

ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «МОРСКАЯ БИОЛОГИЯ В 21 ВЕКЕ:
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ МОРСКИХ
ОРГАНИЗМОВ»

Вайнутис К.С., Воронова А.Н.

3D-МОДЕЛИРОВАНИЕ АЛЛЕРГЕННЫХ БЕЛКОВ ЗООНОЗНОЙ НЕМАТОДЫ
ANISAKIS SIMPLEX (ASCARIDIDA: ANISAKIDAE)

Владивосток, 2023

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ

Biota

Царство Животные

Тип Круглые черви

Класс Chromadorea

Подкласс Chromadoria

Отряд Rhabditida

Подотряд Spirurina

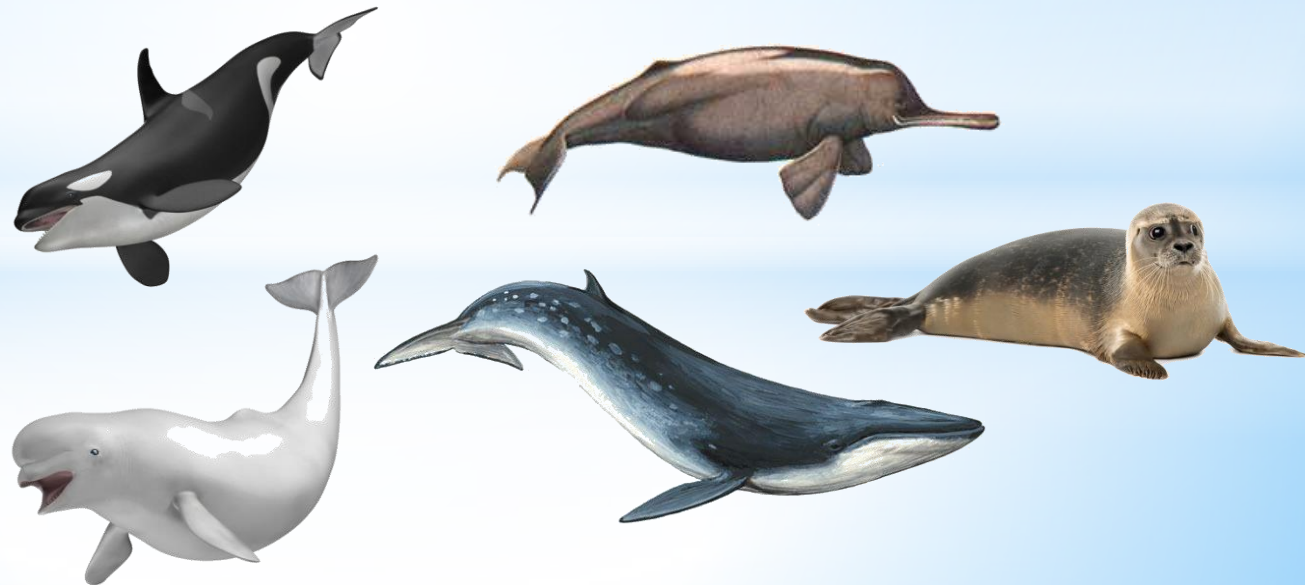
Инфраотряд Ascaridomorpha

Надсемейство Ascaridoidea

Семейство Anisakidae



Рисунок 1. – Фотография исследуемого круглого червя. А – *Anisakis simplex* (Münster et al., 2015); Б – личинка третьего поколения *A. simplex*, извлечённая из фарша камчатской нерки (По: Safonova et al., 2021).



