратировали 100% ацетонитрилом. После удаления ацетонитрила пробы сушили на воздухе в течение 10 мин.

Для получения MALDI-масс-спектров к высушенному кусочку геля прибавляли 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0,05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37 °С, затем к раствору добавляли 7 мкл 0,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров.

По 0,5 мкл образца смешивали на мишени с раствором 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/мл в растворе 20% ацетонитрила и 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре (MALDI-TOF/TOF) Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007 %.

Для идентификации белков методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высушенные кусочки геля регидратировали в растворе трипсина (20 нг/мкл трипсина (Protein sequencing grade, Sigma), 30 мМ Трис, pH 8,2) на льду в течение часа, избыток раствора трипсина удаляли и вносили 45 мкл буфера для трипсинолиза (30 мМ Трис, pH 8,2). Трипсинолиз проводили в течение часа при 56 °С. Триптические пептиды экстрагировали из геля 50% ацетонитрилом, подкисленным 0,1% муравьиной кислотой (Sigma). Полученный раствор высушивали в вакуумном концентраторе CentriVap (Labronco) при 4 °С и растворяли в растворе 5% ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Хроматографическое разделение с последующей идентификацией белков было выполнено на базе ресурсного центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies), совмещенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies). Разделение пептидных фрагментов проводили в системе «вода – ацетонитрил» в присутствии 0,1% муравьиной кислоты (фаза А – 5% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота; фаза В – 90% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) в градиенте ацетонитрила (от 5 до 60 % фазы В за 25 мин и до 100 % фазы В за 5 мин) на колонке Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies; 3,5 мкм, внутренний диаметр 0,10 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин. Анализ ионов проводили с частотой 3,3 спектра в секунду в режиме автоматического тандемного MS/MS-анализа с материнскими ионами 2+, 3+, n+. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных UniProt и NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом.

Статистическая обработка данных

Для количественного анализа белка проводили сравнение оптических плотностей белковых пятен, полученных на двумерных электрофореграммах. Сравнительный анализ полученных белковых паттернов выполняли с помощью пользовательского расширения для программы обработки изображений ImageJ Software. Выборка для анализа содержала по три электрофореграммы для каждого промежуточного хозяина гельминта. Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрической статистики (Т-тест).

Результаты и обсуждение

В данной работе методом двумерного электрофореза растворимые белки *T. nodulosus* были разделены по заряду и по массе белковой молекулы. В результате получено девять электрофореграмм для плероцеркоидов из трех видов рыб – хозяев паразита. После компьютерной обработки изображений всех полученных полиакриламидных гелей их выравняли относительно друг друга, и был смоделирован суммарный гель, на котором разместили белковые паттерны всех образцов. Затем уникальный номер был присвоен каждому белковому пятну с одинаковыми координатами на всех гелях. После этого на каждом геле в области, соответствующей определенному пятну, измеряли оптическую плотность, которая, в свою очередь, зависит от концентрации белка в пятне.

Всего в пуле растворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* было выявлено около 170 белковых пятен. При сравнении оптической плотности выделенных областей на геле у плероцеркоидов из разных видов рыб статистически значимые различия интенсивности окраски были получены лишь для 18 белковых пятен (рис. 1, 2), из которых с помощью масс-спектрометрических методов (MALDI-TOF/TOF, LC-MS) с высокой степенью достоверности удалось идентифицировать четыре белка (табл.). Далее для удобства в тексте идентифицированные белки обозначены согласно их названию, а неидентифицированные белки обозначены порядковым номером на суммарном геле.

Низкий процент идентифицированных белков связан с тем, что исследуемый вид не является модельным, поэтому для него отсутствуют базы данных расшифрованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Так как в ходе анализа полу-

