



<https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-1-36-55>
<http://zoobank.org/References/B3D160A4-0FAF-4A00-876E-D89D709164B0>

УДК 594.38+571.27

Патогенраспознающие молекулы гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Pulmonata)

Е. Е. Прохорова¹✉, А. В. Бобровская¹, Н. В. Цымбаленко^{1,2}

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, набережная реки Мойки, д. 48, 191186, г. Санкт-Петербург, Россия

² Институт экспериментальной медицины, ул. Академика Павлова, д. 12, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Сведения об авторах

Прохорова Елена Евгеньевна

E-mail: elenne@mail.ru

SPIN-код: 9064-0306

Scopus Author ID: 36632856500

ResearcherID: J-7895-2016

ORCID: 0000-0002-4451-5124

Бобровская Александра Владимировна

E-mail: sasha-bobrovskaya@yandex.ru

SPIN-код: 9803-5894

Scopus Author ID: 58022267700

Цымбаленко Надежда Васильевна

E-mail: tsymbalenkonv@mail.ru

SPIN-код: 4635-5794

Scopus Author ID: 6603785512

Права: © Авторы (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

Аннотация. Изучение врожденного иммунитета моллюсков необходимо для понимания эволюции иммунной системы и разработки стратегии борьбы с их паразитами. В данной работе впервые получен и проанализирован транскриптом гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, зараженных в естественных условиях трематодой *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae). В сборках обнаружены транскрипты, кодирующие все основные группы факторов врождённого иммунитета. Наиболее многочисленной группой оказались молекулы распознавания патогенов. На основе нуклеотидных последовательностей транскриптов предсказана доменная структура кодируемых ими белков. Проанализирована структура доменов лектинов, толл-подобных рецепторов, молекул адгезии и токсинов. Показано большое разнообразие патоген-распознающих молекул гемоцитов *P. corneus*. Полученные данные расширяют знания об иммунных реакциях легочных моллюсков на трематодную инвазию и дают возможность рассматривать роговую катушку как новый модельный организм для изучения их защитных реакций.

Ключевые слова: *Planorbarius corneus*, *Bilharziella polonica*, трематодная инвазия, гемоциты, иммунные реакции, транскриптом, патогенраспознающие молекулы, лектины

Pathogen recognition molecules from hemocytes of *Planorbarius corneus molluscs* (Planorbidae, Pulmonata)

Е. Е. Prokhorova¹✉, А. В. Bobrovskaya¹, N. V. Tsymbalenko^{1,2}

¹ Herzen State Pedagogical University of Russia, 48 Moika Emb., 191186, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Experimental Medicine, 12 Akademika Pavlova Str., 197022, Saint Petersburg, Russia

Authors

Elena E. Prokhorova

E-mail: elenne@mail.ru

SPIN: 9064-0306

Scopus Author ID: 36632856500

ResearcherID: J-7895-2016

ORCID: 0000-0002-4451-5124

Alexandra V. Bobrovskaya

E-mail: sasha-bobrovskaya@yandex.ru

SPIN: 9803-5894

Scopus Author ID: 58022267700

Nadezhda V. Tsymbalenko

E-mail: tsymbalenkonv@mail.ru

SPIN: 4635-5794

Scopus Author ID: 6603785512

Copyright: © The Authors (2024). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

Abstract. Investigations of the innate immunity of molluscs are necessary to understand the evolution of the immune system. In this work, for the first time, a transcriptome of hemocytes from *Planorbarius corneus* molluscs infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae) trematodes was obtained and analyzed. The assemblies were found to contain transcripts encoding all major groups of factors of innate immunity. Pathogen recognition molecules turned out to be the most numerous groups of immune factors. Based on the nucleotide sequences of transcripts, the study allowed to predict the domain structure of proteins encoded in them. The analysis covered the composition of lectin domains, Toll-like receptors, adhesion molecules, and toxins. The hemocyte of *Planorbarius corneus* molluscs was found to have a wide variety of pathogen recognition molecules. The obtained data expand the knowledge about the immune responses of molluscs to trematode invasion and make it possible to consider *P. corneus* a new model organism for studying the defense reactions of molluscs.

Keywords: *Planorbarius corneus*, *Bilharziella polonica*, trematode invasion, hemocytes, immune reactions, transcriptome, pathogen recognition molecules, lectins

Введение

Изучение механизмов распознавания патогенов в системе врождённого иммунитета у животных разных таксонов является одним из ключевых направлений современной сравнительной иммунологии. Согласно классическим представлениям, системы адаптивного и врождённого иммунитета различаются по способу распознавания чужеродного (Janeway, Medzhitov 2002). Клетки системы адаптивного иммунитета обладают антиген-распознающими рецепторами, которые способны распознавать уникальные антигенные детерминанты. Эта особенность определяет специфичность иммунных реакций позвоночных животных. Клетки врождённого иммунитета распознают так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) и образы опасности (damage-associated molecular patterns, DAMP). PAMP и DAMP содержат мотивы, общие для больших систематических групп патогенных организмов. Такие мотивы идентифицируются паттерн-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors, PRRs).

К группе PRR относят толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLR), лектины, рецепторы нуклеиновых кислот (nucleotide-oligomerizing domain receptors, NOD), антибактериальные белки, компоненты комплемента (Kumar et al. 2011). PRRs выявлены у животных всех основных таксонов (Zhang et al. 2010). В запуске иммунного ответа беспозвоночных участвуют лектины, толл-подобные рецепторы, скавенджер-рецепторы, компоненты комплемента и др. (Wang et al. 2018).

Среди беспозвоночных животных моллюски обладают одной из наиболее сложных и эффективных систем врождённого иммунитета. Главными участниками иммунных реакций моллюсков являются форменные элементы гемолимфы — гемоциты (van der Knaap 1981; Ataev et al. 2016). Гемоциты обеспечивают не только распоз-

навание, но и элиминацию чужеродных объектов (Sminia, van der Knaap 1987).

Протеомы и транскриптомы гемоцитов моллюсков модельных видов свидетельствуют о многообразии патоген-распознающих и цитотоксических молекул в клетках моллюсков. Однако большая часть имеющихся сведений об иммунитете пульмонат получена на моллюсках лабораторных линий модельных видов — преимущественно представителей рода *Biomphalaria*, которые являются промежуточными хозяевами трематод рода *Schistosoma* — возбудителей опасных заболеваний человека (Adema, Loker 2015; Ataev et al. 2020). В то же время изучение всего спектра PRR лёгочных моллюсков требует расширения числа исследуемых моделей и особенно исследования защитных реакций моллюсков из природных популяций.

Одним из активно исследуемых в отношении иммунных реакций видов пульмонат является катушка роговая *Planorbarius corneus* (Ataev et al. 2020). Роговые катушки обитают на значительной части территории Евразии и являются промежуточными хозяевами для трематод из нескольких семейств (Faltynkova et al. 2008; Brown et al. 2011). Наибольший интерес среди последних представляет *Bilharziella polonica* (сем. *Schistosomatidae*), которая вызывает церкариозный дерматит человека (Żbikowska 2004). Ранее был выполнен анализ транскриптома гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* (Orlov et al. 2023). В гемоцитах роговых катушек выявлены транскрипты относящиеся к основным группам факторов врождённого иммунитета. Молекулы, участвующие в распознавании чужеродного, оказались самой разнообразной группой среди выявленных иммуноассоциированных белков. Поэтому группа транскриптов, кодирующих PRR заслуживает отдельного исследования. В данном исследовании мы подробно проанализировали набор транскриптов PRR в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*.

Материалы и методы

В работе исследованы моллюски *Planorbarius corneus*, собранные из озера Финское в окрестностях Санкт-Петербурга (60.082, 30.285), заражённые трематодой *Bilharziella polonica* (n=10), а также незараженные особи (n=10). В работе использовали моллюсков с диаметром раковины от 23 до 27 мм. Гемолимфу забирали стерильной пипеткой Пастера из синуса в области головы улиток. Гемоциты осаждали центрифугированием и использовали для выделения РНК с помощью набора Trizol (Invitrogen).

