Вавиловский журнал генетики и селекции
Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(8):854-863

doi 10.18699/vjgb-24-93

# Поиск и функциональная аннотация многодоменных белков семейства ФА2 у плоских червей

М.Е. Бочарникова [1, 2, 3], И.И. Турнаев [1, 3], Д.А. Афонников [1, 2, 3]

[1] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
[2] Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
[3] Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
bocharnikova@bionet.nsc.ru

**Аннотация.** Фосфолипазы типа А2 (ФА2) – это семейство гидролаз, которые катализируют процесс гидролиза фосфолипидов, играя ключевую роль во многих молекулярных процессах при функционировании клеток и организма в целом. Данное семейство подразделяется на 16 групп, объединенных в шесть основных типов. Впервые ФА2 были выделены как цитотоксины яда у змей и ферменты панкреатического сока у свиней. Изучение этих ферментов в настоящее время вызывает большой интерес, поскольку было показано, что ряд ФА2 участвует в процессах канцерогенеза. Наиболее хорошо изучены ферменты ФА2 у модельных организмов и человека. Однако их наличие и функциональная роль у немодельных организмов изучены слабо. К таким малоизученным таксонам относятся плоские черви, ряд видов которых является паразитами человека. У паразитических плоских червей ранее было охарактеризовано несколько генов ФА2 и показана их возможная роль во взаимодействии «паразит–хозяин». Но систематической идентификации генов ФА2 у этого таксона не проведено. В работе осуществлены поиск и сравнительный анализ последовательностей ФА2, кодируемых в геномах плоских червей. Исследовано 44 вида, представленных 2 свободноживущими и 42 паразитическими организмами. Анализ выполнен на основе поиска ортологических групп белок-кодирующих генов с учетом доменной структуры белков. У плоских червей обнаружено 12 из 13 известных типов фосфолипаз А2, имеющихся в 11 ортологических группах. Часть фосфолипаз нескольких типов попала в одну ортологическую группу, часть типов распалась на несколько ортогрупп в соответствии с особенностями доменной структуры. Показано, что ФА2 кальций-независимого типа, ФА2 тромбоцитарно-активирующего типа групп G8 и лизосомальные ФА2 группы G15 представлены во всех крупных таксонах плоских червей и в большинстве изученных нами видов. Для генов, кодирующих ферменты у свободноживущих червей, наблюдается множественное число копий. У паразитических плоских червей, наоборот, происходит потеря основной части генов специфически по отношению как к отдельным таксонам, так и к отдельным группам/подсемействам ФА2. Обнаружена ортологическая группа секретируемых фосфолипаз, которая среди паразитов имеется только у дигенетических сосальщиков, при этом в геномах описторхид это семейство подверглось дупликациям. Интересно, что ранее в ряде экспериментальных работ показано влияние белков *Clonorchis sinensis* этой ортогруппы на раковую трансформацию клеток организма-хозяина. Наши результаты дали возможность впервые систематически идентифицировать последовательности ФА2 у плоских червей и продемонстрировали, что их эволюция подвержена процессам потерь генов, характерных в целом для геномов паразитов. Кроме того, наш анализ позволил выявить таксон-специфические процессы дупликаций и потерь генов ФА2 у паразитических организмов, которые могут быть связаны с процессами их взаимодействия с организмом хозяина.

**Ключевые слова:** фосфолипаза А2; плоские черви; многодоменные белки; паразитизм; филогения; структура доменов.

**Для цитирования:** Бочарникова М.Е., Турнаев И.И., Афонников Д.А. Поиск и функциональная аннотация многодоменных белков семейства ФА2 у плоских червей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8): 854-863. doi 10.18699/vjgb-24-93

**Финансирование.** Работа поддержана бюджетным проектом № FWNR-2022-0020. Обработка данных проводилась с использованием вычислительных ресурсов ЦКП «Биоинформатика» ИЦиГ СО РАН.

# Search for and functional annotation of multi-domain PLA2 family proteins in flatworms

M.E. Bocharnikova [1, 2, 3], I.I. Turnaev [1, 3], D.A. Afonnikov [1, 2, 3]

[1] Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
[3] Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia
bocharnikova@bionet.nsc.ru

© Бочарникова М.Е., Турнаев И.И., Афонников Д.А., 2024
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

**Abstract.** The phospholipase A2 (PLA2) is a superfamily of hydrolases that catalyze the hydrolysis of phospholipids and play a key role in many molecular processes in the cells and the organism as a whole. This family consists of 16 groups divided into six main types. PLA2 were first isolated from venom toxins and porcine pancreatic juice. The study of these enzymes is currently of great interest, since it has been shown that a number of PLA2 are involved in the processes of carcinogenesis. PLA2 enzymes were characterized in detail in model organisms and humans. However, their presence and functional role in non-model organisms is poorly understood. Such poorly studied taxa include flatworms, a number of species of which are human parasites. Several PLA2 genes have previously been characterized in parasitic flatworms and their possible role in parasite-host interaction has been shown. However, no systematic identification of the PLA2 genes in this taxon has been carried out. The paper provides a search for and a comparative analysis of PLA2 sequences encoded in the genomes of flatworms. 44 species represented by two free-living and 42 parasitic organisms were studied. The analysis was based on identification of orthologous groups of protein-coding genes, taking into account the domain structure of proteins. In flatworms, 12 of the 13 known types of animal A2 phospholipases were found, represented by 11 orthologous groups. Some phospholipases of several types fell into one orthologous group, some types split into several orthogroups in accordance with their domain structure. It has been shown that phospholipases A2 of the calcium-independent type, platelet-activating phospholipases from group G8 and lysosomal phospholipases from group G15 are represented in all large taxa of flatworms and the vast majority of the species studied by us. In free-living flatworms PLA2 genes have multiple copies. In parasitic flatworms, on the contrary, loss of genes occur specifically in individual taxa specifically for groups or subfamilies of PLAs. An orthologous group of secreted phospholipases has been identified, which is represented only in Digenea and this family has undergone duplications in the genomes of opisthorchids. Interestingly, a number of experimental studies have previously shown the effect of *Clonorchis sinensis* proteins of this orthogroup on the cancer transformation of host cells. Our results made it possible for the first time to systematically identify PLA2 sequences in flatworms, and demonstrated that their evolution is subject to gene loss processes characteristic of parasite genomes in general. In addition, our analysis allowed us to identify taxon-specific processes of duplication and loss of PLA2 genes in parasitic organisms, which may be associated with the processes of their interaction with the host organism.

**Key words:** phospholipase A2; flatworms; multi-domain proteins; parasitism; phylogeny; domain structure.

**For citation:** Bocharnikova M.E., Turnaev I.I., Afonnikov D.A. Search for and functional annotation of multi-domain PLA2 family proteins in flatworms. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):854-863. doi 10.18699/vjgb-24-93

## Введение

Белковое семейство фосфолипаз А2 (ФА2) представляет собой группу гидролаз, которые катализируют процесс гидролиза фосфолипидов, играя ключевую роль в функционировании клеток и организма в целом (Филькин и др., 2020; Murakami et al., 2020). Фосфолипазы А2 известны тем, что являются основными компонентами токсинов ядов змей (Bitar et al., 2021), насекомых (Bitar et al., 2021), хищных беспозвоночных, например паукообразных (Salabi, Jafari, 2024) или моллюсков (McIntosh et al., 1995). Фосфолипазы А2 из яда змей гидролизуют фосфолипиды клеточных мембран, что приводит к разрушению клеток, высвобождению арахидоновой кислоты и активации воспалительных процессов. Их воздействие может обуславливать и более серьезные системные эффекты, включая поражение нервной системы (Bitar et al., 2021), это демонстрирует множественность их функций (Gutiérrez, Lomonte, 2013).