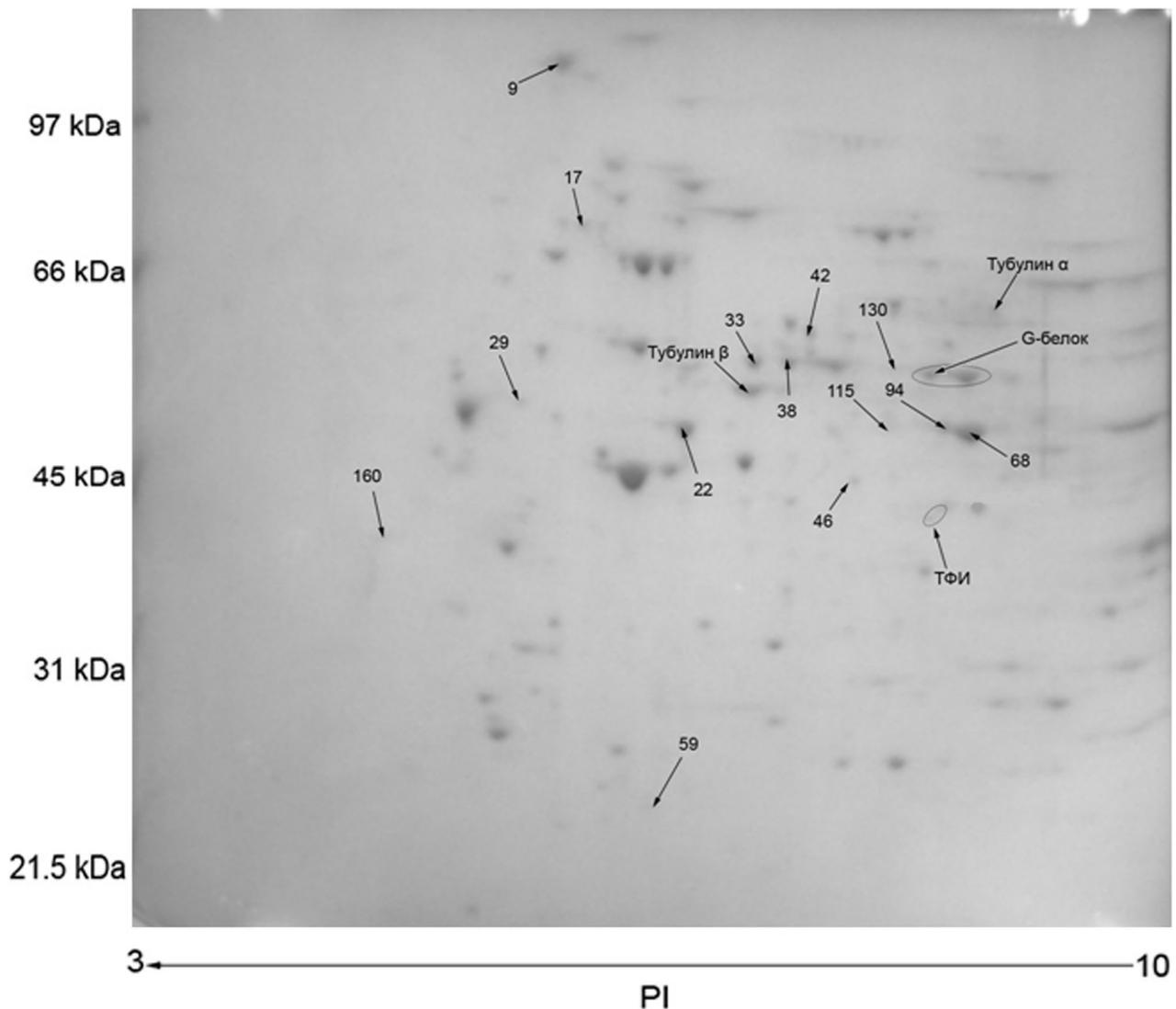


Рис. 1. Репрезентативная 2D-электрофореграмма водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*, на которой отмечены белковые пятна, различающиеся по оптической плотности при сравнении плероцеркоидов из различных хозяев

Fig. 1. Representative 2D electrophoregram of water-soluble proteins of the plerocercoids of *T. nodulosus*. Protein spots which differed in optical density in plerocercoids from different hosts are noted by arrows

ченные масс-спектры белков сравниваются с базами данных для близкородственных видов (*Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *H. nana*, *Taenia asiatica*, *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Hydatigera taeniaeformis*, *Mesocestoides corti* (<http://www.uniprot.org/proteomes/?query=Cestoda>)), полученные результаты могут свидетельствовать о значительных отличиях структуры белков *T. nodulosus* от структуры белков других цестод.

Больше всего отличий было выявлено при сравнении белковых экстрактов из плероцеркоидов окуня и налима (14 пятен), тогда как плероцеркоиды налима от плероцеркоидов ерша отличались по 5 пятнам, а ерша от окуня – по 4 пятнам.

Следует также отметить, что из 14 белков, по которым у плероцеркоидов из разных хозяев наблюдались различия, 11 имели наибольшую оптическую плотность у плероцеркоидов окуня. Иными словами, у личинок червя из окуня эти белки синтезируются и накапливаются наиболее интенсивно. В свою очередь, у плероцеркоидов из налима концентрация всех 14 белков была наименьшей по сравнению с плероцеркоидами из двух других видов хозяев.