ПАТОГЕННОСТЬ

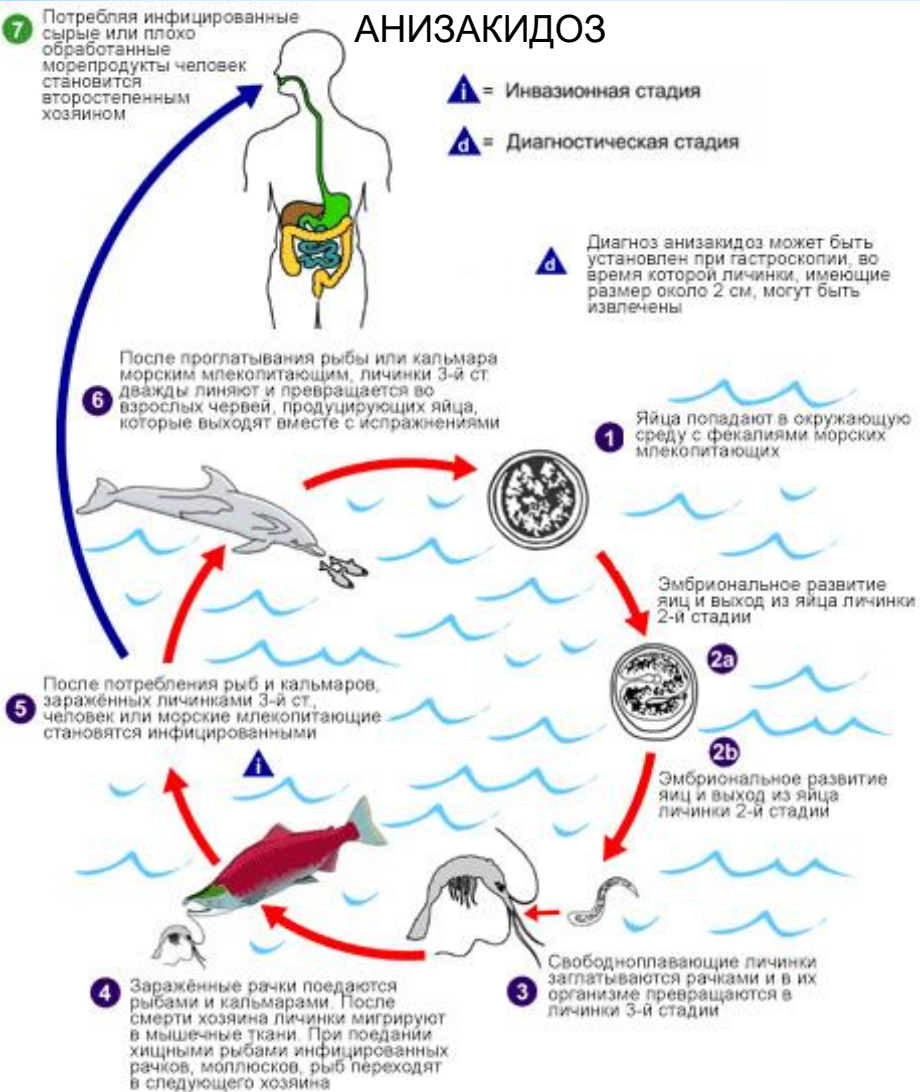
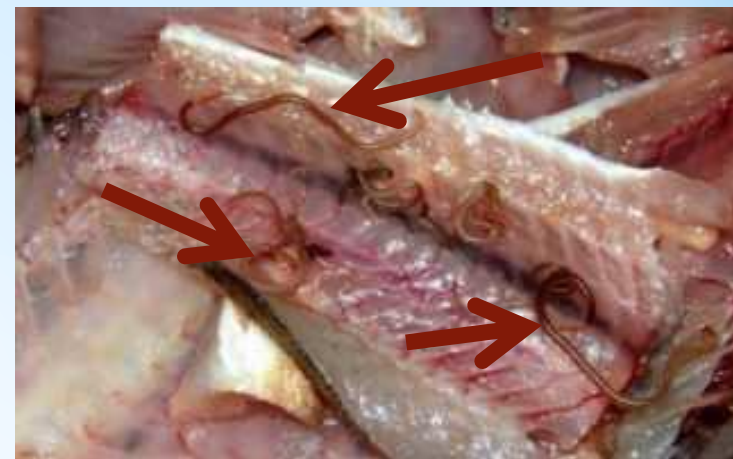


Рисунок 2. – Жизненный цикл *Anisakis simplex*



Аллергенные белки анизакиса могут вступать в кросс-иммунную реакцию с таковыми некоторых беспозвоночных: пылевые клещи, таракан *Blattella germanica*, печеночная двуустка *Clonorchis sinensis*, «водяная блоха» *Daphnia*, Chironomid spp. и креветка *Pandalus borealis*.

ОСНОВНЫЕ АЛЛЕРГЕННЫЕ БЕЛКИ АНИЗАКИД

Таблица 1. Аллергены *Anisakis simplex*. По: González-Fernández et al., 2015; Ivanovic et al., 2015; Kobayashi et al., 2015.

Аллерген	Молекулярная масса (кДа)	По расположению в тканях нематоды	Тип/семейство протеина	Реакция у сенсibilизированных пациентов
Ani s 1	24	ЭС*	Ингибитор сериновой протеазы типа Кунитц	85%
Ani s 2	97	Соматический	Парамиозин	88%
Ani s 3	41	Соматический	Тропомиозин	Неизвестно
Ani s 4	9	ЭС	Цистатин	27%
Ani s 5	15	ЭС	Семейство SXP/RAL-2	25%-49%
Ani s 6	7	ЭС	Серпин	18%
Ani s 7	139	ЭС	Гликопротеин	83%-100%
Ani s 8	15	ЭС	Семейство SXP/RAL-2	25%
Ani s 9	14	ЭС	Семейство SXP/RAL-2	13%
Ani s 10	22	Неизвестно	Неизвестен	39%
Ani s 11	55	Неизвестно	Неизвестен	47%
Ani s 12	33	Неизвестно	Неизвестен	57%
Ani s 13	37	ЭС	Гемоглобин	Неизвестно
Ani s 14	23.5	Неизвестно	Неизвестен	Неизвестно

*Примечание: ЭС – экскреторно-секреторный белок.