Семейство ФА2 подразделяется на 16 групп (Dennis et al., 2011), объединенных в шесть основных типов: секретируемые, цитозольные, кальций-независимые, тромбоцитарно-активирующие факторы, лизосомальные и адипоспецифические (Murakami et al., 2020). Среди основных молекулярных функций ФА2 выделяются: расщепление липидов, ремоделинг жирных кислот, взаимодействие с фосфолипидами лизосом и жировой ткани (Mouchlis, Dennis, 2022). Однако эти ферменты у животных вовлечены в большое количество таких важнейших функций, как антибактериальная, антивирусная, иммунная и противовоспалительная (Dennis et al., 2011).

Известны и антипаразитические свойства ФА2 (Teixeira et al., 2022). В настоящее время эти белки вызывают большой интерес в связи с тем, что нарушение липидного метаболизма, регулируемого ФА2, часто приводит к различным заболеваниям, в том числе и к канцерогенезу (Турнаев и др., 2022). Показано их участие в процессах канцерогенеза. Секретируемые ФА2 демонстрируют повышенную экспрессию в злокачественных опухолях таких органов, как желудок (Scott et al., 2010), легкие (Park et al., 2012), кишечник (Murase et al., 2017) и печень (Shang et al., 2017).

Фосфолипазы А2 – древние гены, они встречаются у всех таксонов живых организмов: бактерий, протистов, архей, животных, грибов и растений (Nevalainen et al., 2012). Их эволюционный анализ позволяет более детально рассмотреть функциональные особенности этих белков, уточнить их роль в важнейших биологических процессах (Murakami et al., 2020; Турнаев и др., 2022). Наиболее хорошо изучены ферменты ФА2 у модельных организмов и человека. Однако их наличие и функциональная роль у немодельных организмов изучены слабо. К таким малоизученным таксонам относятся плоские черви, ряд видов которых являются паразитами человека.

Плоские черви (Platyhelminthes) – одна из древнейших групп многоклеточных животных. Их происхождение восходит к ранним этапам эволюции многоклеточных организмов. Исследования B. Egger с коллегами (2015) демонстрируют, что плоские черви появились более 500 млн лет назад в кембрийский период, что делает их одними из первых животных с организованной тканевой структурой. Наравне с моллюсками (Mollusca) и кольча-

тыми червями (Annelida) они входят в более широкую группу Lophotrochozoa (Egger et al., 2015; Laumer et al., 2015). При этом плоские черви часто рассматриваются как сестринская группа к моллюскам (Laumer et al., 2015), что подчеркивает их близкие эволюционные связи. Важность изучения биологии плоских червей связана с тем, что большинство их видов – паразиты, основные агенты гельминтозных заболеваний, передающихся через зараженную рыбу, поражающих значительное количество людей[1]. Многочисленные исследования показали, что продолжительные инфекции, такие как описторхоз, шистосомоз и подобные гельминтозы, могут привести к серьезным последствиям для здоровья организма-хозяина (Ogorodova et al., 2015; Pakharukova et al., 2019a; Carbonell et al., 2021), в том числе к развитию рака (Pakharukova et al., 2019b; Mordvinov et al., 2021).

У паразитических плоских червей ФА2 широко представлена в экскреторно-секреторных продуктах (ESP), которые выделяются для воздействия на хозяина (Wang et al., 2014), что указывает на потенциальную возможность патогенного воздействия этих ферментов на организм хозяина. Например, в ряде работ экспериментально показано, что фосфолипазы A, C, D плоского паразитического червя *Clonorchis sinensis* связаны с фиброзом у хозяина (Hu et al., 2009). Также выявлено, что фосфолипазы A2 группы G3 *C. sinensis* участвуют в процессах канцерогенеза у клеток хозяина (Shang et al., 2017). Однако в настоящее время существует лишь разрозненная информация о ФА2 у плоских червей, их представленности в геномах. Их функции у паразитов описаны недостаточно. Это подчеркивает необходимость более глубокого анализа и аннотации функций ФА2 у плоских червей, включая паразитических, для более полного понимания их роли в патогенезе и разработки эффективных методов борьбы с гельминтозными инфекциями.

Цель настоящей работы – изучение структуры, функций и эволюции фосфолипаз A2 у плоских червей. Для достижения этой цели была поставлена задача: идентифицировать белковые последовательности ФА2 у плоских червей, реконструировать филогению на основе этих последовательностей, провести анализ первичной структуры белков и предсказать их функции.

## Материалы и методы

**Вычислительный конвейер OrthoDom для идентификации ортологических групп белков с учетом доменной структуры.** Для идентификации ортологических групп ФА2 у плоских червей с учетом доменной структуры мы используем информацию об эталонных последовательностях хорошо аннотированных ФА2 у модельных животных и вычислительный конвейер OrthoDom. Его схема приведена на рис. 1.

Конвейер OrthoDom позволяет выполнять поиск последовательностей семейств многодоменных белков на основе ортологии и анализа доменов среди аминокислотных последовательностей, кодируемых в геномах исследуемых организмов. В качестве входных данных (маркер 1 на рис. 1) использованы последовательности исследуемого семейства многодоменных белковых последовательностей с аннотацией (как правило, выявленных и аннотированных у модельных организмов). Для эталонных последовательностей указываются списки функциональных доменов, которые они включают. Для этих доменов из базы данных Pfam 33.1 (Mistry et al., 2021) извлекаются соответствующие профили HMM (маркер 2). Далее с помощью программы hmmsearch пакета HMMer 3.3.2 (Eddy, 2011) проводится валидация эталонных белков по наличию отмеченных доменов (маркер 3), так как для некоторых из них они могут быть фрагментированы или отсутствовать.

Еще один набор входных данных – аминокислотные последовательности (протеомы) исследуемых организмов (как правило, немодельных), в которых требуется установить ортологи эталонных белков (маркер 4). Ортологические группы для аминокислотных последовательностей эталонных белков и белков исследуемых организмов определялись программой OrthoFinder v. 2.5.4 (Emms, Kelly, 2019). Найденные с помощью нее ортологические группы (маркер 5), включающие эталонные последовательности, дополнительно проверялись на наличие доменов. Выявленные таким образом последовательности ортологов эталонных белков (маркер 6) обрабатывались далее для реконструкции филогении программой IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). Филогенетические деревья визуализировались при помощи веб-версии программы iTOL (Letunic, Bork, 2024).