Секвенирование, сборка и аннотация транскриптома подробно описаны в статье (Orlov et al. 2023). кДНК получали с помощью набора Mint-2 (Evrogen). Библиотека секвенирования была подготовлена с использованием набора QIAGEN QIAseq FX DNA Library Kit. Секвенирование подготовленных библиотек парных прочтений со средним размером фрагмента приблизительно 450 п. н. и длиной прочтений 100 п. н. проводили на приборе Illumina HiSeq2500 с использованием набора QIAGEN QIAseq FX DNA Library Kit. В ходе предобработки данных у каждого прочтения сначала были удалены специфичные для библиотеки адаптеры и полиА-последовательности, неизвестные (N base) и низкокачественные основания (phred<5) с обоих концов. Эта операция обусловлена обнаруженной диспропорцией в доли определённых оснований на концах прочтения относительно внутренней его части. Все прочтения короче 20 п. н. отбрасывались. Предобработка прочтений производилась с помощью cutadapt (Marcel 2011). Прочтения, полученные в результате предыдущего шага, сопоставляли с кластером, кодирующим химерную рРНК с помощью hisat2, при этом использовали стандартные параметры, и отбрасывали все совпадающие прочтения (Kim et al. 2015).

Затем была проведена фильтрация тех прочтений, которые содержали k-меры

размера 27 из специально созданной с помощью программы BBduk (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) базы данных. Эта база данных состояла из последовательностей (геномных, мтДНК, рРНК) наблюдаемых контаминирующих организмов или видов, тесно связанных с ними. Эталонный транскриптом гемоцитов *P. corneus* собрали с помощью *de novo* сборщика Trinity, используя прочтения от зараженных и незараженных моллюсков (Grabherr et al. 2011). Качество сборки, в которую вошли последовательности длиннее 200 п.н., оценивали с помощью программ TransRate и BUSCO (Smith-Unna et al. 2016; Seppey et al. 2019). Полученные полипептидные последовательности, идентичные не менее чем на 99% кластеризовали (Fu et al. 2012). Для предсказания доменов использовали InterProScan (IPS) с настройками по умолчанию. С помощью скрипта на Python в полученном аннотированном транскриптоме нашли белки, содержащие иммуно-релевантные домены. Для подсчета количества прочтений каждого транскрипта использовался Salmon (Patro et al. 2017). Далее из полученного массива данных были выделены транскрипты основных групп PRR, а также, была получена информация о нормализованной экспрессии этих транскриптов, выраженная в TPM (transcripts per million).

CDS транскриптов, кодирующих полипептиды с доменами характерными для TLR, выравнивали используя BioEdit и онлайн-сервис BLAST (Hall 1999). Доменный состав предполагаемых аминокислотных последовательностей PRR был визуализирован с помощью ресурса аннотации белковых доменов SMART (Letunic et al. 2021) в нормальном режиме.

Результаты и обсуждение

Иммуноассоциированные транскрипты

В результате анализа транскриптома гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* было выявлено 2687 молекул с доменами, гомологичными факторам врождённого иммунитета (Orlov et al. 2023). Все выяв-

ленные транскрипты условно можно отнести к трём группам — кодирующие факторы цитотоксичности, кодирующие регуляторы иммунных реакций (цитокины и молекулы внутриклеточной сигнализации) и кодирующие молекулы, участвующие в распознавании чужеродного. Последняя группа оказалась наиболее многочисленной и включала в себя 1776 транскриптов, кодирующих PRR. Таким образом, более половины всех выявленных иммуноассоциированных транскриптов была отнесена к молекулам распознавания чужеродного.

Анализ состава PRRs показал их большое разнообразие. В гемоцитах роговых катушек присутствуют транскрипты PRRs всех основных групп, ранее описанных при изучении врождённого иммунитета у животных разных таксонов (рис. 1). Самыми многочисленными по представленности оказались транскрипты лектинов, члены иммуноглобу-

линового суперсемейства, молекул адгезии и толл-подобных рецепторов.

На основе предсказанных аминокислотных последовательностей выявленных транскриптов была определена вероятная доменная структура кодируемых ими белков (рис. 2–6).

Самой разнообразной группой PRR гемоцитов оказались лектины. Лектины обеспечивают избирательное распознавание углеводных детерминант на поверхности патогенов. Также за счёт связывания углеводных остатков чужеродных объектов они могут выполнять роль опсоинов, облегчая процесс фагоцитоза (Kokryakov 2006). По составу доменов все выявленные лектины *P. corneus* были разделены на несколько групп (Vasta, Ahmed, 2008).

Около половины транскриптов лектинов были отнесены к фибриногенподобным белкам (fibrinogen-related proteins,

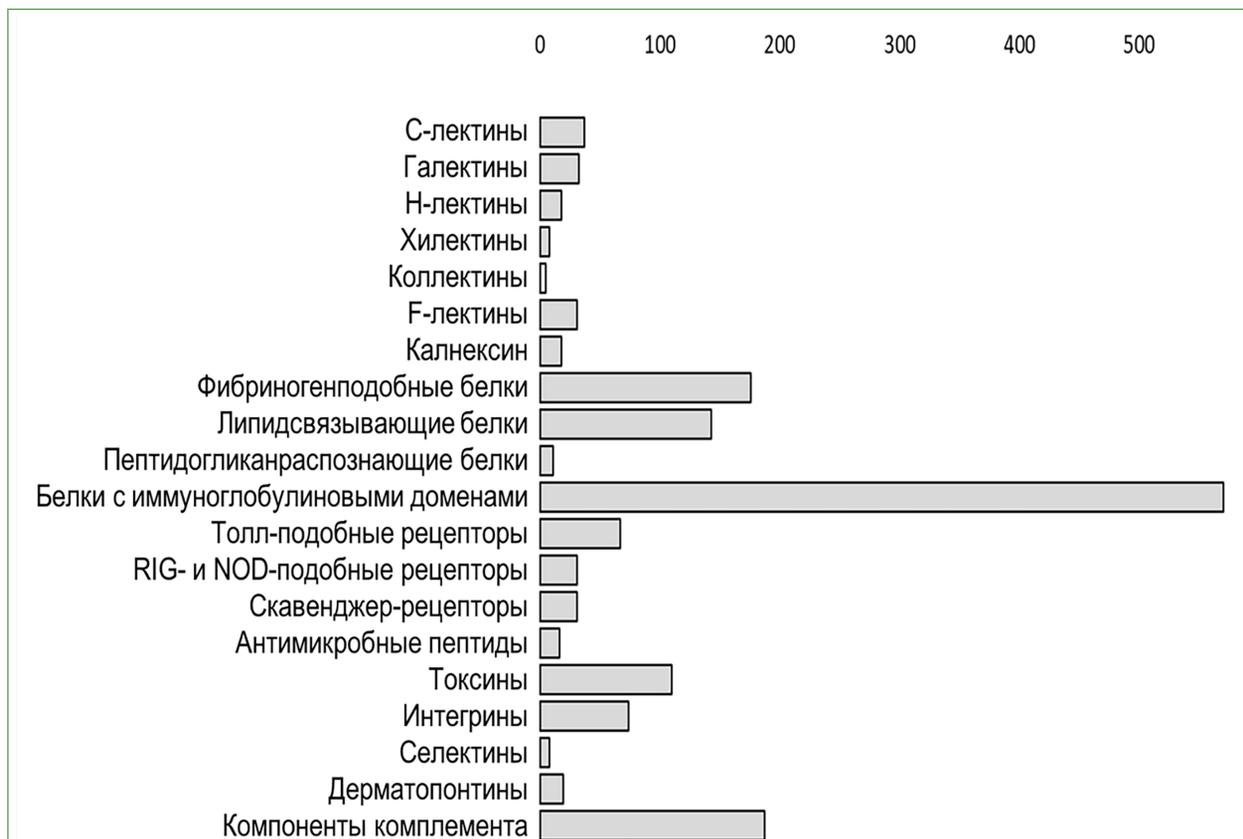


Рис. 1. Число доменов патогенраспознающих молекул и молекул адгезии в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus* по данным BlastP (базы данных NCBI NR, $e\text{-value} < 1e-5$)