ОСНОВНЫЕ АЛЛЕРГЕННЫЕ БЕЛКИ АНИЗАКИД

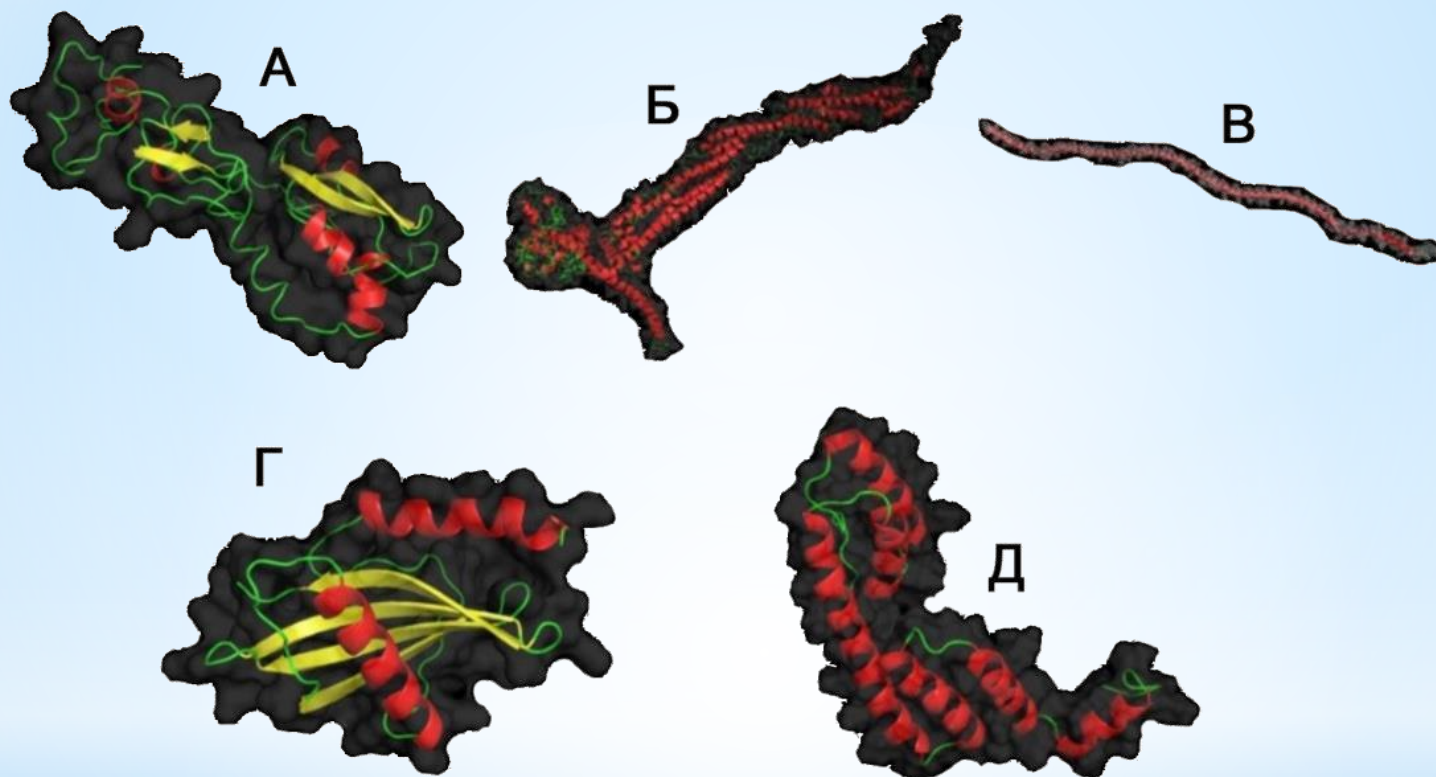


Рисунок 3. – Изображения пяти аллергенных белков *Anisakis simplex*. А – Ani s 1; Б – параамиозин Ani s 2; В – тропомиозин Ani s 3; Г – цистатин Ani s 4; Д – Ani s 5 (По: Kochanowski et al., 2020).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ



WHO/IUIS Allergen Nomenclature



Открытая база данных
последовательностей белков



Программа Mega X (Kumar et al., 2018) для сборки и выравнивания нуклеотидных последовательностей и их перевода в аминокислотные



Онлайн-программа Phyre2 (Kelley et al., 2015)
для реконструкции третичных структур
белков