Из полученных данных установлено, что больше всего белковый состав отличается у плероцеркоидов из окуня и налима. Сниженная экспрессия 14 из 170 белков *T. nodulosus* в печени налима, по сравнению с личинками из других рыб, может быть результатом обще-

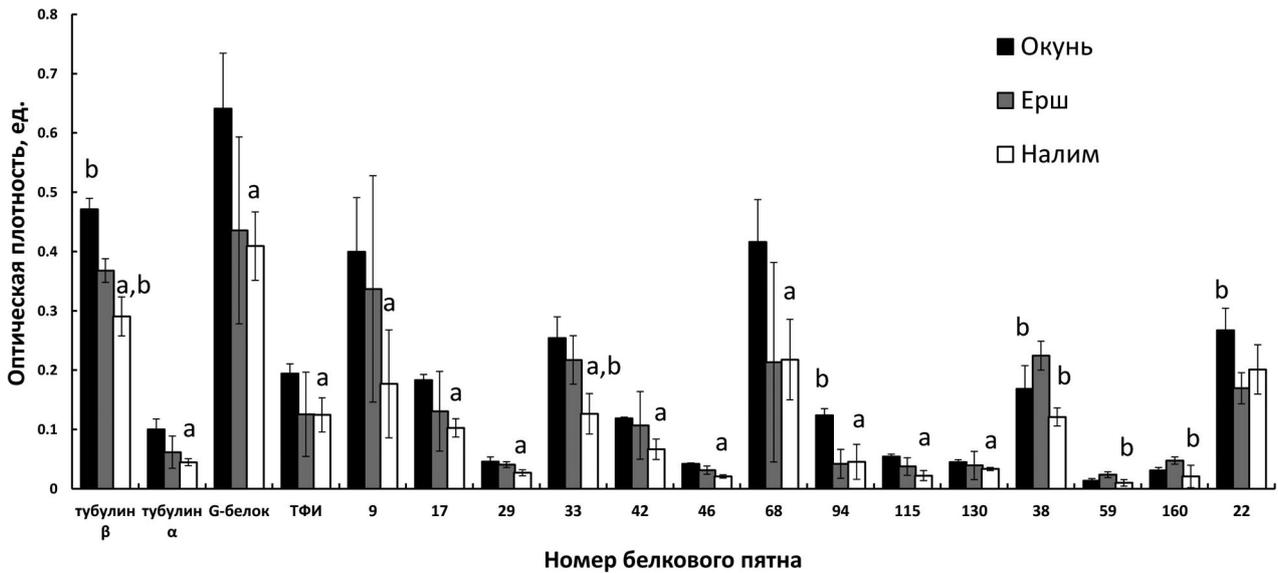


Рис. 2. Оптическая плотность некоторых белковых пятен на 2D-электрофореграммах водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из разных хозяев:

a – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из окуня ($p < 0.05$)

b – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из ерша ($p < 0.05$)

Fig. 2. Optical density of some protein spots on 2D electrophoregrams of water-soluble protein of *T. nodulosus* plerocercoids from different hosts:

a – the differences are statistically significant in comparison with the plerocercoids from perch ($p < 0.05$)

b – the differences are statistically significant in comparison with the plerocercoids from the ruff ($p < 0.05$)

го замедления уровня обмена веществ паразитов и их хозяев в холодное время года (налим пойман зимой, а ерш и окунь осенью), а также отражать разную степень агрессивности среды для развития червя в разных видах хозяев. Динамика зараженности промежуточных хозяев в природе указывает на низкую резистентность налимов к заражению личинками *T. nodulosus*. Согласно Куперману [1973], из исследованных рыб европейской части России (корюшка, налим, щука, окунь) только у налима встречалась зараженность в количестве 7 и более плероцеркоидов на рыбу, при этом количество рыб с такой интенсивностью заражения составляло 43 % (при 88 % общей зараженности популяции) [Куперман, 1973]. Более благоприятные условия, позволяющие развиваться червям в налиме, предположительно, позволяют плероцеркоидам экономить на синтезе специфических белков, необходимых для поддержания жизнедеятельности и противодействия защитным реакциям хозяина. Окунь, в отличие от налимов, способен сопротивляться массивному заражению *T. nodulosus*, так как в природе чаще всего заражены всего одной особью гельминта (до 89 % рыб), тогда как особи с 7 и более плероцеркоидами не встречаются вовсе (при общей 42% зараженности популяции). Известно, что в большинстве водоемов само-

воспроизводство *T. nodulosus* происходит преимущественно именно через популяционные группировки, заражающие окуня, и это говорит о длительной коэволюции данных видов и, как следствие, формировании устойчивых и сбалансированных ценологических отношений [Иешко, 1988].