Fig. 1. The number of domains of pattern recognition molecules and adhesion molecules in the hemocytes of *Planorbarius corneus* molluscs according to BlastP data (NCBI NR database, $e\text{-value} < 1e-5$)

FREP). Молекулы этой группы наряду с углеводсвязывающим участком содержат различное количество фибриногеновых доменов. Первые FREP были описаны у модельного объекта сравнительно-иммунологических исследований моллюска *Biomphalaria glabrata* (Adema et al. 1997). FREP биомфаларий помимо фибриногеновых доменов, содержат в своём составе иммуноглобулиноподобные домены (immunoglobulin — like, Ig). А гены и транскрипты FREP проявляют признаки соматической диверсификации (Hanington et al. 2010a, 2010b, 2012; Gordy et al. 2015). Поэтому эти молекулы рассматривают в качестве аналога иммуноглобулинов позвоночных животных. Было установлено, что именно эта группа лектинов играет решающую роль в распознавании гемоцитами биомфаларий партенит трематод *Schistosoma mansoni*, а моллюски резистентных и чувствительных к заражению линий отличаются различным конститутивным уровнем экспрессии FREP (Pila et al. 2017; Allan et al. 2019; Li et al. 2020).

Однако в транскриптом *Planorbarius corneus* не было выявлено транскриптов FREP, содержащих Ig домены. Это может быть связано с низкой представленностью таких транскриптов в гемоцитах роговых катушек. Также можно предположить, что FREP не участвуют в распознавании трематод *Bilharziella polonica*. Ранее было показано, что местом синтеза FREP у биомфаларий могут быть не только гемоциты, но и гепатопанкреас. А изменение экспрессии генов FREP у заражённых моллюсков зависит от вида патогена и индивидуальных особенностей моллюска (Zhang et al. 2008; Peterson et al. 2009; Mone et al. 2010).

Среди FREP роговой катушки выявлен вариант рецептора с PAN/Apple-подобным доменом (рис. 2а). Такие домены присутствуют в некоторых FREP, содержащих Ig домены (Adema et al. 2017). PAN/Apple-подобные домены выявлены в белках организмов различных таксонов от бактерий до млекопитающих. Они опосредуют бе-

лок-белковые или белок-углеводные взаимодействия, участвуют в прикреплении молекул к клеточной поверхности (Gong et al., 2012). Предполагается, что у моллюсков молекулы с PAN/Apple-подобными доменами выполняют сходную функцию (Adema et al 2017).

Все FREP гемоцитов *Planorbarius corneus* содержат единственный фибриногеновый домен, который в большинстве случаев ассоциирован с лектиновыми доменами, доменами эпидермального фактора роста (epidermal growth factor, EGF) или интегринным доменом. Один из транскриптов наряду с фибриногеновым доменом кодирует домен SCAN (рис. 2а), который опосредует гомотипические и гетеротипические взаимодействия между белками (Schumacher et al. 2000). Такая структура также подтверждает роль FREP в распознавании углеводных детерминант и процессах адгезии.

Второй по представленности группой лектинов у *P. corneus* оказались галектины — молекулы, избирательно связывающие β -галактозиды (рис. 2b). Высокий уровень экспрессии галектинов был показан и для моллюсков других видов (Seppälä et al. 2021; Lu et al. 2022). Галектины гемолимфы *B. glabrata* связываются с поверхностью спороцист *S. mansoni* (Yoshino et al. 2008). У двустворчатых моллюсков галектины участвуют в антибактериальном и противовирусном иммунитете (Wang et al. 2019; Watson et al. 2022). Для позвоночных животных установлено их участие в тканевом метаболизме и регуляции иммунного ответа (Hernandez, Baum 2002; Yoshino et al. 2008). При этом галектины присутствуют как в мембраносвязанной, так и в свободной форме (рис. 2b), что может свидетельствовать о секреции их в плазму и, возможно, регуляторной роли в иммунном ответе (Kim et al. 2008).

Лектины F-типа (F-type lectins, fuclectins, фуколектины) представляют собой фукозосвязывающие белки. Выявленные в транскриптом гемоцитов *Planorbarius corneus* последовательно кодируют от 1 до 3 доменов FTP (eel-Fucolectin

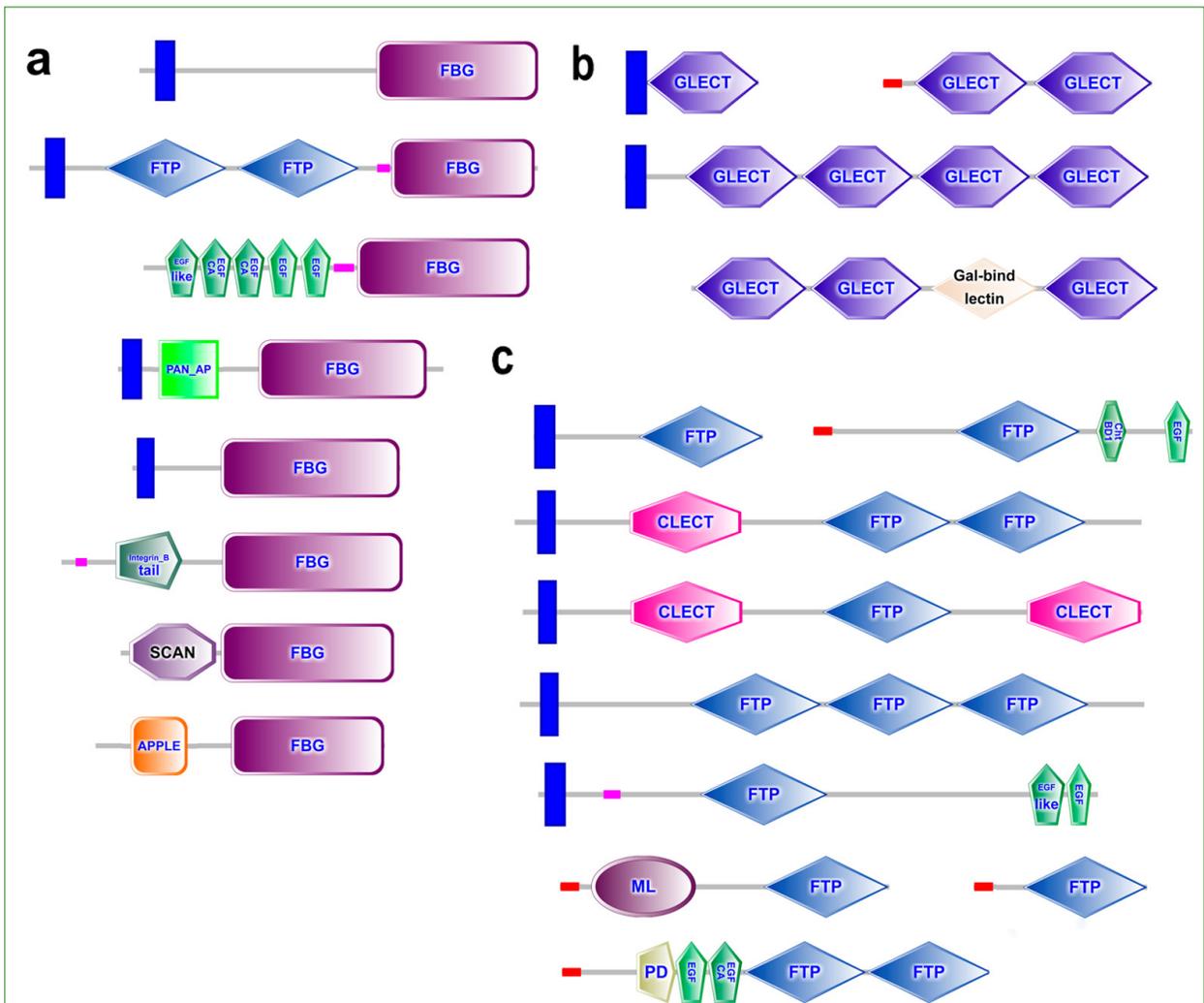


Рис. 2. Варианты предсказанной доменной структуры патогенраспознающих молекул гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*. а — фибриногенподобные белки, б — галектины, с — F-лектины.