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПЕРВЫХ ШЕСТИ АЛЛЕРГЕННЫХ БЕЛКОВ *ANISAKIS SIMPLEX*

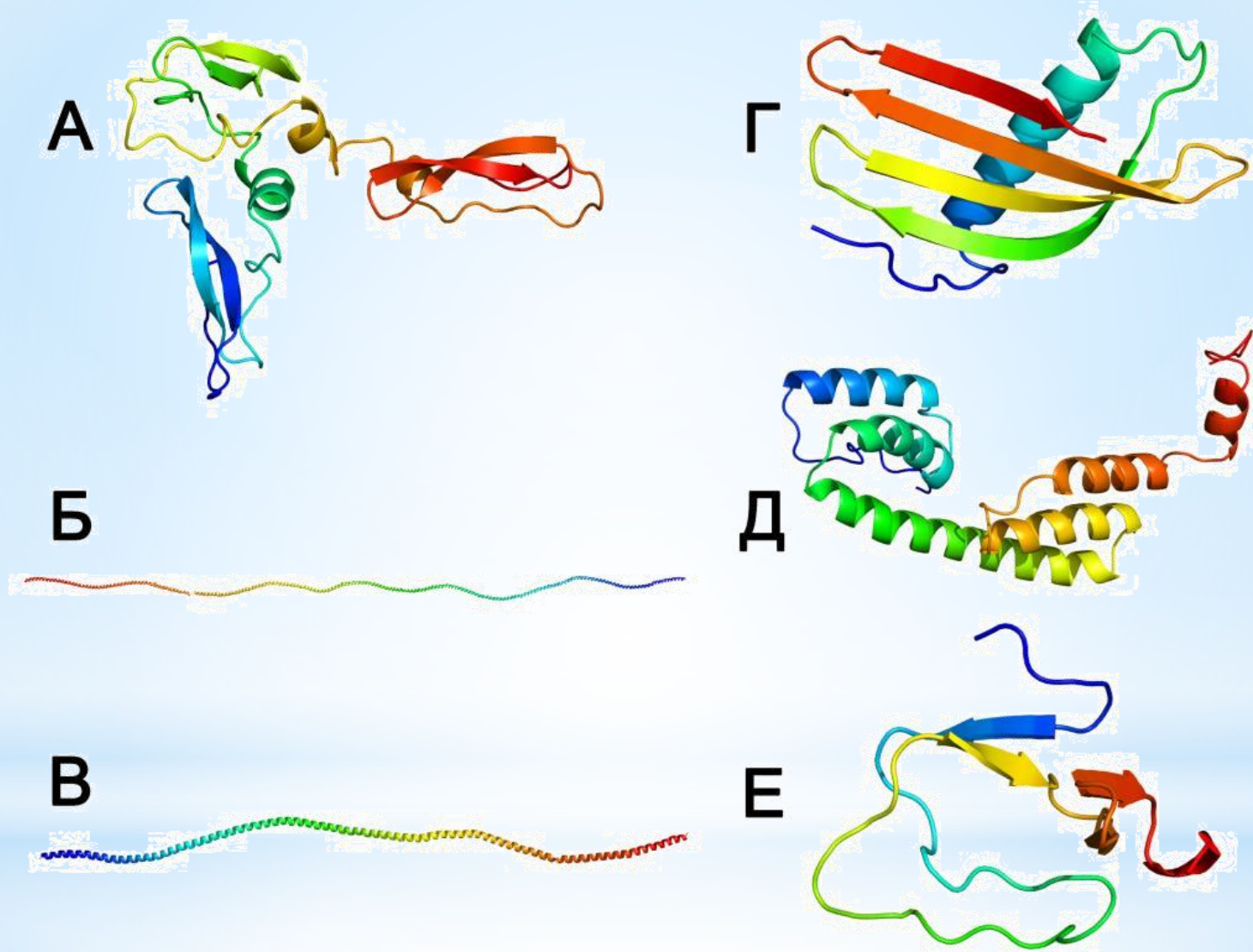


Рисунок 4. – Трёхмерная структура шести аллергенных белков *Anisakis simplex*. А – Ani s 1 на основе ; Б – парамиозин Ani s 2; В – тропомиозин Ani s 3; Г – цистатин Ani s 4; Д – Ani s 5; Е - Ani s 6.

Белок Ani s 1

Входит в семейство белков-ингибиторов сериновых протеаз типа Кунитца – бычий панкреатический ингибитор трипсина (англ. BPTI). Устойчив к термической обработке. Участвует в экскреторной функции, локализован в теле червя в выделительных железах (Gómez-Aguado et al., 2003). Связывается с IgE. Белок *Ani s 1* создаёт дисульфидный мостик, ингибирует активность сериновых эндопептидаз (протеаза с серином в активном центре). Отвечает за расщепление белков до α -аминокислот путём гидролиза неконцевых пептидных связей.



FirstGlance in Jmol



Рисунок 5. – Два варианта трёхмерной структуры белка Ani s 1 вида *Anisakis simplex*. А – на основе последовательности JX986996; Б – на основе JX986995.

Парамиозин Ani s 2

Парамиозин – соматический антиген, входит в группу паналлергенов. Не считая самого крупного из известных аллергена Ani s 7, белок Ani s 2 отличается наибольшей длиной, а по своей структуре представляет свёрнутую α -спираль (рис. 9). Молекулярная масса парамиозина наибольшая среди прочих аллергенных белков – 97 кДа (Pérez-Pérez et al., 2000). В природе имеет три гомолога среди парамиозинов (Guarneri et al., 2007) пылевых клещей: *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*.

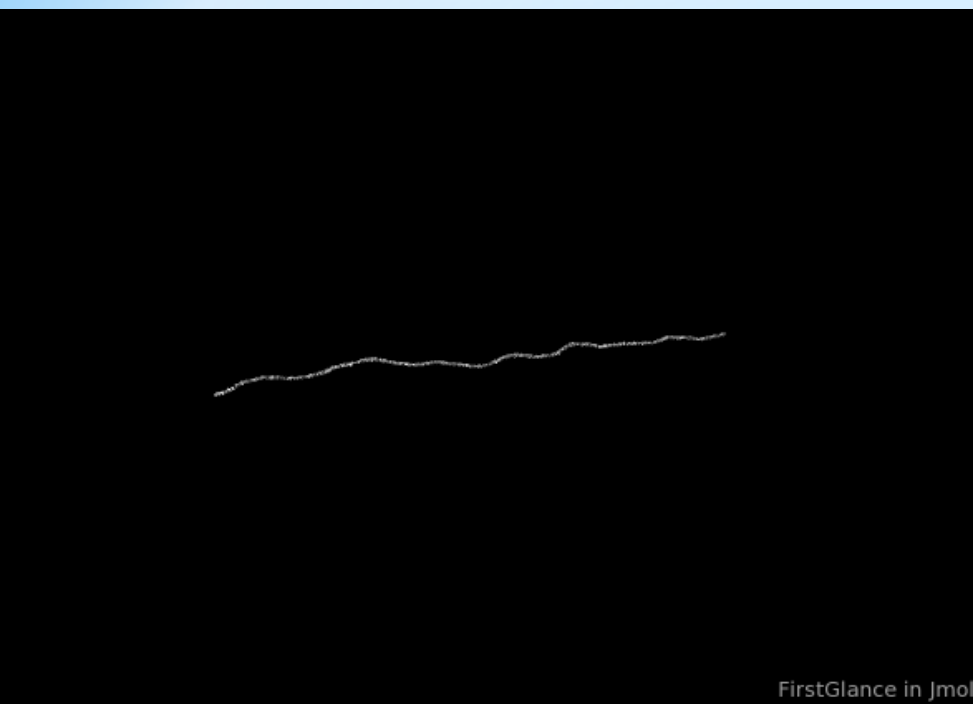


Рисунок 6. – Парамиозин Ani s 2, общая структура для видов *Anisakis simplex* и *Anisakis pegreffii*.