**Референсные последовательности фосфолипаз A2 и их функциональные домены.** Для идентификации ФА2 у плоских червей мы использовали фосфолипазы позвоночных, последовательности которых классифицированы по типам в ряде предыдущих работ и хорошо аннотированы. Эти белки рассматривались как эталонные и использовались для определения типа фосфолипаз в ортологических группах белков плоских червей. Выборка эталонных белков основана на последовательностях PLA2 из работы (Huang et al., 2015) (9 типов фосфолипаз человека и некоторых позвоночных животных). Эти последовательности были дополнены последовательностями из базы данных NCBI, идентифицированными на основе гомологии с помощью BLASTP (Турнаев и др., 2022). По классификации фосфолипаз A2, предложенной M. Murakami с коллегами (2020), из общего числа 16 групп фосфолипаз живых организмов в эталонную выборку вошли фосфолипазы 13 групп, поскольку группы фосфолипаз A2 11, 13 и 14 присутствуют только у растений (Murakami et al., 2020). В итоге эталонная выборка фосфолипаз A2 включала 13 групп ФА2 из 15 таксонов позвоночных животных. Список эталонных последовательностей из статей (Huang et al., 2015; Турнаев и др., 2022), тип фосфолипазы, видовое название организма, идентификатор, используемый в настоящей работе приведены в Приложении 1[2]. Список ключевых доменов этих белков и их моделей HMM представлен в Приложении 2.

[1] О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. М.: Роспотребнадзор, 2015

[2] Приложения 1–6 см. по адресу:
https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx28.pdf

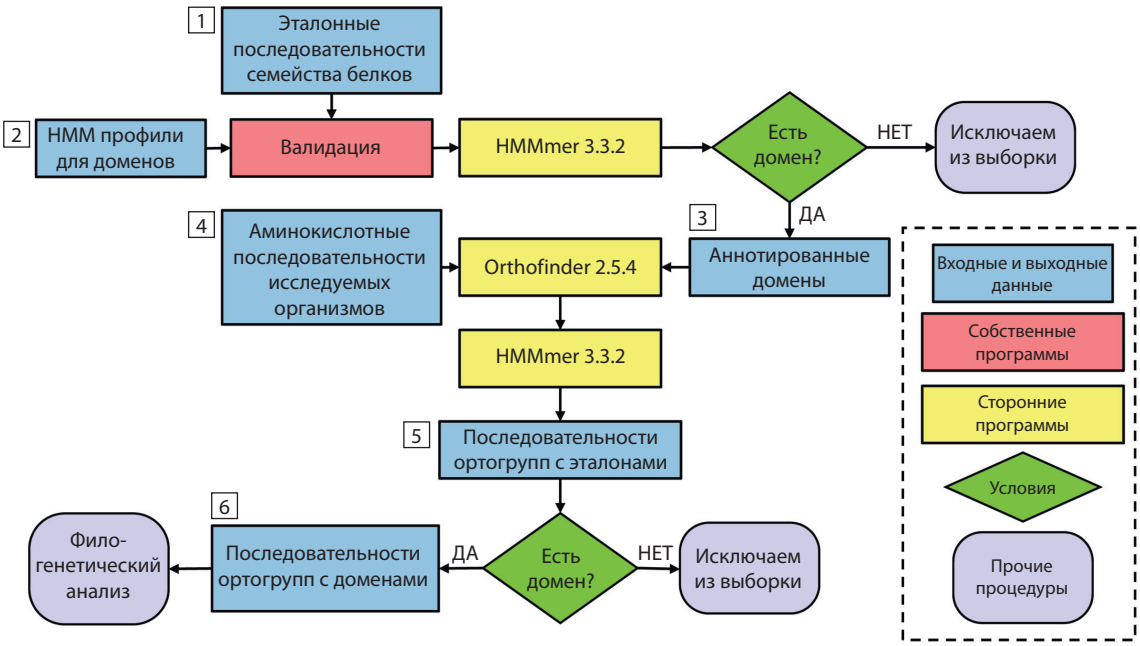


**Рис. 1.** Блок-схема вычислительного конвейера OrthoDom.

Для основных входных и выходных данных в прямоугольных рамках приведены цифровые маркеры (см. текст).

Поскольку ФА2 содержат не только фосфолипазные, но и другие характерные домены (Dennis et al., 2011), они тоже были определены уже после идентификации ортологов. Их список приведен в Приложении 3.

**Источники геномных данных.** Мы исследовали последовательности белок-кодирующих генов из геномов плоских червей 44 видов, представленных 2 свободноживущими и 42 паразитическими организмами. Анализировали аминокислотные последовательности, кодируемые мРНК соответствующих генов, имеющихся в базе данных Wormbase Parasite 18.0 (Howe et al., 2017). Эти виды включают основные таксоны плоских червей: класс дигенетических сосальщиков (Digenea), класс ленточных червей (Cestoda), класс моногенетических сосальщиков (Monogenea) и класс ресничных червей (Turbellaria) (Brusa et al., 2020). Среди перечисленных классов последний является классом свободноживущих червей, представители всех остальных классов – облигатные паразиты, причем моногенетические сосальщики – это энтопаразиты, а дигенетические сосальщики и цестоды – эндопаразиты. В качестве внешней группы при анализе мы использовали последовательности моллюсков из геномов тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*), морского блюдечка (*Lottia gigantea*) и филиппинской мидии (*Modiolus philippinarum*), поскольку известно, что моллюски – сестринская группа по отношению к плоским червям (Bernhard et al., 2015; Laumer et al., 2015). Аминокислотные последовательности моллюсков были взяты из базы данных MolluskDB 2.0 (Caurcel et al., 2021). Идентификаторы геномов плоских червей и моллюсков, видовые названия организмов и их типы, образ жизни представлены в Приложении 4.

**Статистическая обработка результатов.** Для оценки распространенности фосфолипаз различных ортологических групп у плоских червей, крупных таксонов Digenea, Cestoda, Monogenea и Turbellaria мы оценивали среднее количество последовательностей фосфолипаз для ортогруппы в геноме ($n$) и стандартное отклонение ($\sigma$). Среднее количество последовательностей в каждой ортогруппе по таксонам показывает, насколько часто встречаются последовательности фосфолипаз в исследуемых организмах. Стандартные отклонения демонстрируют разброс значений количеств последовательностей вокруг среднего. Чем больше стандартное отклонение, тем большее разнообразие в количестве последовательностей по таксонам. Дополнительно мы оценивали параметр $f$ (представленность, %), долю организмов в крупном таксоне, которые содержат хотя бы одну из последовательностей ортогруппы. Если он равен 100 %, то все организмы таксона имеют по крайней мере одну последовательность из ортогруппы. Если какие-то организмы не содержат ни одной последовательности из ортогруппы фосфолипаз, то значение $f$ меньше 100 %.

## Результаты

В результате анализа, проведенного при помощи конвейера OrthoDom, у плоских червей было выделено 11 ортогрупп, включающих эталонные последовательности фосфолипаз А2. Отметим, что из всех групп ФА2, последовательности которых были использованы в качестве эталона, только последовательности группы 9 не обнаружили гомологии в протеомах моллюсков и плоских червей (они не вошли ни в одну из ортогрупп, определенных для этих организмов). Таким образом, согласно классификации M. Murakami с колегами (2020), в ортогруппы ФА2 моллюсков и плоских червей попали 12 из 13 известных типов фосфолипаз А2.