Нами было показано, что только один белок – тубулин β – имел разную экспрессию у всех трех видов хозяев. Наибольшая концентрация этой изоформы тубулина была у окуня, меньше белка обнаружено у ерша и меньше всего – у налима (рис. 3). Кроме того, содержание другой субъединицы тубулина α было больше у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима. Из тубулина состоят микротрубочки – структуры, образующие цитоскелет, центриоли и веретено деления, которые необходимы для внутриклеточного транспорта, поддержания формы клеток и деления [Alberts et al., 1994]. Эти белки являются обязательными компонентами протеома любого организма и ранее были описаны у таких видов паразитических червей, как *E. multilocularis*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma bovis* и др. [Wang et al., 2009; De la Torre Escudero et al., 2011].

Еще один белок, содержание которого существенно выше у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима,

Результаты идентификации белков плероцеркоидов *T. nodulosus* по степени совпадения с белковыми последовательностями родственных видов из базы данных Swissprot

Results of proteins identification of *T. nodulosus* plerocercoids according to the coincidence with the protein sequences from the Swissprot database for related species

Название белка Protein name	Родственный вид Related specie	ID аминокислотной последовательности белка родственного вида в базе данных GeneBank ID of amino acid sequence of protein of a related species in the GeneBank database	$M_r_{\text{теор}}/M_r_{\text{факт}}$ кДа $M_r_{\text{theoretical}}/M_r_{\text{actual}}$ kDa	Функциональная аннотация согласно базе данных Gene Ontology [GO Consortium, 2017] Functional annotation according to Gene Ontology database [GO Consortium, 2017]
Тубулин β Tubulin β	<i>Echinococcus multilocularis</i>	CAB91641.1	50/55	<p>Молекулярная функция: связывание ГТФ, ГТФазная активность, связывание нуклеотидов, структурный компонент цитоскелета.</p> <p>Биологический процесс: организация цитоскелета, образование микротрубочек.</p> <p>Клеточный компонент: цитоскелет, микротрубочки, цитоплазма.</p> <p>Molecular function: GTP binding, GTPase activity, nucleotide binding, structural constituent of cytoskeleton.</p> <p>Biological process: cytoskeleton organization, microtubule-based process.</p> <p>Cellular component: cytoskeleton, microtubule, cytoplasm.</p>
Тубулин α Tubulin α	<i>Hymenolepis microstoma</i>	CDS29993.2	49/64	
G-белок G-protein	<i>Echinococcus granulosus</i>	CDS20642.1.	33/55	<p>Молекулярная функция: ARF гуанилнуклеотид-обменный фактор; связывание рРНК, структурный компонент рибосом, трансдукция сигнала, связывание комплекса бета/гамма субъединицы G-белка, ГТФазная активность, связывание ГТФ, связывание рецептора G-белка; связывание ионов металла; Rho гуанилнуклеотид-обменный фактор, связывание гуанилнуклеотида.</p> <p>Биологический процесс: регуляция трансдукции сигнала через ARF-белок; трансляция; путь передачи сигнальный путь через рецептор G-белка.</p> <p>Клеточный компонент: рибосомы; гетеротримерный комплекс G-белка.</p> <p>Molecular function: guanyl-nucleotide exchange factor activity, rRNA binding, structural constituent of ribosome, signal transducer activity, G-protein beta/gamma-subunit complex binding, GTPase activity, GTP binding, G-protein coupled receptor binding, metal ion binding, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity guanyl nucleotide binding.</p> <p>Biological process: regulation of ARF protein signal transduction, translation, G-protein coupled receptor signaling pathway.</p> <p>Cellular component: ribosomes, heterotrimeric G-protein complex.</p>
Триозофосфатизомераза (ТФИ) Triosephosphate isomerase	<i>Spirometra erinaceieuropaei</i>	AFX72997.1.	27/42	<p>Биологический процесс: гликолиз, глюконеогенез; пентозофосфатный путь; метаболический процесс.</p> <p>Молекулярная функция: триозофосфатизомеразная активность; каталитическая активность; изомеразная активность.</p> <p>Biological process: glycolysis, gluconeogenesis, pentose-phosphate shunt, metabolic process.</p> <p>Molecular function: triose-phosphate isomerase activity, catalytic activity, isomerase activity.</p>