Условные обозначения и сокращения, здесь и далее: горизонтальные красные полосы — сигнальный пептид, горизонтальные розовые — область низкой сложности, вертикальные синие полосы — трансмембранная область, FBG — фибриногеновый домен, FTP — домен фуколектина, EGF — домен эпидермального фактора роста, EGF_CA — кальцийсвязывающий EGF-подобный домен, PAN_AP — APPLE-подобный домен, SCAN — область, богатая лейцином, GLECT — галактозосвязывающий лектин, CLECT — лектин С-типа, Gal-bind — галактозид-связывающий лектин, ML — MD-2-подобный домен распознавания липидов

Fig. 2. Variants of the predicted domain structure of pattern recognition molecules from hemocytes of *Planorbarius corneus* molluscs. а — fibrinogen-related proteins, б — galectins, с — F-lectins.

Symbols and abbreviations (here and further): horizontal red stripes — signal peptide, horizontal pink stripes — a low complexity region, vertical blue stripes — transmembrane region, FBG — fibrinogen-related domain, FTP — fucoselectin domain, EGF — epidermal growth factor-like domain, EGF_CA — calcium-binding EGF-like domain, PAN_AP — APPLE-like domain, SCAN — leucine rich region, Apple — APPLE domain, GLECT — galactose-binding lectin, CLECT — C-type lectin, Gal-bind — galactoside-binding lectin, ML — MD-2-related lipid-recognition domain

Tachylectin-4 Pentaxrin-1 Domain), которые примерно в половине случаев ассоциированы с доменами CLECT и EGF (рис. 2с). Также выявлена немембранная форма F-лектина, содержащая ML-домен (MD-2-related lipid-recognition) (рис. 2с). Этот домен имеет структуру, напоминающую бета-складки иммуноглобулинов и участвует в распознавании липопротеидов низкой плотности (Inohara, Nuñez 2002). Таким образом эта предсказанная молекула включает одновременно углеводсвязывающий и липидсвязывающий домены.

C-лектины (C-type lectin-related proteins, CLECT) — группа PRR углеводсвязывающая активность которых зависит от концентрации ионов Ca²⁺ (Zelensky, Gready 2005). CLECT роговой катушки содержат от одного до четырёх (в одном из случаев — десять) углеводсвязывающих доменов C-типа (рис. 3а). В части предсказанных CLECT этот домен сочетается с доменами EGF, агглютинина и кринг-доменами (KD, kringle domain). Последний является компонентом белков свёртывания крови и фибринолитических белков, также способен связывать белки и фосфолипиды мембран (Clemmensen et al. 1986; Graversen et al. 2000).

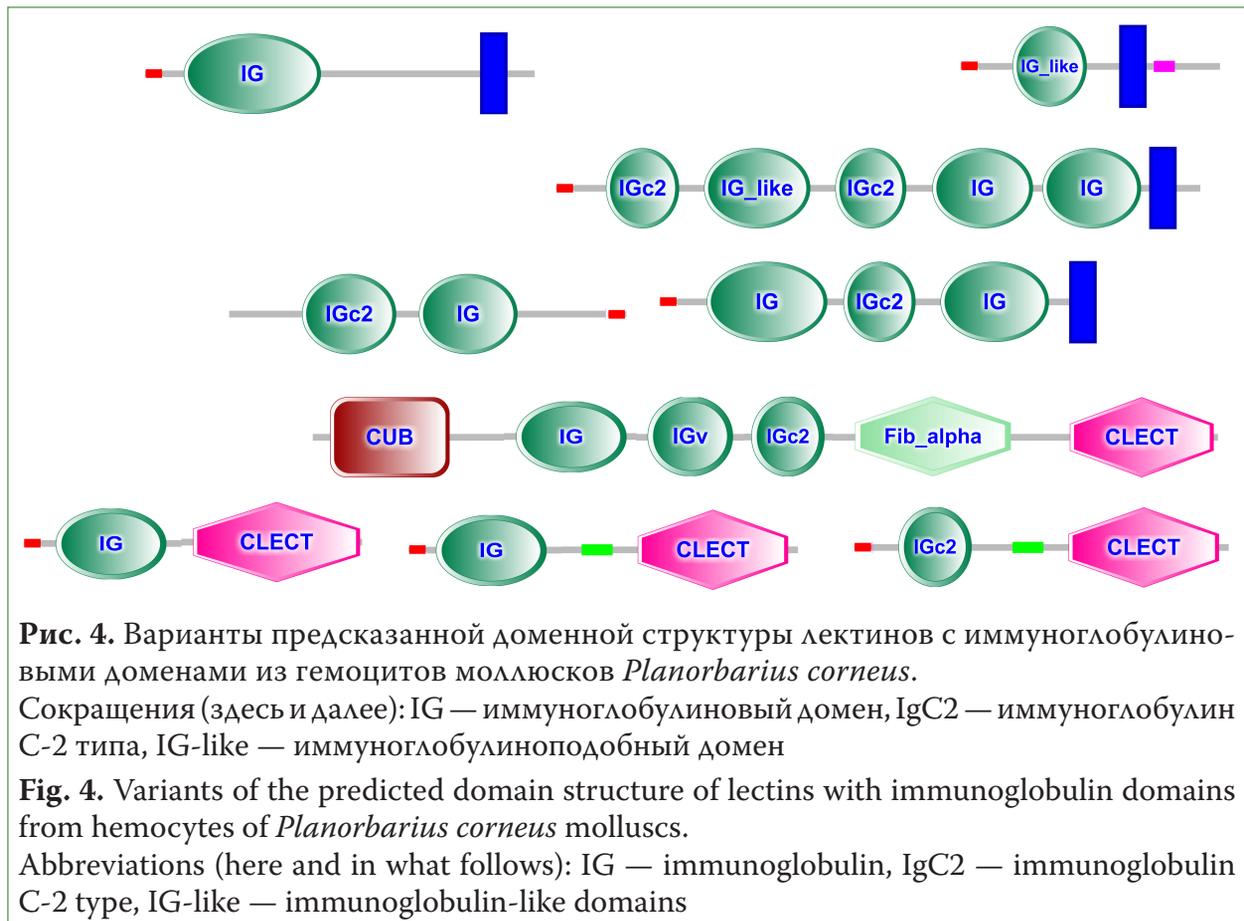
В одном из транскриптов, кодирующих мембранную форму CLECT, также закодирован домен LINK (рис. 3а). У позвоночных этот домен участвует в сборке внеклеточного матрикса, клеточной адгезии и миграции (Kohda et al. 1996). Значительная часть CLECT содержит домены суперсемейства иммуноглобулинов. У моллюсков эта группа белков обозначается как CREP и наряду с FREP рассматривается в качестве возможного аналога иммуноглобулинов позвоночных животных (Dheilly et al. 2015).