Характеристики встречаемости генов ортогрупп ФА2 у моллюсков и крупных таксонов плоских червей

| Orthogroup ID | PLA2 type | PLA2 group | Mollusca (3) | | | Tricladida (2) | | | Monogenea (1) | | | Digenea (22) | | | Cestoda (19) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *n* | σ | *f*, % | *n* | σ | *f*, % | *n* | σ | *f*, % | *n* | σ | *f*, % | *n* | σ | *f*, % |
| OG0003047 | Secreted | G1, 2, 5,10 | 2.0 | 1.0 | 100 | 5.0 | 2.8 | 100 | 1.0 | 0.0 | 100 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 |
| OG0003722 | Secreted | G3 | 4.7 | 3.8 | 100 | 3.0 | 1.4 | 100 | 0.0 | 0.0 | 0 | 1.0 | 1.9 | 41 | 0.0 | 0.0 | 0 |
| OG0007610 | Secreted | G12 | 1.0 | 0.0 | 100 | 0.5 | 0.7 | 50 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 |
| OG0000019* | Calcium-independent | G6 | 2.3 | 0.6 | 100 | 2.0 | 1.4 | 100 | 2.0 | 0.0 | 100 | 1.0 | 0.4 | 91 | 1.3 | 0.9 | 95 |
| OG0000217* | Calcium-independent | G6 | 1.0 | 0.0 | 100 | 6.5 | 7.8 | 100 | 2.0 | 0.0 | 100 | 1.1 | 0.4 | 95 | 1.2 | 0.6 | 95 |
| OG0000961* | Calcium-independent | G6 | 1.3 | 0.6 | 100 | 1.5 | 0.7 | 100 | 1.0 | 0.0 | 100 | 1.0 | 0.0 | 100 | 0.5 | 0.6 | 47 |
| OG0007914 | PAF | G7 | 1.0 | 0.0 | 100 | 4.5 | 6.4 | 50 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 |
| OG0004972* | PAF | G8 | 1.0 | 0.0 | 100 | 1.0 | 0.0 | 100 | 1.0 | 0.0 | 100 | 1.0 | 0.5 | 86 | 1.1 | 0.7 | 95 |
| OG0000127 | Cytosolic | G4 | 2.7 | 2.1 | 100 | 0.5 | 0.7 | 50 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 |
| OG0000135* | Lysosomal | G15 | 1.7 | 1.2 | 100 | **8.5** | 0.7 | 100 | **3.0** | 0.0 | 100 | **4.7** | 2.0 | 100 | **2.1** | 2.5 | 89 |
| OG0007915 | Adipo-specific | G16 | 3.0 | 1.0 | 100 | 1.0 | 1.4 | 50 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0 |

Примечание. Строки соответствуют различным ортогруппам фосфолипаз. Столбцы включают: индекс ортогруппы, тип и группы фосфолипаз, представленных в ней, статистику для исследованных крупных таксонов: средние значения (*n*), стандартные отклонения (σ) количества последовательностей в ортогруппах по таксонам, представленность (*f*) последовательностей у разных видов. В скобках рядом с названием таксона приведено количество видов. Максимальные средние значения *n* числа последовательностей в ортогруппах по таксонам показаны жирным шрифтом, минимальные подчеркнуты. Максимальные средние значения *n* числа последовательностей в каждой ортогруппе выделены серым фоном. Расширенная версия таблицы, содержащей информацию о представленности ортогрупп в разных таксонах, приведена в Приложении 5.
* Ортогруппы, последовательности которых представлены во всех крупных таксонах плоских червей.

В таблице показано распределение установленных ортогрупп, содержащих последовательности фосфолипаз плоских червей и моллюсков, и для них ряд статистических характеристик по представленности в пяти основных таксонах. Видно, что соответствие между ортогруппами и известными типами фосфолипаз не является однозначным. Также продемонстрировано, что часть ортогрупп включает несколько типов фосфолипаз. Например, ортогруппа OG0003047 содержит последовательности групп фосфолипаз 1, 2, 5, 10. С другой стороны, некоторые типы фосфолипаз были представлены несколькими ортогруппами. Например, последовательности ФА2 типа 6 распались на ортогруппы OG0000019, OG0000217, OG0000961. В остальных случаях каждая ортогруппа соответствовала одному типу и группе ФА2.

Следует отметить, что ортогруппы отличаются по числу последовательностей, которыми они представлены. Так, в ортогруппе OG0000135 – единственной группе лизосомальных фосфолипаз G15 – среднее число ортологов на протеом в каждом таксоне плоских червей максимальное, по сравнению с другими ортогруппами (от 2.1 у цестод до 8.5 у трикладид). У моллюсков эта группа фосфолипаз не относится по среднему числу последовательностей на протеом (1.7) к наиболее многочисленной; у этого таксона наиболее многочисленная группа OG00003722 – среднее число последовательностей 4.7 (секретируемые ФА2 G3).

Из таблицы также видно, что высокое среднее число последовательностей протеома, отнесенных к различным фосфолипазам, характерно для таксона Tricladida – свободноживущих, в отличие от остальных таксонов, являющихся паразитическими. Только в случае ортогруппы OG00004972 (тип PAF, группа G8) среднее число последовательностей на протеом у свободноживущих червей (1) меньше, чем у цестод (1.11), но, по крайней мере, не меньше, чем у остальных таксонов.

Выявленные нами ортогруппы в различных таксонах представлены неравномерно (см. таблицу). Во-первых, группы ФА2, которые встречаются во всех крупных таксонах плоских червей: это ФА2 кальций-независимого типа, а именно ортогруппы OG0000019, OG0000217, OG0000961 (шестая группа ФА2). При этом белки первых двух ортогрупп имеются в большинстве видов из крупных таксонов (более 90 %). Для ортогруппы OG0000961 характерно отсутствие ортологов для половины видов цестод. Для одной из этих групп, OG0000217, при этом среднее число белков у свободноживущих червей (6.5) в несколько раз превышает таковое у паразитических червей (1.1–2). Белки этой ортогруппы у цестод есть лишь в половине из изученных видов (среднее количество ФА2 на протеом – 0.5, стандартное отклонение – 0.6).

Другая ортогруппа, представители которой обнаруживаются во всех таксонах плоских червей, – OG0004972 (восьмая группа ФА2 тромбоцитарно-активирующего типа). Во всех крупных таксонах эти белки имеются у более чем 95 % видов, кроме дигенетических сосальщиков, у которых эта доля составляет 87 %. Эти гены встречаются в числе одной-двух копий на протеом.

Еще одна ортогруппа, входящая в состав всех крупных таксонов, OG0000135, включает лизосомальные ФА2 группы G15. Последовательности этой ортогруппы пред-

ставлены более чем одной копией на протеом, по сравнению с другими характеризуются наибольшим числом копий (см. выше).