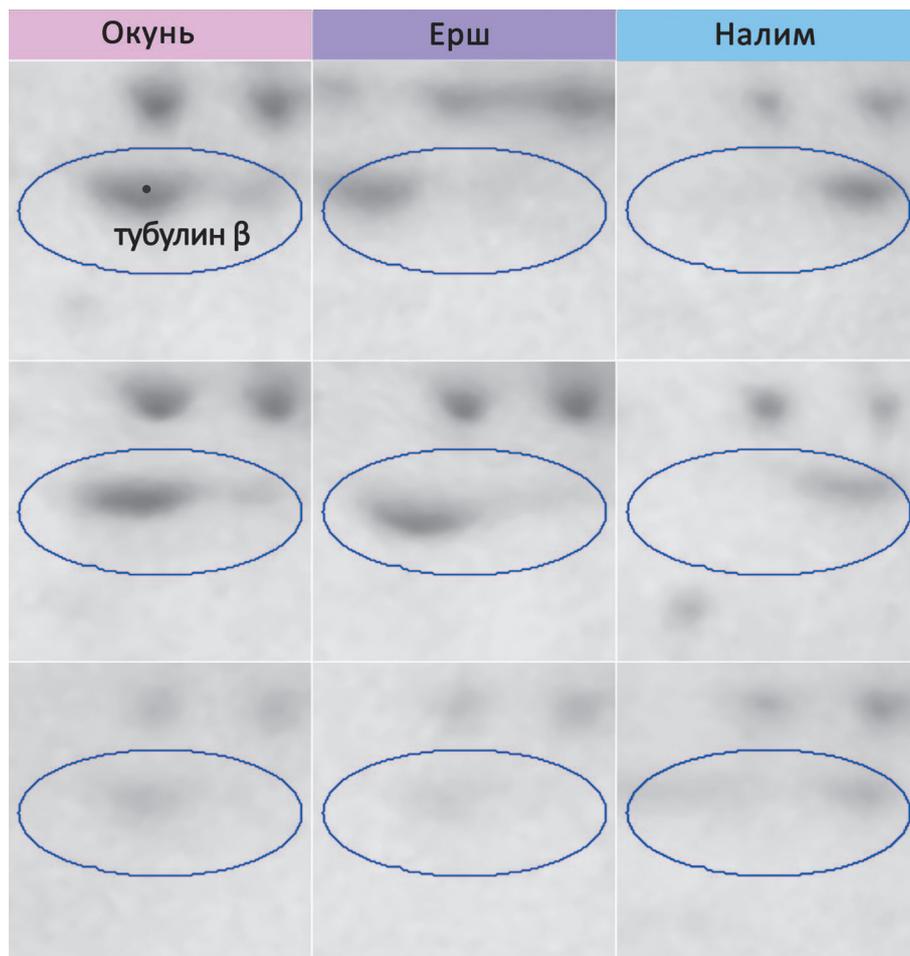


Рис. 3. Изображения области пятна № 24 (обведено), содержащего тубулин β , на 2D-электрофореграммах белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных промежуточных хозяев

Fig. 3. Images of the area of spot No. 24 (surrounded) containing tubulin β on the 2D electrophoregrams of the proteins of the plerocercoids of *T. nodulosus* from various intermediate hosts

был идентифицирован как принадлежащий к семейству G-белков. Это сигнальные молекулы, участвующие в качестве посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах. Белок необходим для передачи информации от клеточных рецепторов, взаимодействующих с гормонами, нейротрансмиттерами, хемокинами и т. д. к эффекторам, отвечающим на это воздействие. G-белок принимает участие в регуляции жизненно важных процессов, например в эмбриональном развитии и поддержании гомеостаза в изменяющихся условиях среды [Neves et al., 2002].

Синхронное изменение содержания G-белка и мономерных форм тубулинов у плероцеркоидов из трех хозяев может свидетельствовать о том, что они задействованы в общем метаболическом пути, а именно в сигнальном пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточ-

ной морфологии [Yu et al., 2009; Schappi et al., 2014]. Известно, что субъединицы тубулина β обладают ГТФазной активностью и способны непосредственно связываться с альфа-субъединицей G-белков, что приводит к распаду тубулина на мономеры и к дезорганизации микротрубочек. Полученные данные могут указывать на то, что клетки плероцеркоидов из окуня имеют более динамичный цитоскелет, возможно, как результат более активных процессов пролиферации и дифференцировки под действием факторов среды. Ранее Куперман [1973] с помощью электронной микроскопии показал, что у плероцеркоидов уже имеются зачатки всех систем, характерных для половозрелых особей, однако они могут сильно различаться по степени развития органов. Выявленные вариации содержания тубулина у плероцеркоидов из всех трех изученных видов рыб могут

косвенно указывать на наличие у них морфологических различий на клеточном и тканевом уровне, и в том числе на разную степень зрелости личинок. Дополнительные гистологические исследования требуются для подтверждения данного предположения.

Еще в одной из областей на электрофореграммах, оптическая плотность в которой была достоверно выше у плероцеркоидов из окуня, чем у плероцеркоидов из налима, масс-спектрометрическими методами удалось идентифицировать две изоформы фермента углеводного обмена триозофосфатизомеразы, на геле представленных в виде функциональных димеров. Данный фермент участвует в процессе расщепления глюкозы – главного источника энергии для паразитических червей, которую они, как правило, извлекают из организма хозяина [Krautz-Peterson et al., 2010]. Более высокий уровень экспрессии одного из ключевых ферментов гликолиза и передачи сигнала у плероцеркоидов окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима в целом свидетельствует о большей метаболической активности первых и менее интенсивном питании и обмене у вторых.