Коллектины представляют собой группу C-лектинов, к которым относится маннозо-связывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL). В гемоцитах роговой катушки нами выявлен один вариант транскрипта MBL, кодирующий 11 доменов CLECT (рис. 3б). MBL распознаёт остатки маннозы на поверхности патогенов,

обеспечивая опсонизацию и фагоцитоз, а также участвует в активации компонента по лектиновому пути (Fraser et al. 1998; Tenner 1998; Worthley et al. 2005). Наличие MBL в гемоцитах показано и для моллюсков других видов (Huang et al. 2013; Unno et al. 2016). Ранее был выделен и охарактеризован MBL из гемолимфы морской улитки *Hemifusus pugilinus* (Sivakamavalli et al. 2021). Описаны случаи как усиления экспрессии MBL у моллюсков при иммунизации, так и ослабления при трематодной инвазии (Hanington et al. 2010b; Lu et al. 2022).

Молекулы, содержащие домены суперсемейства иммуноглобулинов (immunoglobulin superfamily, IgSF). Молекулы IgSF являются ключевыми элементами адаптивной иммунной системы челюстноротых животных. Этим молекулам уделяется особое внимание в поисках филогенетических предшественников системы адаптивного иммунитета позвоночных животных. В суперсемейство IgSF включают белки, имеющие аминокислотную последовательность, которая определяет формирование характерной для иммуноглобулинов бета-складчатой структуры доменов. И если собственно иммуноглобулины, выполняющие функцию антител в адаптивном иммунном ответе, характерны для позвоночных животных, то молекулы IgSF широко распространены у животных, начиная с губок (Oreste et al. 2021). Они экспрессируются клетками многих типов и демонстрируют разнообразные функции: участвуют в адгезии, тканевом распознавании, презентации антигена, ко-рецепции, формировании сократительного аппарата мышечных клеток (Natarajan et al. 2015). Белки с доменами IgSF были функционально охарактеризованы у модельных беспозвоночных — нематоды *Caenorhabditis elegans* и плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Vogel et al. 2003; Natarajan et al. 2015).

Лектины, содержащие домены IgSF относятся к группе I-лектинов (Angata, Brinkman-Van der Linden 2002). I-лектины — самая многочисленная и разнообразная группа



тинов CREP (C-type lectin-related protein) (Dheilly et al. 2015).

Ещё одна группа I-лектинов моллюсков — лектины, связывающие сиаловую кислоту (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins, Siglecs) (Varki et al. 2022). За связывание сиаловой кислоты в этих молекулах отвечает V-домен IgSF, но одновременно присутствуют C2 домены. Среди транскриптов *P. corneus* выявлен только один вариант, который можно отнести к Siglecs (рис. 4). Помимо IgSF доменов он также включает домены CLECT, фибриногена и домен CUB. Этот домен встречается во внеклеточных и связанных с плазматической мембраной белках и участвует в регуляции межклеточных взаимодействий в процессах фагоцитоза, гистогенеза, распознавания субстрата (Blanc et al. 2007). Роль Siglecs в иммунном ответе доказана для моллюсков модельных видов. В частности, экспрессия соответствующего гена у устриц *Pacific oyster* повышается в гемоцитах в ответ на иммунизацию бактерией *Vibrio splendidus* (Liu et al. 2016). А для

моллюсков *Biomphalaria glabrata* установлена зависимость между степенью резистентности к трематодной инвазии и способностью Siglecs распознавать гликаны на поверхности спорозист трематод (Bridger et al. 2018).

Еще одна группа рецепторов, играющих значительную роль во врожденном иммунитете — скавенджер рецепторы (Scavenger receptors, SR). Рецепторы этой группы участвуют в поглощении собственных поврежденных клеток и продуктов их распада, а также различных патогенов (Berwin et al. 2003; Liu et al. 2011). Структура SR крайне разнообразна. Помимо скавенджер домена, богатого цистеинами, SR содержат большой набор других доменов. По структуре доменов выделяют не менее 10 классов SR (Gough, Gordon 2000; Murphy et al. 2005).

В исследуемом транскриптоме гемоцитов роговой катушки нами выявлены нуклеотидные последовательности, кодирующие четыре варианта SR (рис. 5). Наиболее простую структуру имеет рецептор с двумя SR доменами. Такой вариант со-

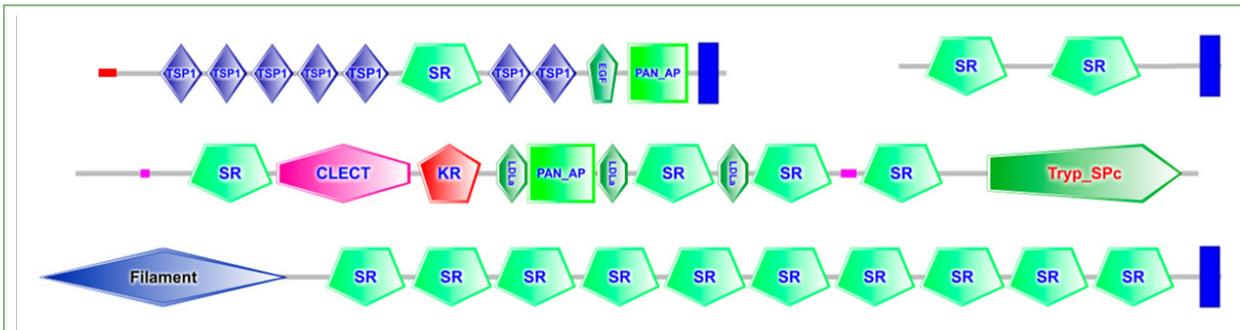


Рис. 5. Варианты предсказанной доменной структуры скавенджер-рецепторов гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus*.

Сокращения (здесь и далее): SR — богатый цистеином домен скавенджер-рецептора, Filament — домен промежуточного филамента, TSP1 — повторы тромбоспондина типа 1, KR — крингл-домен, LDLa — домен рецептора липопротеинов низкой плотности класса А

Fig. 5. Variants of the predicted domain structure of scavenger receptors from hemocytes of *Planorbarius corneus* molluscs.

Abbreviations (here and in what follows): SR — scavenger receptor Cys-rich domain, Filament — intermediate filament protein, TSP1 — thrombospondin type 1 repeats, KR — kringle domain, LDLa — low-density lipoprotein receptor domain class A