Во-вторых, в таблице можно выделить ортогруппы, специфические для свободноживущих червей, гены которых полностью отсутствуют у паразитических червей. Эти ортогруппы разделились на четыре типа: секретируемые, ТАФ, цитозольные и адипо-специфичные: OG0007610, OG0007914, OG0000127, OG0007915 соответственно. Белки у всех этих ортогрупп имеются по крайней мере у одного из двух свободноживущих видов, исследованных нами.

В-третьих, в таблице показано наличие ортогрупп, специфических для отдельных паразитических таксонов. Например, ортогруппа OG0003047 (фосфолипазы групп G1,2,5,10) есть только у Monogenea (у всех видов); ортогруппа OG0003722 – только у дигенетических сосальщиков (примерно у половины видов). При этом у цестод представлено наименьшее количество ортогрупп фосфолипаз, в частности, отсутствуют все секретируемые фосфолипазы.

Таким образом, результаты позволяют заключить, что у свободноживущих червей обнаруживаются все найденные группы ФА2, причем большинство из них – со значительным количеством копий. Число генов в ортогруппах и число ортогрупп у паразитических червей редуцировано по отношению к свободноживущим. У моногеней присутствуют: одна ортогруппа, включающая секретируемые белки ФА2, все кальций-независимые ФА2; одна ортогруппа, включающая ТАФ, и одна ортогруппа, включающая лизосомальные фосфолипазы А2. У дигенетических сосальщиков из секретируемых фосфолипаз имеются белки, из ортогруппы, отличной от моногеней, и ортогруппы, включающей ТАФ и лизосомальные фосфолипазы. У цестод присутствуют все кальций-независимые ФА2, ТАФ и лизосомальные фосфолипазы А2, однако секретируемые ФА2 полностью отсутствуют. У различных таксонов паразитических червей есть как общие для всех них, так и специфические фосфолипазы.

## Структурное разнообразие фосфолипаз

Проведенный анализ позволил охарактеризовать доменную структуру фосфолипаз разного типа у плоских червей. Для ряда фосфолипаз результаты показаны на рис. 2 и 3. На рис. 2 приведена доменная структура фосфолипаз из ортогруппы OG0003047, в которую попали эталонные белки групп ФА2, G1, G2, G5 и G10.

Из рис. 2 видно, что у последовательностей секретируемых ФА2 ортогруппы OG0003047 длина составляет примерно 200–250 аминокислот. Фосфолипазный домен занимает более 80 % от всего белка. Таким образом, первичная структура секретируемых ФА2 у плоских червей демонстрирует высокое сходство со структурами ФА2 человека соответствующих типов (Турнаев и др., 2022). Примечательно, что данная ортогруппа присутствует только у свободноживущих организмов.

Доменная организация последовательностей ортогрупп OG0000019, OG0000217 и OG0000961 продемонстрирована на рис. 3. Это ферменты, которые относятся к типу 6. Несмотря на то что ФА2 группы 6 разделилась на три

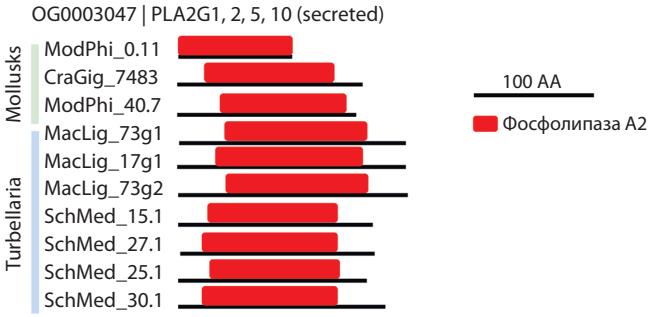


**Рис. 2.** Доменная структура последовательностей ортогруппы OG0003047, фосфолипазы А2 секретируемого типа.

Масштабная линейка, соответствующая 100 аминокислотам, изображена справа, фосфолипазный домен отмечен красным цветом. На рисунке представлено 10 последовательностей, выбранных случайным образом среди всех последовательностей ортогруппы OG0003047.

указанных ортогруппы, все они содержат ключевой для этой группы пататиновый домен (см. рис. 3). Доменная структура последовательностей ортогруппы OG0000019 соответствует типичной для ФА2 группы 6 подгруппе *A*, для которой характерны пататиновый домен и семь анкириновых доменов. Состав доменов белков ортогруппы OG0000217 соответствует типичной для ФА2 группы 6 подгруппе *C*, у которой в дополнение к пататиновому домену обнаруживаются три cNMP домена. Состав доменов последовательностей ортогруппы OG0000961 схож с типичными для ФА2 группы 6 подгруппами *D* и *E*, для которых характерен один лишь пататино-подобный фосфолипазный домен, расположенный на N-конце последовательности (Турнаев и др., 2022).

Таким образом, анализ функциональных доменов фосфолипаз показывает, что белки, относящиеся к фосфолипазам разного типа, но имеющие сходный доменный состав, формируют общую ортогруппу, а последовательности с различным доменным составом фосфолипаз даже одного типа распадаются на разные ортогруппы.

## Филогенетический анализ фосфолипаз плоских червей

Для ортогрупп, доменная структура которых была представлена на рис. 2 и 3, мы реконструировали филогенетические деревья.

Последовательности ортогруппы OG0003047 были обнаружены у свободноживущих червей и одного представителя моногеней (см. рис. 4). У видов свободноживущих червей число последовательностей, относящихся к этой ортогруппе, высоко (см. таблицу), у представителя моногеней *Protopolystoma xenopodis* (краткое обозначение ProXen) наблюдается лишь один ген, кодирующий фосфолипазу данного типа.

Филогенетические деревья ортогрупп, содержащих ФА2 группы 6, приведены в Приложении 6. На рисунках кальций-независимой ФА2 группы 6 (см. Приложение 6, рис. 1–3) можно наблюдать сходные закономерности. Следует отметить, что гены паразитов отличаются высокой консервативностью. Если вернуться к рис. 3, то видно, что доменная структура последовательностей схожа у пред-