Тропомиозин Ani s 3

Аналогично парамиозину тропомиозин является соматическим антигеном и входит в группу паналлергенов. Устойчив к термической обработке. Вступает в кросс-иммунную реакцию с гомологичными белками пылевых клещей, и предполагается большое количество возможных новых перекрестных реакций, в основном с ракообразными (американский лобстер *Homarus americanus*, креветка *Metapenaeus ensis*, лангусты *Panulirus stimpsoni* и краб *Charybdis feriatus*), моллюсками (садовая улитка *Helix aspersa*, морское ушко *Haliotis diversicolor*, зеленая мидия *Perna viridis*, морской гребешок *Mimachlamys nobilis*, устрица *Crassostrea gigas* и рогатый тюрбан *Turbo cornutus*) и звонцами *Chironomus kiiensis*, но также и с американским тараканом *Periplaneta americana* и чешуйницей *Lepisma saccharina*.



Рисунок 7. – Тропомиозин Ani s 3 вида *Anisakis simplex*.

Цистатин Ani s 4

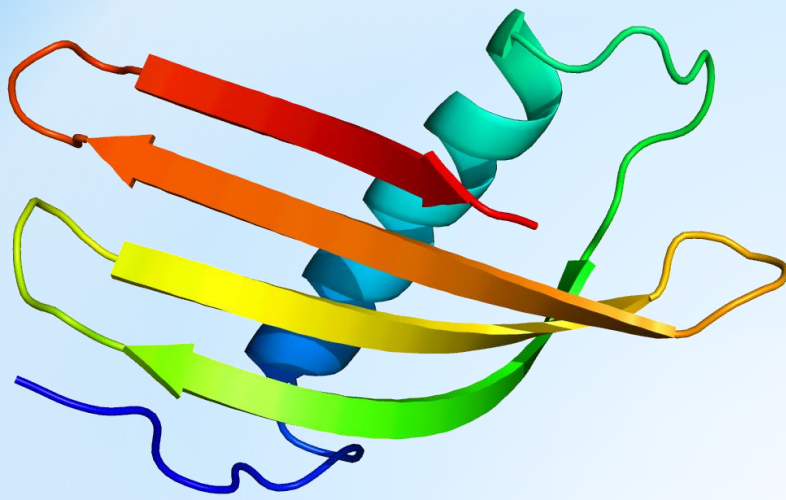


Рисунок 8. – Цистатин Ani s 4 вида *Anisakis simplex*.

Входит в семейство белков цистатинов, основное свойство которых – ингибирование цистеиновых протеаз. Устойчив к термической обработке.

Реконструированный белок по своей структуре полностью соответствовал ингибиторам сериновых протеаз из семейства белков цистатинов. Состоит из четырёх β -нитей (39%) и одной α -спирали (28%). С вероятностью 99.9% и гомологией 51% полученная структура идентична таковой цистатина опасной для человека нематоды *Ascaris lumbricoides*.

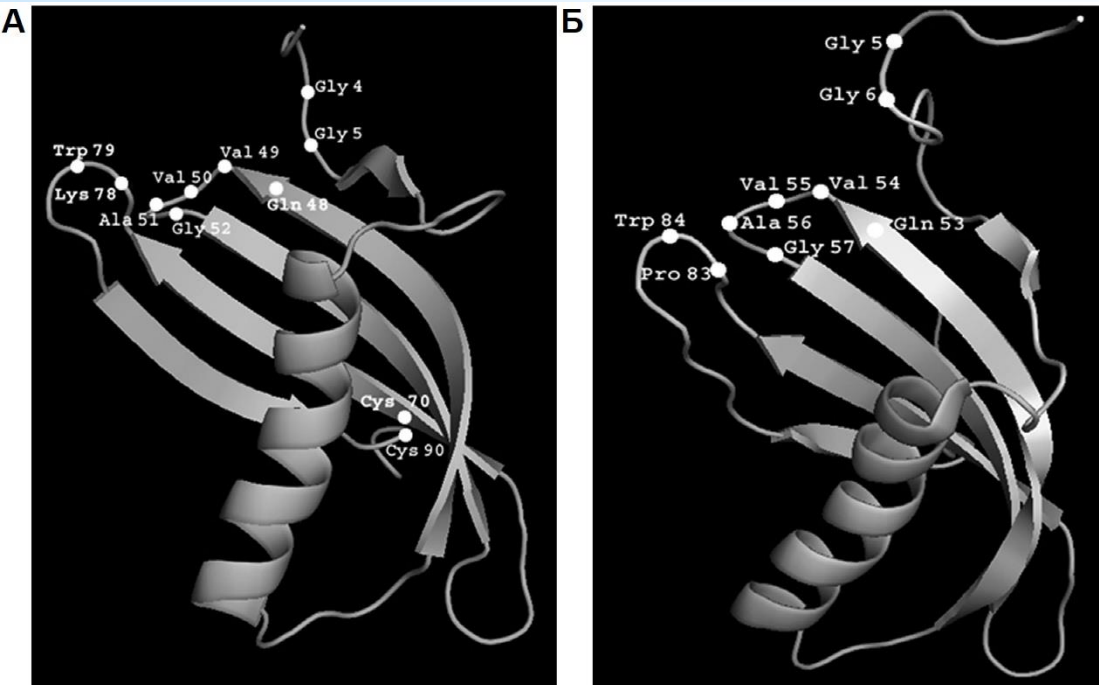


Рисунок 9. – Третичные структуры цистатина Ani s 4 нематоды *Anisakis simplex* (А) и оризацистатина риса *O. sativa* (Б). По: RodriguezMahillo et al., 2007.