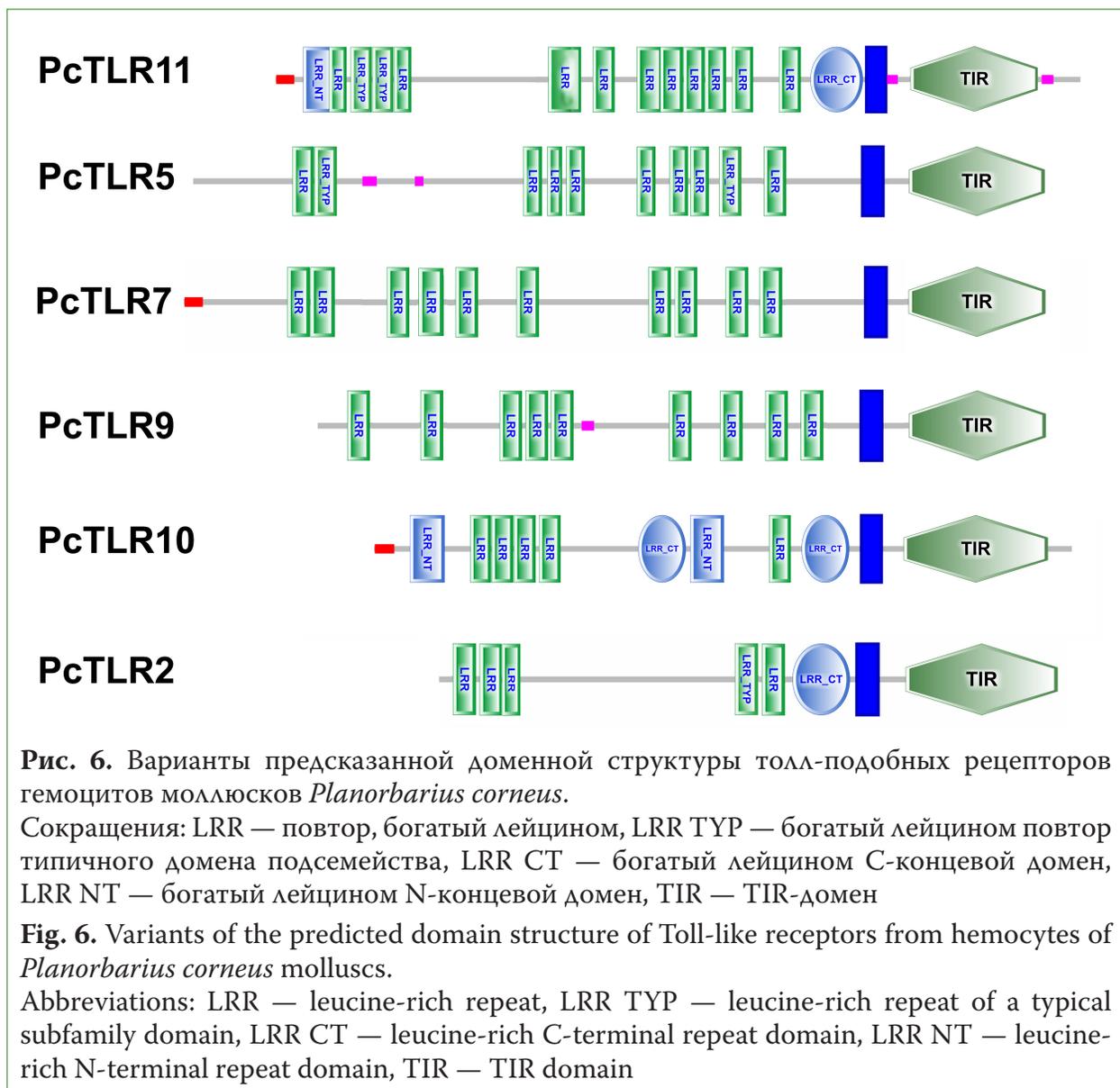
ответствует классу I SR млекопитающих. Другие варианты SR *Planorbarius corneus* имеют неканоничную структуру. В одном из предсказанных SR, присутствуют 10 богатых цистеинами доменов SR и домен, гомологичный белкам промежуточных филаментов. Известно, что в состав SR класса А входят домены, гомологичные коллагену, который, как и белки промежуточных филаментов относится к фибриллярным белкам (Prabhudas et al. 2014). Другой вариант наряду с SR доменами содержит домен CLECT и домен, гомологичный трипсин-подобным сериновым протеазам. В выполненном ранее исследовании по поиску SR у морского гребешка *Chlamys farreri* было выявлено 4 варианта SR (Liu et al. 2011). И также, как у роговой катушки, только один из вариантов структуры соответствует каноническому SR. Остальные варианты уникальны и не могут быть классифицированы. Таким образом, вероятно, как и лектины, SR моллюсков очень разнообразны.

Толл-подобные рецепторы. Одним из наиболее универсальных путей распознавания чужеродного в системе врождённого иммунитета считается распознавание через TLR (Hashimoto et al. 1988; Lemaitre

et al. 1996). TLR представляют собой трансмембранные белки, которые могут быть расположены как на поверхности клетки, так и на везикулах в цитоплазме. Внеклеточный домен TLR содержит богатые лейцитом повторы (leucine rich repeats, LRR), количество которых значительно варьирует. Именно этот домен отвечает за способность распознавать определённые PAMP. Внутриклеточный домен TIR (toll-interleukin-1 receptor homology domain) в свою очередь передаёт сигнал внутрь клетки через адаптерные белки (Bowie, O'Neill 2000). Именно TIR домен является наиболее консервативной частью молекулы, поэтому его последовательности чаще всего используют для классификации TLR.

В транскриптоме гемоцитов моллюсков *P. corneus* нами было выявлено 369 транскриптов, содержащих LRR, из которых 139 транскриптов содержали так же TIR домен. Из 40 полноразмерных транскриптов с данными доменами только 11 уникальных транскриптов были идентифицированы как TLR, одновременно кодирующие оба домена и имеющие трансмембранную область.

Длина последовательности 11 полных кДНК TLR *P. corneus* варьирует от 1180 до



2688 п.н., а кодируемых ими полипептидов от 360 до 896 аминокислот. Предсказанные TIR-домены включают от 137 до 191 аминокислот. Сходство между выявленными последовательностями TLR составляет от 22 до 31% (в среднем 27%). Предсказанные полипептиды были обозначены как PcTLR 1–11. По структуре все PcTLR можно отнести к шести группам. На рисунке 6 представлена их предсказанная доменная структура.

Полученные результаты показывают значительное разнообразие структуры PcTLR гемоцитов (рис. 6). Следует отметить, что выявленные варианты PcTLR являются результатами поиска рецепторов с канонической структурой. По данным ис-

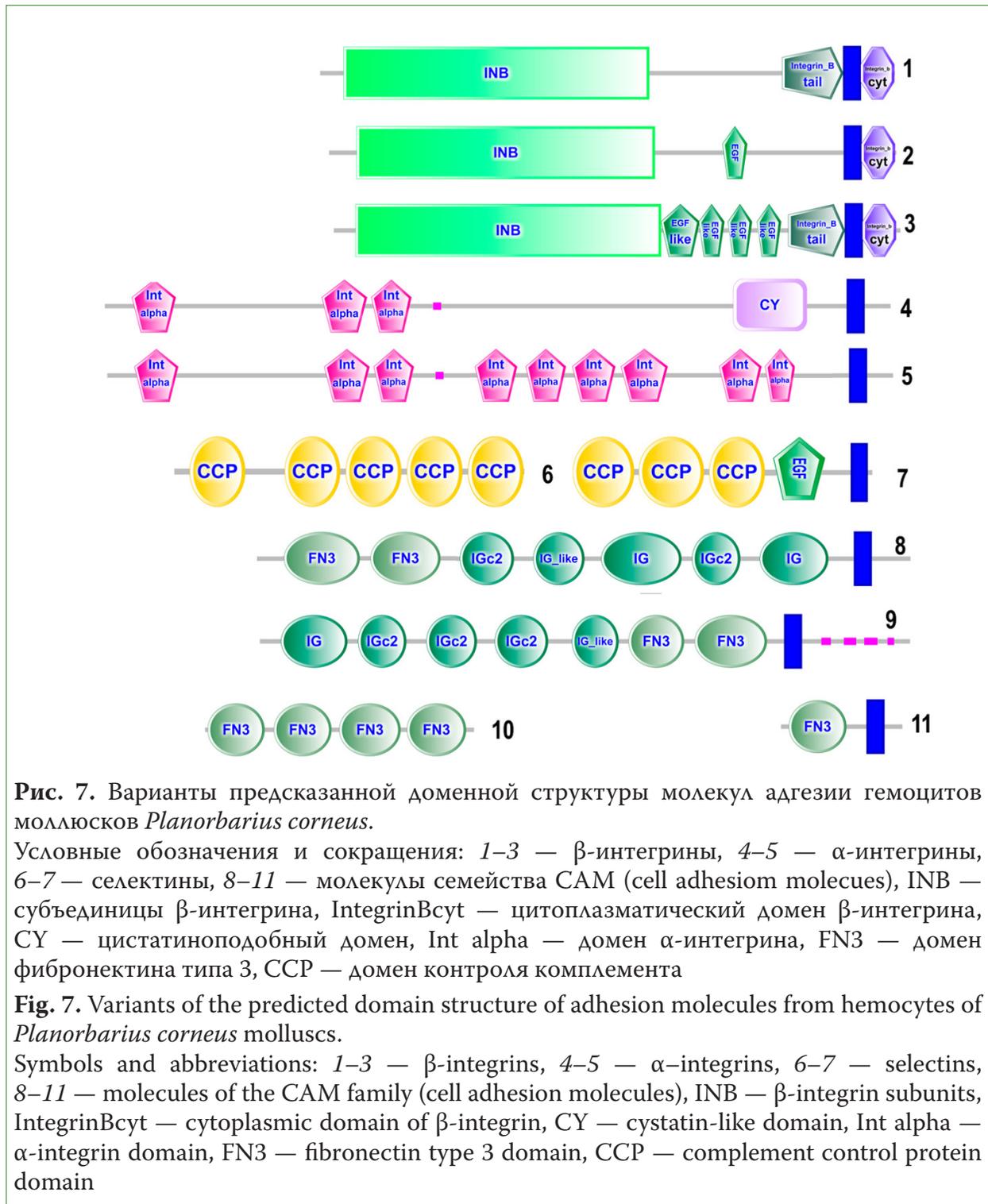
следований геномов у моллюсков могут присутствовать нетипичные варианты TLR (Kron 2022). Так у устриц из более чем 100 описанных TLR менее четверти имеют типичную доменную структуру, у аплизий 4 из 17 вариантов TLR имеют уникальную конфигурацию доменов (Kanzok et al. 2004; Kron 2022). Также показано возможное участие в распознавании и иммунном ответе молекул с LRR, но не содержащих TIR домен (Zhao et al. 2018). Вопрос о возможности включения этих молекул в группу TLR остаётся открытым.