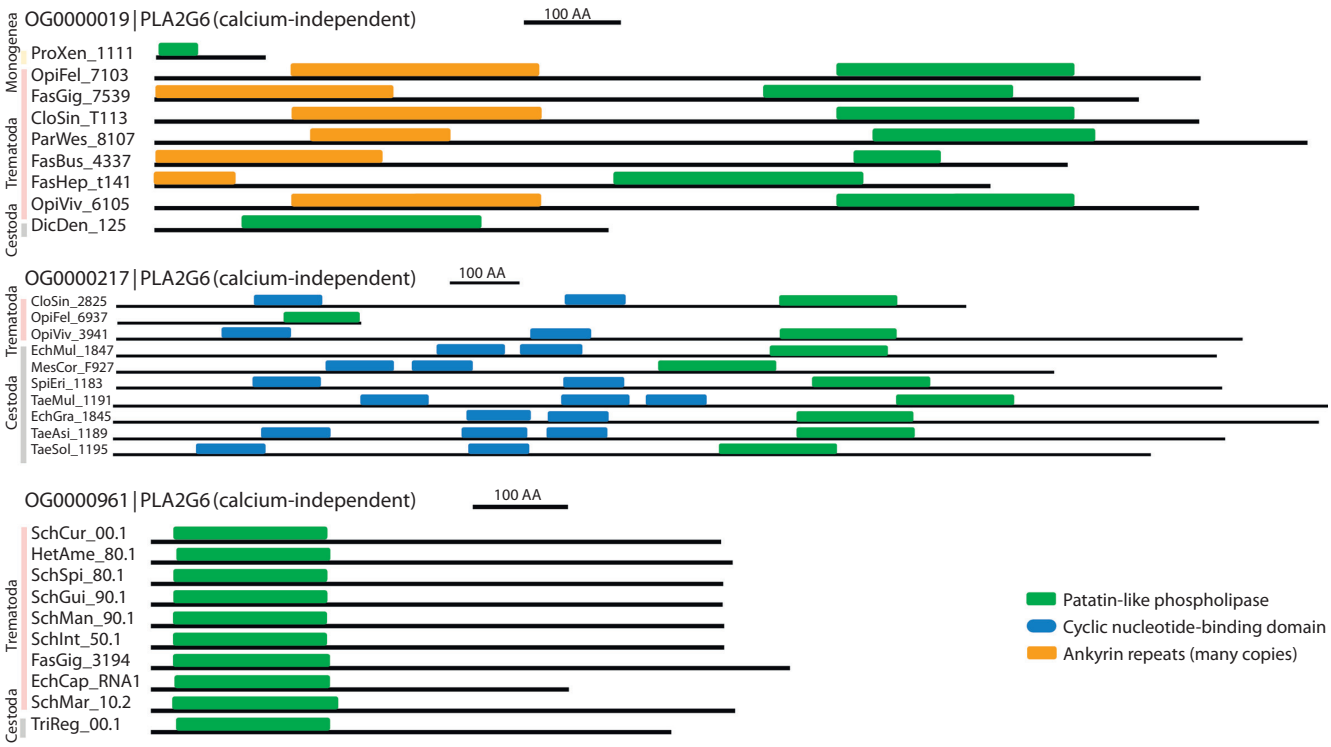


**Рис. 3.** Доменная структура последовательностей ортогрупп OG0000019, OG0000217, OG0000961 фосфолипазы A2 кальций-независимого типа.

Масштабная линейка соответствует 100 аминокислотам, пататино-подобный фосфолипазный домен отмечен зеленым цветом, домен cNMP – синим, анкириновые повторы – оранжевым. На рисунке представлено по 10 последовательностей (всего 30), выбранных случайным образом среди всех последовательностей ортогрупп OG0000019, OG0000217, OG0000961.

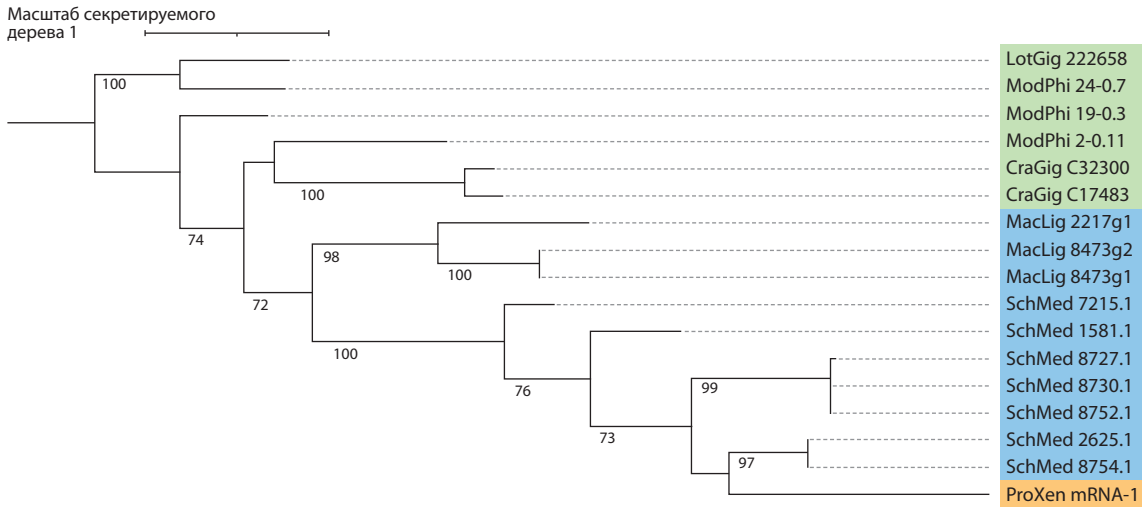


**Рис. 4.** Филогенетическое дерево последовательностей ФА2 ортогруппы OG0003047 (ФА2 G1, 2, 5, 10 секретируемого типа).

Выделены: зеленым цветом – последовательности моллюсков (Mollusca), синим – свободноживущих червей (Turbellaria), оранжевым – моногеней (Monogenea).

ставителей разных таксонов паразитов. Это позволяет сделать вывод, что ФА2 группы 6 является консервативным белком, играющим ключевую роль в базовых процессах жизнедеятельности паразитов плоских червей.

Необходимо отметить секретируемые фосфолипазы A2, которые относятся к ортогруппе OG0003722. Эта ортогруппа характерна тем, что у паразитических червей только таксон дигенетических сосальщиков содержит входящие в нее последовательности. Филогенетические дерево последовательностей, относящихся к этой ортогруппе, показано на рис. 5.

Из рис. 5 видно, что у свободноживущих червей обнаруживаются несколько копий гена ФА2 этой ортогруппы. У дигенетических сосальщиков также имеется несколько копий этого гена, которые распределяются по разным кладам. Это говорит о том, что для данной группы организмов характерны дупликации гена ФА2 группы G3, при этом копийные гены имеют различную структуру. Как