Следует также отметить, что помимо влияния сезона отбора проб и биохимического состава тканей хозяина выявленные различия содержания белков могут быть результатом генетических различий между отдельными популяциями паразитов, преимущественно выживающих в разных видах хозяев. Наличие таких генетически обособленных гостальных группировок было показано ранее [Van Putten et al., 2005], и для учета этого фактора требуется провести дополнительное генетическое исследование собранного полевого материала.

Полученные в данном исследовании масс-спектры белков *T. nodulosus* сравнивали также с базами данных белковых последовательностей рыб. Поглощение цистой белков хозяина было показано ранее на примере метацестод свиного цепня *Taenia solium* и финн *E. granulosus* [Victor et al., 2012; Cui et al., 2013]. Согласно литературным данным, в микроокружении паразита часто встречаются белки апоптоза и иммунного ответа хозяина, а также структурные белки и белки крови, возможно, попадающие в цисту в результате разрушения под действием протеолитических ферментов питающейся личинки. Так, пептидные фрагменты иммуноглобулинов, гемоглобина и транспортных белков крови свиньи были обнаружены в содержимом секреторных продуктов метацестоды свиного цепня *T. solium*, тогда как среди белков собственно паразита присутствовали различные протеазы цистеинового и треонинового

типа [Victor et al., 2012]. Также в окружении личинок встречаются белки хозяина, участвующие в поддержании обмена веществ, и сигнальные молекулы, что свидетельствует о химической коммуникации между паразитом и его хозяином. В настоящем исследовании среди белков, содержание которых различалось в экстрактах червей из разных хозяев, белков рыб не было обнаружено. Это косвенно (на уровне содержания мажорных белков – маркеров иммунного ответа) свидетельствует о сходном уровне воспаления в непосредственной близости от личинок. Тем не менее требуются дополнительные исследования белкового состава содержимого цисты, чтобы уточнить этот вопрос.

Заключение

Полученные результаты показывают, что среда обитания оказывает влияние на гельминта *T. nodulosus* на стадии инкапсулированной малоактивной личинки. На биохимическом уровне этот эффект проявляется в модификации содержания у личинок червя ряда белков. Среди идентифицированных нами белков, принимающих участие в этом процессе, присутствуют структурные белки, что, вероятно, связано с особенностью роста и развития личинок в разных видах хозяев. Также важную функцию выполняют сигнальные молекулы и ферменты гликолиза.

Мы предположили, что личинки из окуня находятся в менее благоприятных условиях по сравнению с личинками из налима, так как, судя по более высокой экспрессии ряда белков, они метаболически более активны. Личинки из ерша по этим показателям занимают промежуточное положение. Эти результаты могут отражать как влияние абиотических факторов (температура окружающей среды), так и биохимическую разнокачественность микросреды, формируемой хозяевами из разных таксономических групп (окунь и ерш – семейство Окуневые, налим – Тресковые).

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

Литература

Аникиева Л. В. Морфологическая изменчивость цестод рода *Proteocephalus* (Cestoda, Proteocephalidae) при паразитировании в факультативных хозяевах // Паразитология. 1995. Т. 29, № 6. С. 505–510.

Аникиева Л. В. Принципы популяционной морфологии в систематике цестод // Проблемы цестодологии. 1998. С. 33–40.

Аникиева Л. В., Доровских Г. Н. Полиморфизм и внутривидовая изменчивость специфического паразита корюшек – цестоды *Proteocephalus tetrastomus* (Rudolphi, 1810) (Cestoda: *Proteocephalidae*) // Паразитология. 2009. Т. 43, № 4. С. 309–316.

Аникиева Л. В., Иешко Е. П., Лебедева Д. И. Морфологическая изменчивость цестоды *Proteocephalus percae* (Müller 1780), паразитирующей у сиговых рыб // Паразитология. 2015. Т. 49, № 3. С. 160–170.

Гиченок А. А. Изменчивость и фенотипическое разнообразие скребня *Echinorhynchus gadi* (*Acanthoserphala*) из двух видов беломорских рыб // Зоологический журнал. 1995. Т. 74, № 8. С. 15–62.

Жигилева О. Н. Взаимосвязь зараженности гельминтами и генетического разнообразия популяций животных: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Тюмень, 2017. 415 с.

Крылов Ю. М. Активность ЛДГ и изменение спектра ее изоферментов в печени леща *Abramis brama* при паразитировании плероцеркоидов цестоды *Digamma interrupta* // Паразитология. 1993. Т. 27, № 4. С. 332–335.