Белок Ani s 5

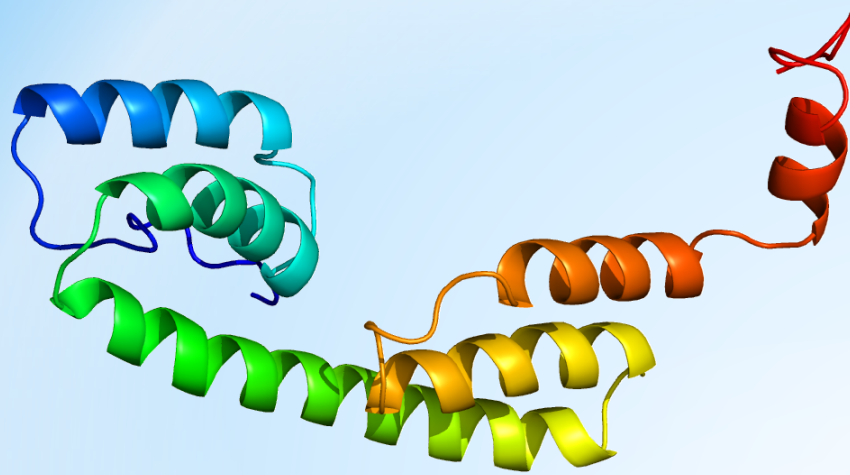


Рисунок 10. – Белок Ani s 5 вида *Anisakis simplex*.

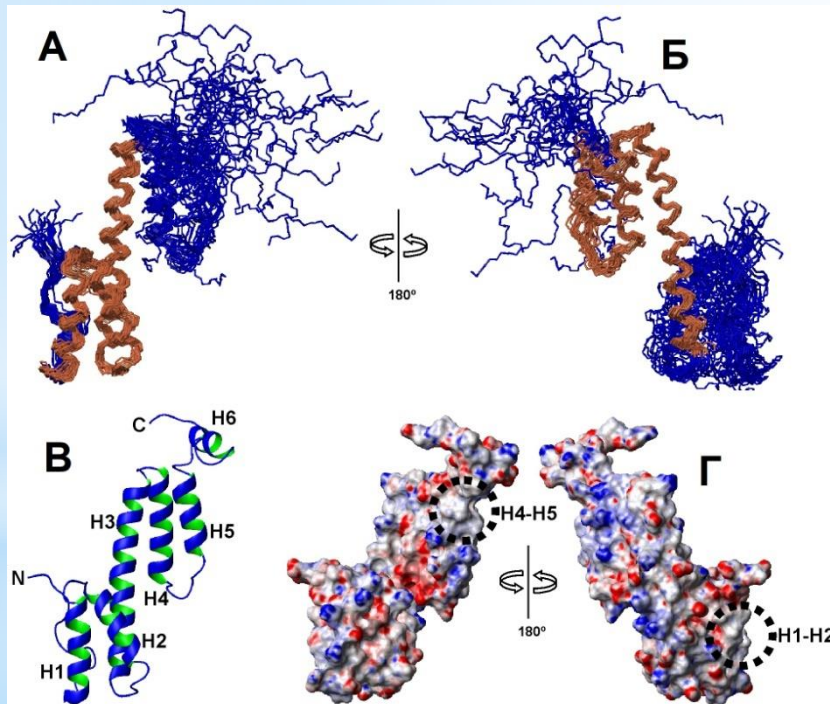


Рисунок 11. – Третичная структура белка Ani s 5. По: García-Mayoral et al., 2014.

Семейство белков SXP/RAL-2, куда также входят и некоторые другие аллергенные белки *A. simplex*. Устойчив к термической обработке. В теле червя локализован в выделительных железах, желудке, эпителии кишечника (Caballero et al., 2008). Есть предположение, что эти белки могут играть роль вакцины против лимфатического филяриоза, или слоновости, как это было показано на примере белка WbL2 из нитчатки Банкрофта, нематоды *Wuchereria bancrofti* (Andure et al., 2016). Другой белок семейства SXP/RAL-2, Ac-16, поверхностный антиген нематоды *Ancylostoma caninum*, был успешно протестирован в качестве вакцины-кандидата, обеспечивающей защиту от заражения анкилостомозом у собак (Fujiwara et al., 2007).