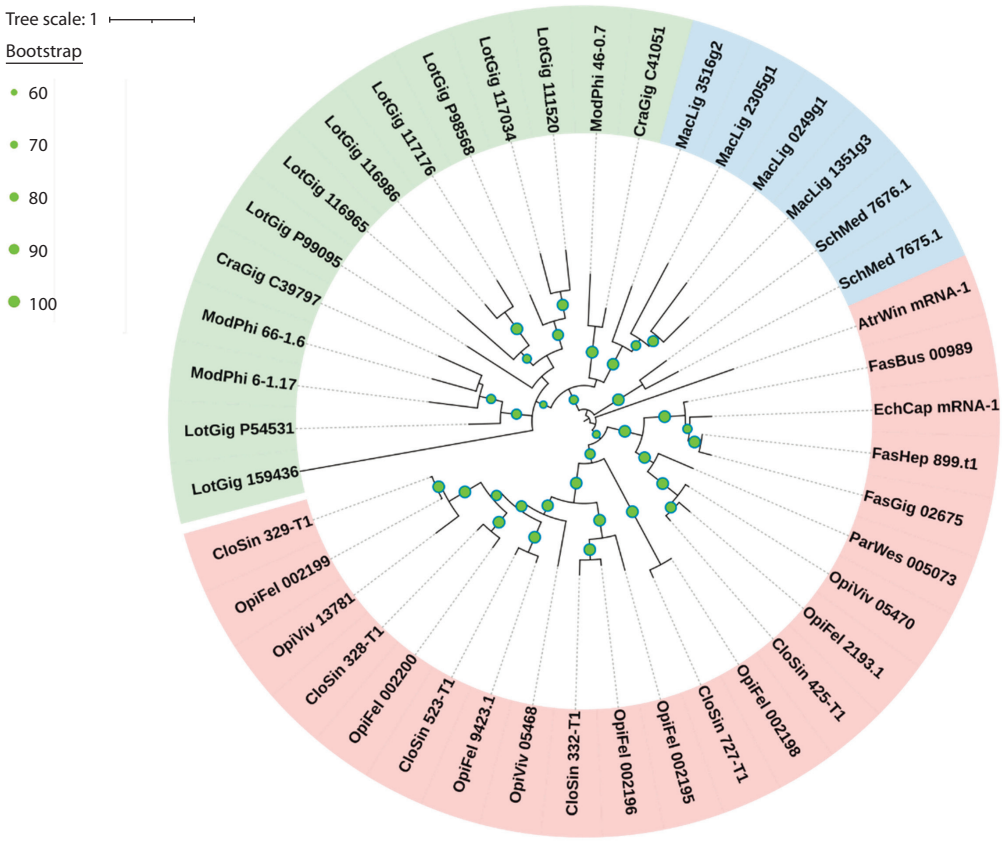


**Рис. 5.** Филогенетическое дерево круговой формы последовательностей ФА2 ортогруппы OG0003722 (ФА2 G3 секретируемого типа).

Выделены: зеленым цветом – моллюски (Mollusca), синим – свободноживущие черви (Turbellaria), красным – дигенетические сосальщики (Digenea).

правило, молекулярная эволюция у паразитов протекает значительно быстрее, по сравнению с представителями свободноживущих организмов (Trouvé et al., 1998). Анализ филогенетических деревьев подтверждает данное утверждение и для ФА2, где наблюдаются более длинные ветви у паразитов, что свидетельствует о высокой скорости эволюции данных молекул.

## Обсуждение

Несмотря на то что фосфолипазы разных типов, и среди них ФА2, являются компонентами ESP паразитических плоских червей (Wang et al., 2014) и для ряда из них была продемонстрирована ассоциация с канцерогенезом у хозяина (Hu et al., 2009; Shang et al., 2017), они до сих пор недостаточно изучены для таксона Platyhelminthes (Dennis et al., 2011). При анализе обнаружены почти все известные группы фосфолипаз у плоских червей. Наш метод классификации дал возможность распределить их по подгруппам и объединить в ортогруппы с учетом доменной структуры. Эти результаты согласуются с классификацией фосфолипаз А2 и их доменной организацией, приведенными в работах E.A. Dennis с коллегами (2011). Метод идентификации ортологов, основанный на доменной структуре, показал свою эффективность в выделении ортогрупп белков с учетом различий в составе их доменов.

Наш анализ позволил идентифицировать ФА2 у плоских червей и показал, что в их эволюции можно выделить закономерности, которые характерны для эволюции геномов паразитов, например потери генов в связи с паразитическим образом жизни (Langleib et al., 2024). Действительно, в нашем исследовании выявлено, что у паразитических плоских червей редуцированы некоторые группы ФА2, а большинство генов представлено в одной копии (и не у всех видов крупных таксонов).

Сравнительный анализ ортогрупп генов ФА2 демонстрирует, что среди свободноживущих червей наблюдается относительно высокая степень дупликаций со средним числом паралогов на вид, достигающим пяти. Это явление предполагает наличие значительных адаптивных возможностей, которые могут быть обусловлены разнообразием экологических факторов. Свободноживущие организмы, подвергающиеся более высоким уровням экологической конкуренции, могут использовать это многообразие генов для повышения жизнеспособности и устойчивости к изменениям в окружающей среде. Однако в ортогруппе OG0000135, содержащей ФА2 лизосомального типа, дуплицированы гены даже у паразитических плоских червей. Чем вызвана эта аномалия, еще предстоит выяснить.

В ряде экспериментальных исследований установлено, что некоторые ФА2 могут участвовать в канцерогенезе, способствуя активации ряда клеточных сигнальных путей

и взаимодействию с иммунной системой организма-хозяина. Например, хроническая инфекция, вызванная *C. sinensis*, приводит к фиброзу печени и холангиокарциноме (Shang et al., 2017). Причем *C. sinensis* использует ФА2 группы 3 в качестве ESP, который играет важную роль в патогенезе печени (Wu et al., 2021). В результате проведенного исследования установлено, что среди секретируемых фосфолипаз дигенетических сосальщиков присутствует только ФА2 группы 3, тогда как у цестод секреция ФА2 отсутствует. Учитывая, что паразитические плоские черви способны манипулировать метаболизмом хозяев, используя фосфолипазы для извлечения необходимых ресурсов, можно предположить, что аналогичные механизмы могут работать и в раковых клетках.

## Заключение

Фосфолипазы А2 – это семейство гидролаз, которые катализируют процесс гидролиза фосфолипидов, играя ключевую роль во многих молекулярных процессах при функционировании клеток и организма в целом. Их разнообразие у плоских червей было слабо изучено, и в нашей работе впервые проведен такой анализ. Мы установили, что у свободноживущих червей представлены 12 из 13 известных типов фосфолипаз А2. У этих организмов наблюдается повышенное число копий генов по сравнению с паразитическими червями. Были выявлены уникальные особенности некоторых ортогрупп, которые, вероятно, могут быть связаны с канцерогенезом у хозяина, вызываемым паразитической инфекцией.

## Список литературы / References

Турнаев И.И., Бочарникова М.Е., Афонников Д.А. Фосфолипазы А2 человека: функциональный и эволюционный анализ. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(8):787-797. doi 10.18699/VJGB-22-95
[Turnaev I.I., Bocharnikova M.E., Afonnikov D.A. Human phospholipases A2: a functional and evolutionary analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2022;26(8):787-797. doi 10.18699/VJGB-22-95]

Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.Н. Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии. *Успехи биол. химии*. 2020;60:369-410
[Filkin S.Yu., Lipkin A.V., Fedorov A.N. Phospholipase superfamily: structure, functions, and biotechnological applications. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Biochemistry* (*Moscow*). 2020;85(Suppl.1): S177S195. DOI 10.1134/S0006297920140096]

Bitar L., Jundi D., Rima M., Al Alam J., Sabatier J.M., Fajloun Z. Bee venom PLA2 *versus* snake venom PLA2: Evaluation of structural and functional properties. *Venoms Toxins.* 2021;2(1):22-33. doi 10.2174/2666121701999210101225032

Brusa F., Leal-Zanchet A.M., Noreña C., Damborenea C. Phylum Platyhelminthes. In: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates. Ch. 5. Academic Press, 2020;101-120. doi 10.1016/B978-0-12-804225-0.00005-8

Carbonell C., Rodríguez-Alonso B., López-Bernús A., Almeida H., Galindo-Pérez I., Velasco-Tirado V., Belhassen-García M. Clinical spectrum of schistosomiasis: an update. *J. Clin. Med.* 2021;10(23): 5521. doi 10.3390/jcm10235521