Куперман Б. И. Ленточные черви рода *Triaenophorus* – паразиты рыб (экспериментальная систематика, экология). Л.: Наука, 1973. 207 с.

Иешко Е. П. Популяционная биология гельминтов рыб. Л.: Наука, 1988. 118 с.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell (third edition). New York; London: Garland Publ., 1994. 1361 p. doi: 10.1016/0307-4412(94) 90059-0

Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cui S. J., Xu L. L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C. Y., Feng Z., Yang P. Y., Hu W., Liu F. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host – parasite interactions // J. Proteom. 2013. Vol. 84. P. 158–175. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.013

De la Torre Escudero E., Manzano-Román R., Valero L., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Hernández-González A., Siles-Lucas M. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula // J. Proteom. 2011. Vol. 74. P. 1534–1544. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.024

GO Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources // Nucleic Acids Re-

search. 2017. Vol. 45. P. 331–338. doi: 10.1093/nar/gkw1108

Krautz-Peterson G., Simoes M., Faghiri Z., Ndegwa D., Oliveira G., Shoemaker C. B., Skelly P. J. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host // PLoS Pathog. 2010. Vol. 6, no. 6. e1000932. doi: 10.1371/journal.ppat.1000932

Kuchta R., Vlcková R., Poddubnaya L. G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidae): evidence from morphometric analysis of scolex hooks // Folia Parasitol (Praha). 2007. Vol. 54, no. 1. P. 34–42. doi: 10.14411/fp.2007.005

Laemmli U. K. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. G protein pathways // Science. 2002. Vol. 296. P. 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550

O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250, no. 10. P. 4007–4021.

Schappi J. M., Krbanjevic A., Rasenick M. M. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1838, no. 2. P. 674–681. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.026

Van Putten W. F., Biere A., Van Damme J. M. M. Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica* // J. Evol. Biol. 2005. Vol. 18, no. 1. P. 203–212. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00771.x

Victor B., Kanobana K., Gabrie S., Polman K., Deckers N., Dorny P., Deelder A. M., Palmblad M. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion – secretion proteins // Proteomics. 2012. Vol. 12. P. 1860–1869. doi: 10.1002/pmic.201100496

Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry // Experimental Parasitology. 2009. Vol. 123, no. 2. P. 162–167. doi: 10.1016/j.exppara.2009.06.014

Yu J. Z., Dave R. H., Allen J. A., Sarma T., Rasenick M. M. Cytosolic G {alpha} s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284, no. 16. P. 10462–10472. doi: 10.1074/jbc.M809166200

Поступила в редакцию 08.08.2018

References

Anikieva L. V. Morfologicheskaya izmenchivost' tsestod roda *Proteocephalus* (Cestoda, *Proteocephalidae*) pri parazitirovanii v fakul'tativnykh khozyaevakh [Morphological variability of cestodes of the genus *Proteocephalus* (Cestoda, *Proteocephalidae*) parasitizing in facultative hosts]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1995. Vol. 29, no. 6. P. 505–510.

Anikieva L. V. Printsipy populyatsionnoi morfologii v sistematike tsestod [Principles of population morphology in the systematics of cestodes]. *Probl. tsestodologii* [Issues of Cestodology]. 1998. P. 33–40.

Anikieva L. V., Dorovskikh G. N. Polimorfizm i vnutrividovaya izmenchivost' spetsifichnogo parazita korjushek – cestody *Proteocephalus tetrastomus* (Ru-

dolphi, 1810) (Cestoda: Proteocephalidea) [Polymorphism and intraspecific variability of a specific parasite of smelt – cestodes *Proteocephalus tetraostomus* (Rudolphi, 1810) (Cestoda: Proteocephalidea)]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 2009. Vol. 43, no. 4. P. 309–316.

Anikieva L. V., Ieshko E. P., Lebedeva D. I. Morfolo­gicheskaya izmenchivost' tsestody *Proteocephalus percae* (Müller 1780), parazitiruyushchei u sigovykh ryb [Morphological variability of whitefish parasite cestode *Proteocephalus percae* (Müller 1780)]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 2015. Vol. 49, no. 3. P. 160–170.

Gichenok A. A. Izmenchivost' i fenotipicheskoe raznoobrazie skrebnya *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) iz dvukh vidov belomorskikh ryb [Variability and phenotypic diversity of acanthocephala *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) from two species of the White Sea fish]. *Zool. zhurn.* [Zool. J.]. 1995. Vol. 74, no. 8. P. 15–62.

Ieshko E. P. Populyatsionnaya biologiya gel'mintov ryb [Population biology of fish helminths]. Leningrad: Nauka, 1988. 118 p.