Серпин Ani s 6

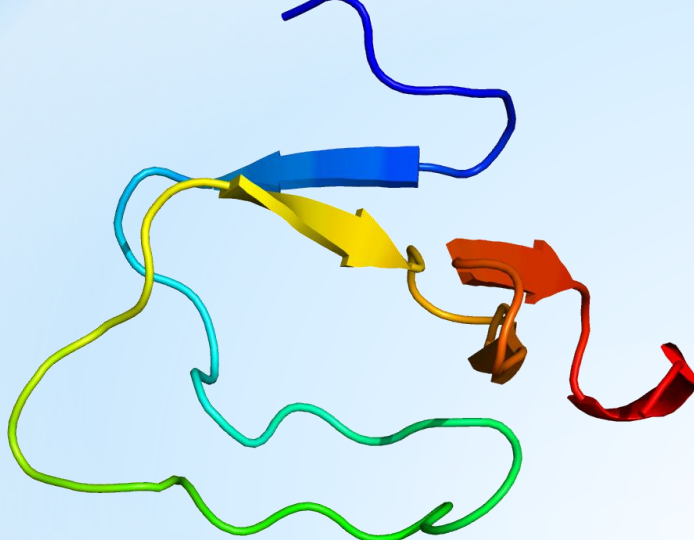


Рисунок 12. – Третичная структура серпина Ani s 6 вида *Anisakis simplex*.

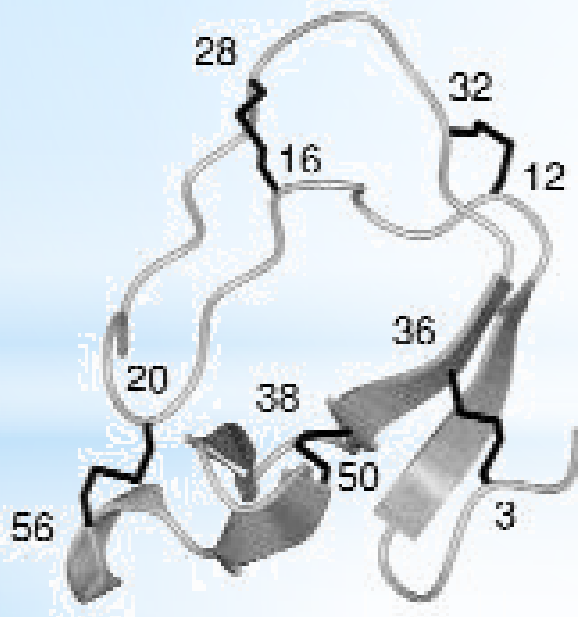


Рисунок 13. – Аллерген медоносной пчелы *Apis mellifera*. По: Cierpicki et al., 2000.

Семейство ингибиторов сериновых протеаз. Трёхмерная структура Ani s 6 была реконструирована с вероятностью 99.7% и на 43% была гомологична ингибитору химотрипсину медоносной пчелы *Apis mellifera*. Данный белок построен из четырёх коротких β -нитей (11% от общей длины) и одной короткой α -спирали (21% от длины).

Согласно Kobayashi et al. (2007), на 36% идентичен ингибитору химотрипсин-эластазы из южного клеща крупного рогатого скота *Boophilus microplus*, на 30% с предполагаемым секретиремым слюной ингибитором сериновой протеазы из африканского малярийного комара *Anopheles stephensi* и ингибитора протеазы Prlnh6 из мухи цеце *Glossina morsitans morsitans* и на 29% от медового аллергена Api m 6 от медоносной пчелы *Apis mellifera*.

Белок Ani s 9

Как и белок Ani s 5, входит в семейство SXP/RAL-2. Третичная структура *Ani s 9* сохраняет единую конформацию для видов *Anisakis simplex* и *Anisakis pegreffii* и во многом сходна с таковой белка *Ani s 5* – гомология этих белков составила 36%.

Аналогичным образом белок состоит из шести коротких α -спиралей, которые занимают 79% от длины белка. Реконструкция такой топологии проведена со 100%-й вероятностью.

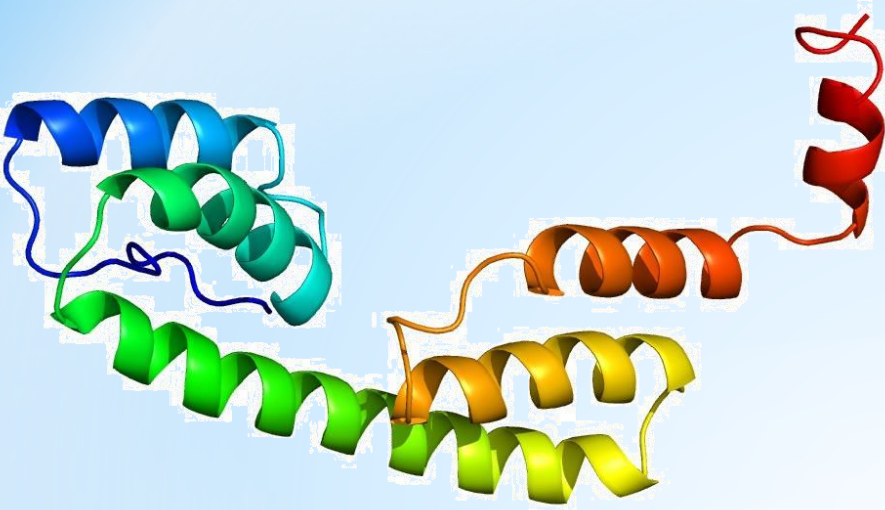


Рисунок 14. – Белок Ani s 9 вида *Anisakis simplex*.