Caurcel C., Laetsch D.R., Challis R., Kumar S., Gharbi K., Blaxter M. MolluscDB: a genome and transcriptome database for molluscs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2021;376(1825):20200157. doi 10.1098/rstb.2020.0157

Dennis E.A., Cao J., Hsu Y.-H., Magrioti V., Kokotos G. Phospholipase $A_2$ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 2011;111(10):6130-6185. doi 10.1021/cr200085w

Eddy S.R. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* 2011;7(10):e1002195. doi 10.1371/journal.pcbi.1002195

Egger B., Lapraz F., Tomiczek B., Müller S., Dessimoz C., Girstmair J., Telford M.J. A transcriptomic-phylogenomic analysis of the evolutionary relationships of flatworms. *Curr. Biol.* 2015;25(10):1347-1353. doi 10.1016/j.cub.2015.03.034

Emms D.M., Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol.* 2019;20(1):238. doi 10.1186/s13059-019-1832-y

Gutiérrez J.M., Lomonte B. Phospholipases $A_2$: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon.* 2013; 62:27-39. doi 10.1016/j.toxicon.2012.09.006

Howe K.L., Bolt B.J., Shafie M., Kersey P., Berriman M. WormBase ParaSite − a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017;215:2-10. doi 10.1016/j.molbiopara.2016.11.005

Hu F., Hu X., Ma C., Zhao J., Xu J., Yu X. Molecular characterization of a novel *Clonorchis sinensis* secretory phospholipase $A_2$ and investigation of its potential contribution to hepatic fibrosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009;167(2):127-134. doi 10.1016/j.molbiopara.2009.05.003

Huang Q., Wu Y., Qin C., He W., Wei X. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase $A_2$ gene family in vertebrates. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35(3):587-596. doi 10.3892/ijmm.2014.2047

Langleib M., Calvelo J., Costábile A., Castillo E., Tort J.F., Hoffmann F.G., Iriarte A. Evolutionary analysis of species-specific duplications in flatworm genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2024;199: 108141. doi 10.1016/j.ympev.2024.108141

Laumer C.E., Hejnol A., Giribet G. Nuclear genomic signals of the 'microturbellarian' roots of platyhelminth evolutionary innovation. *eLife.* 2015;4:e05503. doi 10.7554/eLife.05503

Letunic I., Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W78-W82. doi 10.1093/nar/gkae268

McIntosh J.M., Ghomashchi F., Gelb M.H., Dooley D.J., Stoehr S.J., Giordani A.B., Olivera B.M. Conodipine-M, a novel phospholipase $A_2$ isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* 1995;270(8):3518-3526. doi 10.1074/jbc.270.8.3518

Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L., Bateman A. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D412-D419. doi 10.1093/nar/gkaa913

Mordvinov V.A., Minkova G.A., Kovner A.V., Ponomarev D.V., Lvova M.N., Zaparina O., Pakharukova M.Y. A tumorigenic cell line derived from a hamster cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis felineus* liver fluke infection. *Life Sci.* 2021;277:119494. doi 10.1016/j.lfs.2021.119494

Mouchlis V.D., Dennis E.A. Membrane association allosterically regulates phospholipase $A_2$ enzymes and their specificity. *Acc. Chem. Res.* 2022;55(23):3303-3311. doi 10.1021/acs.accounts.2c00497

Murakami M., Sato H., Taketomi Y. Updating phospholipase $A_2$ biology. *Biomolecules.* 2020;10(10):1457. doi 10.3390/biom10101457

Murase R., Taketomi Y., Miki Y., Nishito Y., Saito M., Fukami K., Murakami M. Group III phospholipase $A_2$ promotes colitis and colorectal cancer. *Sci. Rep.* 2017;7(1):12261. doi 10.1038/s41598-017-12434-z

Nevalainen T.J., Cardoso J.C., Riikonen P.T. Conserved domains and evolution of secreted phospholipases $A_2$. *FEBS J.* 2012;279(4): 636-649. doi 10.1111/j.1742-4658.2011.08453.x

Nguyen L.T., Schmidt H.A., Von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32(1):268-274. doi 10.1093/molbev/msu300

Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V., Keiser J.; TOPIC Consortium. Opisthorchiasis: an overlooked danger. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2015:9(4):e0003563. doi 10.1371/journal.pntd.0003563

Pakharukova M.Y., Zaparina O.G., Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. *Opisthorchis felineus* infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver. *PLoS One.* 2019a;14(5):e0216757. doi 10.1371/journal.pone.0216757

Pakharukova M.Y., da Costa J.M.C., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus* as a group III or group I carcinogen. *4open.* 2019b;2:23. doi 10.1051/fopen/2019016

Park J.B., Lee C.S., Jang J.H., Ghim J., Kim Y.J., You S., Ryu S.H. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12(11):782-792. doi 10.1038/nrc3379

Salabi F., Jafari H. Whole transcriptome sequencing reveals the activity of the $PLA_2$ family members in *Androctonus crassicauda* (Scorpionida: Buthidae) venom gland. *FASEB J.* 2024;38(10):e23658. doi 10.1096/fj.202400178RR

Scott K.F., Sajinovic M., Hein J., Nixdorf S., Galettis P., Liauw W., Russell P.J. Emerging roles for phospholipase $A_2$ enzymes in cancer. *Biochimie.* 2010;92(6):601-610. doi 10.1016/j.biochi.2010.03.019

Shang M., Xie Z., Tang Z., He L., Wang X., Wang C., Li X. Expression of *Clonorchis sinensis* GIIIs$PLA_2$ protein in baculovirus-infected insect cells and its overexpression facilitating epithelial-mesenchymal transition in Huh7 cells via AKT pathway. *Parasitol. Res.* 2017; 116:1307-1316. doi 10.1007/s00436-017-5409-y

Teixeira S.C., da Silva M.S., Gomes A.A.S., Moretti N.S., Lopes D.S., Ferro E.A.V., de Melo Rodrigues V. Panacea within a Pandora's box: the antiparasitic effects of phospholipases $A_2$ ($PLA_2$s) from snake venoms. *Trends Parasitol.* 2022;38(1):80-94. doi 10.1016/j.pt.2021.07.004

Trouvé S., Sasal P., Jourdane J., Renau F., Morand S. The evolution of life-history traits in parasitic and free-living platyhelminthes: a new perspective. *Oecologia*. 1998;115:370-378. doi 10.1007/s004420050530

Wang X., Hu F., Hu X., Chen W., Huang Y., Yu X. Proteomic identification of potential *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products capable of binding and activating human hepatic stellate cells. *Parasitol. Res.* 2014;113:3063-3071. doi 10.1007/s00436-014-3972-z

Wu Y.J., He Q., Shang M., Yin Y.X., Li Y., Du X., Li X.R. The NF-κB signalling pathway and TM7SF3 contribute to liver fibrosis caused by secreted phospholipase A2 of *Clonorchis sinensis*. *Parasit. Vectors.* 2021;14:1-9. doi 10.1186/s13071-021-04663-z

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.10.2024. После доработки 25.11.2024. Принята к публикации 26.11.2024.