Молекулы адгезии. Многие из вышеописанных лектинов проявляют свойства молекул адгезии, участвуя в процессах клеточной миграции, фагоцитоза и ин-

капсуляции (Wang et al. 2018). Однако отдельно нами были выделены транскрипты, кодирующие классические варианты молекул адгезии — интегрины, селектины, молекулы САМ (рис. 7).

Особенности состава молекул адгезии влияют на эффекторные функции клеток иммунитета. У двустворчатых моллюсков 11 вариантов интегринов, которые нерав-

номерно представлены на гемоцитах разных популяций. Определённые интегрины избирательно участвуют в фагоцитозе, миграции и инкапсуляции гемоцитов. Интересно, что у устриц именно β -интегрины опосредуют иммунные реакции, в то время как у млекопитающих в активации клеток иммунитета в основном участвуют α 1-содержащие интегрины (Lv et al. 2020).



Анализ экспрессии. Нами не было обнаружено достоверных различий в экспрессии генов PRRs между заражёнными и незаражёнными моллюсками. В то же время, для других факторов такие различия нами обнаружены (Orlov et al. 2023). Таким образом, можно думать, что в гемоцитах заражённых и незаражённых *P. corneus* гены основных групп PRRs экспрессируются на одном уровне.

Для более подробного выявления возможных эффектов инвазии на экспрессию генов PRRs, мы осуществили анализ относительной представленности транскриптов на основе метрики TPM, дающей информацию о соотношении транскриптов разных групп внутри одной выборки. Были выявлены различия в относительной представленности для лектинов нескольких групп. У заражённых моллюсков выше относительная представленность хилектинов, Н-лектинов и

Ф-лектинов, чем у незаражённых. При этом относительное количество транскриптов С-лектинов, галектинов и калнексина у заражённых моллюсков, напротив ниже, чем у незаражённых. Наибольший ингибирующий эффект заражения был отмечен для коллектинов. Представленность соответствующих им транскриптов в 2 раза ниже у заражённых моллюсков, по сравнению с незаражёнными (рис. 8).

Другая группа транскриптов, представленность которых отличается у заражённых *B. polonica* и незаражённых моллюсков *Planorbarius corneus* — транскрипты TLR. В частности, относительное число транскриптов PcTLR2 и PcTLR7 выше в гемоцитах незаражённых улиток, а PcTLR3, PcTLR10 и PcTLR11 — у заражённых моллюсков (рис. 8).

Наиболее существенные различия в представленности транскриптов между заражёнными незаражёнными моллюска-

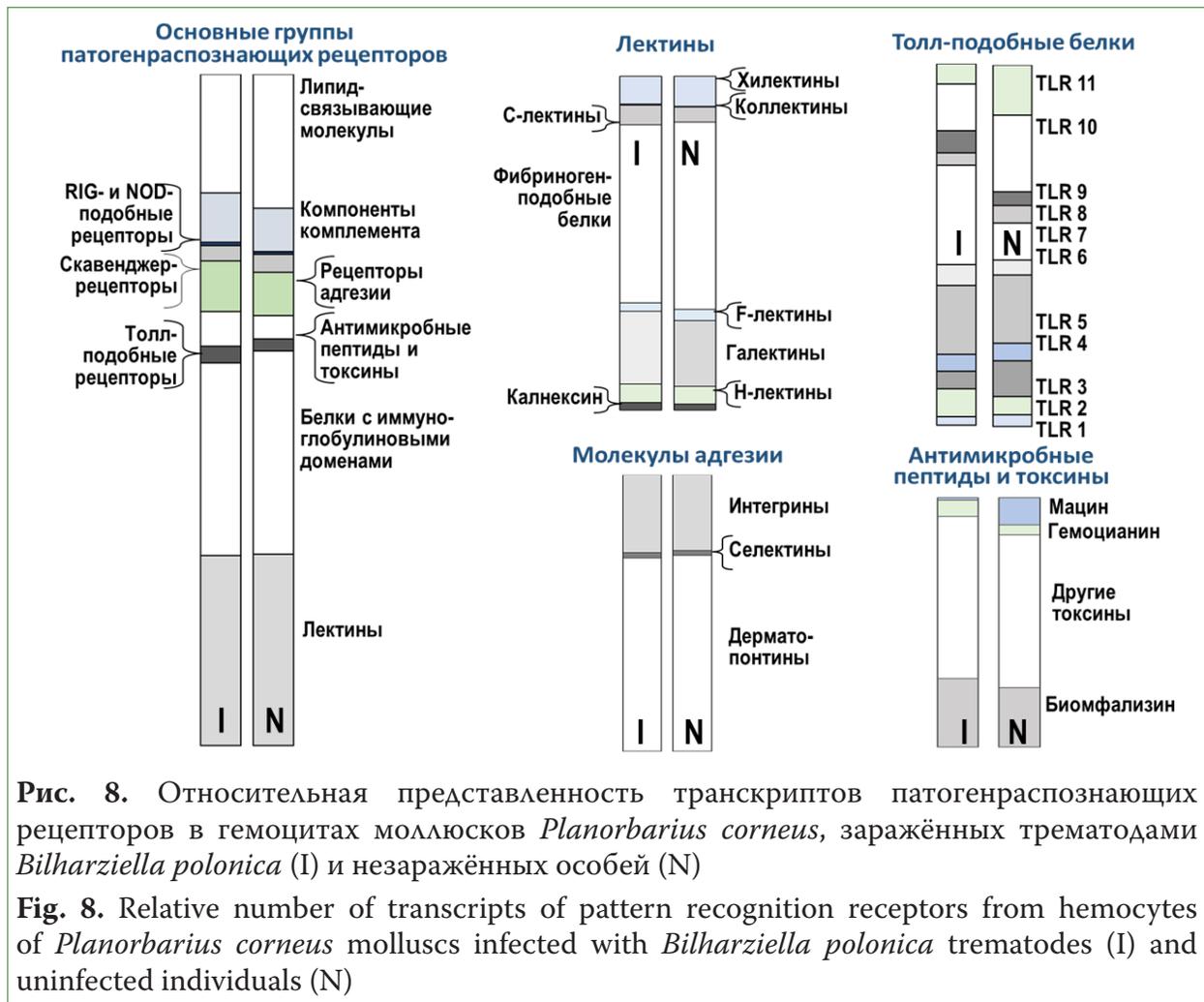


Рис. 8. Относительная представленность транскриптов патогенраспознающих рецепторов в гемоцитах моллюсков *Planorbarius corneus*, заражённых трематодами *Bilharziella polonica* (I) и незаражённых особей (N)