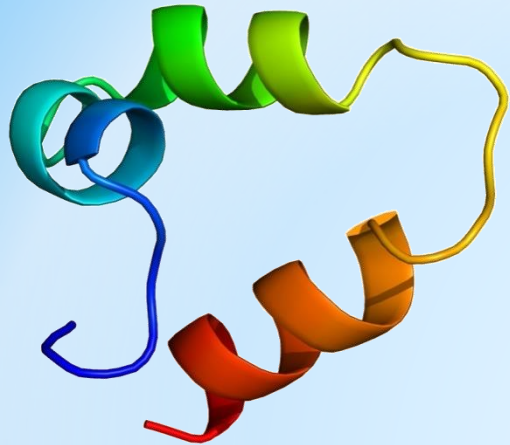


Рисунок 15. – Белок Ani s 12 вида *Anisakis simplex*.

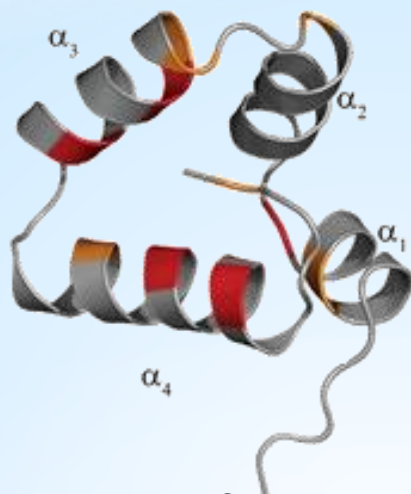
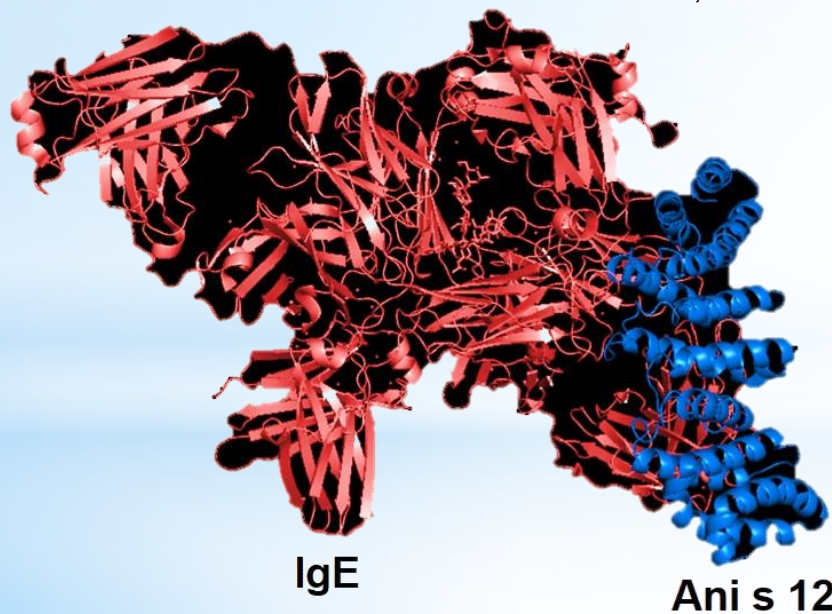


Рисунок 16. – С-концевой домен белка Cdc37 – кошаперон белка теплового шока Hsp90. По: Keramisanou et al., 2016.



IgE

Ani s 12

Рисунок 17. – Взаимодействие между белком Ani s 12 и иммуноглобулином IgE. По: Kochanowski et al., 2019.

Белок Ani s 12

Между видами *A. simplex* и *A. pegreffii* обнаружено 23 переменных сайта: 14 – были парсимоний-информативные, 9 – сингтонные. Из 23 замен 16 – несинонимичные, что дало шесть различных вариантов белка на каждую из шести анализируемых последовательностей обоих видов.

Третичная структура *Ani s 12* сходна с С-концевым доменом кошаперона Cdc37 человека, гомология этих белков составила 28%.

Вероятность такой реконструкции белка достаточно низкая – 77.4%.

Белок состоит из четырёх коротких бета-поворотов (6% от общей длины) и трёх α -спиралей, которые составляют 67% от всей длины белка.

ВЫВОДЫ

1. Из восьми реконструированных 3D-моделей аллергенов *Anisakis simplex* четыре оказались уникальными по аминокислотной последовательности и третичной структуре (Ani s 1, Ani s 4, Ani s 6, Ani s 12), два аллергена (парамиозин Ani s 2 и тропомиозин Ani s 3) представляют собой вытянутые α -спирали и другие два (Ani s 5 и Ani s 9), представляющих единое семейство белков SXP/RAL-2, сохраняли единую топологию, вероятность построения которой является наивысшей (100%).
2. У видов *Anisakis simplex* и *Anisakis pegreffii* изменчивость внутри генов, кодирующих белки Ani s 1, Ani s 2, Ani s 9, находится на крайне низком уровне. Обнаруженные мутации в этих генах находятся в синглтонных сайтах, а единичные аминокислотные замены в белках Ani s 1 вида *A. simplex* и Ani s 2 вида *A. pegreffii* влияют только на углы бета-поворотов и бета-петель в их третичных структурах.
3. Ген, кодирующий аллерген Ani s 12, оказался высоко вариабельным у обоих видов *Anisakis simplex* и *Anisakis pegreffii*. При сравнении двух выборок этих видов были обнаружены 14 парсимоний-информативных и 9 синглтонных сайтов, из которых 16 замен оказались несинонимичными и привели к формированию шести уникальных по первичной структуре белков. Фиксированные замены между выборками *A. simplex* и *A. pegreffii* отсутствовали, вследствие чего можно сделать вывод, что такая высокая вариабельность является нормой для аллергена Ani s 12.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!