Krylov Yu. M. Aktivnost' LDG i izmenenie spektra ee izofermentov v pecheni Ieshcha *Abramis brama* pri parazitirovaniy plerotserkoidov tsestody *Digamma interrupta* [LDH activity and changes in the spectrum of its isoenzymes in the liver of *Abramis brama* bream infected by plerocercoids of cestoda *Digamma interrupta*]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1993. Vol. 27, no. 4. P. 332–335.

Kuperman B. I. Lentochnye chervi roda *Triaenophorus* – parazity ryb (eksperimental'naya sistematika, ekologiya) [Tapeworms of the genus *Triaenophorus* are parasites of fish (experimental systematics, ecology)]. Leningrad: Nauka, 1973. 207 p.

Zhigileva O. N. Vzaimosvyaz' zarazhennosti gel'mintami i geneticheskogo raznoobraziya populyatsii zhi­votnykh [Interrelation of helminth infection and genetic diversity of animal populations]: Summary of DSc (Dr of Biol.) thesis. Tyumen', 2017. 415 p.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular biology of the cell (third edition). New York; London: Garland Publ., 1994. 1361 p. doi: 10.1016/0307-4412(94)90059-0

Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cui S. J., Xu L. L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C. Y., Feng Z., Yang P. Y., Hu W., Liu F. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host – parasite interactions. *J. Proteom.* 2013. Vol. 84. P. 158–175. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.013

De la TorreEscudero E., Manzano-Román R., Valero L., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Hernández-González A., Siles-Lucas M. Comparative proteomic analysis of *Fas-*

ciola hepatica juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula. *J. Proteom.* 2011. Vol. 74. P. 1534–1544. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.024

GO Consortium. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Research.* 2017. Vol. 45. P. 331–338. doi: 10.1093/nar/gkw1108

Krautz-Peterson G., Simoes M., Faghiri Z., Ndegwa D., Oliveira G., Shoemaker C. B., Skelly P. J. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS Pathog.* 2010. Vol. 6, no. 6. e1000932. doi: 10.1371/journal.ppat.1000932

Kuchta R., Vlcková R., Poddubnaya L. G., Gustinelli A., Dzika E., Scholz T. Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus* tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea): evidence from morphometric analysis of scolex hooks. *Folia Parasitol (Praha)*. 2007. Vol. 54, no. 1. P. 34–42. doi: 10.14411/fp.2007.005

Laemmli U. K. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.

Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002. Vol. 296. P. 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550

O'Farrell P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, no. 10. P. 4007–4021.

Schappi J. M., Krbanjevic A., Rasenick M. M. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1838, no. 2. P. 674–681. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.08.026

Van Putten W. F., Biere A., Van Damme J. M. M. Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica*. *J. Evol. Biol.* 2005. Vol. 18, no. 1. P. 203–212. doi: 10.1111/j.1420-9101.2004.00771.x

Victor B., Kanobana K., Gabrie S., Polman K., Deckers N., Dorny P., Deelder A. M., Palmblad M. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion – secretion proteins. *Proteomics*. 2012. Vol. 12. P. 1860–1869. doi: 10.1002/pmic.201100496

Wang Y., Cheng Z., Lu X., Tang C. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental Parasitology*. 2009. Vol. 123, no. 2. P. 162–167. doi: 10.1016/j.exppara.2009.06.014

Yu J. Z., Dave R. H., Allen J. A., Sarma T., Rasenick M. M. Cytosolic G {alpha} s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, no. 16. P. 10462–10472. doi: 10.1074/jbc.M809166200

Received August 08, 2018

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кочнева Альбина Александровна

младший научный сотрудник лаб. экологической биохимии
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kochnevaalbina@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Борвинская Екатерина Витальевна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: borvinska@gmail.com
тел.: (8142) 769810

Бедулина Дарья Сергеевна

старший научный сотрудник
лаб. «Проблемы адаптации биосистем»
Иркутский государственный университет, НИИ биологии
ул. Ленина, 3, Иркутск, Россия, 664003
эл. почта: daria.bedulina@gmail.com
тел.: (3952) 243077

Суховская Ирина Викторовна

научный сотрудник лаб. экологической биохимии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: sukhovskaya@inbox.ru
тел.: (8142) 769810

CONTRIBUTORS:

Kochneva, Albina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kochnevaalbina@gmail.com
tel.: (8142) 769810

Borvinskaya, Ekaterina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: borvinska@gmail.com
tel.: (8142) 769810

Bedulina, Darya

Institute of Biology at Irkutsk State University
3 Lenin St., 664003 Irkutsk, Russia
e-mail: daria.bedulina@gmail.com
tel.: (3952) 243077

Sukhovskaya, Irina

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: sukhovskaya@inbox.ru
tel.: (8142) 769810