Fig. 8. Relative number of transcripts of pattern recognition receptors from hemocytes of *Planorbarius corneus* molluscs infected with *Bilharziella polonica* trematodes (I) and uninfected individuals (N)

ми были выявлены для антимикробных пептидов и токсинов. У заражённых моллюсков в 15 раз возрастает доля транскриптов мацина и заметно падает количество транскриптов биомфализина, по сравнению с незаражёнными. В то же время, у биомфаларий именно биомфализины принимают участие в антитрематодном иммунном ответе. Биомфализины моллюсков *Biomphalaria glabrata* способны связываться с поверхностью спороцист, бактериями и дрожжами (Li et al. 2020). У иммунизированных биомфаларий формируются многочисленные варианты транскриптов биомфализина, в зависимости от природы (особенностей) паразита (Pinaud et al. 2019). Но также для биомфаларий показано усиление выработки мацина при инвазии мирацидиями *Schistosoma mansoni* (Ittiprasert et al. 2010).

Можно предположить, что у моллюсков *Planorbarius corneus* именно мацины участвуют в антитрематодном иммунном ответе. Ранее роль в иммунитете мацинов была показана для пиявок *Hirudo medicinalis* и моллюсков *Physella acuta* (Schikorski et al. 2008; Schultz et al. 2018). Кроме того, хирудомацин обладает регенерирующим и иммуномодулирующим действием (Jung et al. 2012; Du et al. 2023).

У моллюсков описано большое количество антимикробных пептидов, участвующих в реакциях врождённого иммунитета (Wu et al. 2021). Эта группа белков выполняет роль не только PRR, но и токсинов и регуляторов иммунного ответа. Антимикробные пептиды накапливаются в гранулах фагоцитов и участвуют в элиминации фагоцитированных патогенов, а также в процессах внеклеточной цитотоксичности (Galinier et al. 2013; Tetreau et al. 2017; Li et al. 2020). Большое разнообразие антимикробных пептидов моллюсков, может быть, одним из адаптационных механизмов к обитанию в средах с разным набором патогенов.

Заключение

Анализ транскриптов показал большое разнообразие PRR в гемоцитах моллю-

сков *Planorbarius corneus*. Предсказанная структура рецепторов роговых катушек часто отличается от каноничной структуры PRR позвоночных животных. Репертуар и разнообразие PRR радикально отличается у моллюсков разных видов (Wang et al. 2018). У брюхоногих моллюсков такое разнообразие рецепторов может быть связано с тем, что развитие иммунитета гастропод в большой степени связано с эволюционно сложившимися паразито-хозяйинными системами «трематоды–моллюски» (Ataev, Polevshchikov 2004; Loker et al. 2004; Adema, Loker 2015). Каждый вид (или даже популяция) улиток сталкивается с определёнными видами патогенов. Взаимодействие с конкретным набором патогенов приводит к формированию уникального для данного вида набора PRR. В целом среди беспозвоночных наблюдается большее разнообразие PRR, по сравнению с позвоночными (Wang et al. 2018; Saco et al. 2023). При отсутствии специфических антигенраспознающих молекул расширение репертуара распознаваемых лигандов достигается за счёт увеличения количества вариантов PRR. Генотипически заданный набор PRR — характеристика вида. Исходя из этого, генотипически заданный репертуар PRR может рассматриваться как один из факторов, определяющих совместимость в системе паразит-хозяин.

Мы не выявили достоверных различий в экспрессии PRR между заражёнными трематодами и незаражёнными моллюсками (Orlov et al. 2023). Отсутствие существенных изменений экспрессии PRR при трематодной инвазии может быть связано с разными причинами. Прежде всего, PRR являются рецепторами врождённого иммунитета, которые конститутивно экспрессируются в гемоцитах. Поэтому набор и количество рецепторов каждого класса определяются типом клетки и этапом её дифференцировки и специализации. Изменение набора и интенсивности экспрессии отдельных PRR может быть связано с дифференцировкой гемоцитов в ходе иммунного ответа, когда изменяется соотно-

шение типов клеток, обладающих разной функциональной активностью (Donaghy et al. 2010; Adema, Loker 2015; Serebryakova et al. 2022). При анализе общего набора транскриптов всех гемоцитов такие различия уловить сложно. В настоящее время развиваются технологии секвенирования клеток отдельных пулов и даже единичных гемоцитов, которые, возможно, позволят выявить отличия между транскриптомами клеток на разных этапах специализации (Li et al. 2022).

Кроме того, иммунные реакции моллюсков на заражение трематодами имеют четкую временную динамику. Ряд авторов описывают усиление экспрессии PRR у моллюсков при трематодной инвазии, но через небольшое время после заражения (Wang et al. 2019; Ren et al. 2021; Chen et al. 2022). В нашей работе мы использовали особей, зараженных в природной среде обитания со зрелым заражением и точные сроки инвазии нам неизвестны. PRR обеспечивают распознавание паразита и повышения активности соответствующих им генов, возможно, следует ожидать в начале инвазии.

Важной особенностью PRR является способность рецепторов отдельных групп реагировать на целый набор лигандов. Спектры лигандной специфичности PRR разных групп перекрываются. Отсутствие строгой специфичности может «стирать» четкую картину изменения экспрессии

PRR при иммунном ответе моллюсков на различные патогены.

В то же время, именно изменение набора PRR в ходе иммунного ответа может лежать в основе такого явления как «тренированный иммунитет». Известно, что повторное заражение моллюсков трематодами часто приводит к более быстрой и эффективной элиминации патогена (Ataev et al. 2020). В качестве одного из механизмов тренированного иммунитета рассматривается «врожденная гуморальная память», проявляющаяся в более интенсивной выработке факторов гуморального иммунитета, нейтрализующих патогены (Portela et al. 2013; Pinaud et al. 2016). Однако вторичный иммунный ответ начинается с распознавания патогена. Изменение спектра или интенсивности экспрессии PRR в клетках, которые уже ранее сталкивались с патогенами может приводить к более эффективному распознаванию и, соответственно, к более быстрому запуску клеточных и гуморальных реакций. Такие специализированные в ходе первичного контакта с патогеном гемоциты могут обеспечивать запуск реакций тренированного иммунитета.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Гранта Министерства Просвещения РФ в рамках госзадания (проект VRFY-2023-0009).

References

- Adema, C. M., Hertel, L. A., Miller, R. D., Loker, E. S. (1997) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *PNAS*, vol. 94, no. 16, pp. 8691–8696. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8691> (In English)
- Adema, C. M., Hillier, L. W., Jones, C. S. et al. (2017) Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nature Communications*, vol. 16, no. 8, article 15451. <https://doi.org/10.1038/ncomms15451> (In English)
- Adema, C. M., Loker, E. S. (2015) Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 48, no. 2, pp. 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.06.014> (In English)
- Allan, E. R. O., Yang, L., Tennessen, J. A., Blouin, M. S. (2019) Allelic variation in a single genomic region alters the hemolymph proteome in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 88, pp. 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.065> (In English)
- Angata, T., Brinkman-Van der Linden, E. C. M. (2002) I-type lectins. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1572, no. 2–3, pp. 294–316. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00316-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00316-1) (In English)

- Ataev, G. L., Polevshchikov, A. V. (2004) Zashchitnye reaktsii bryukhonogikh mollyuskov. 1. Kletochnye reaktsii [Protective reactions of Gastropod molluscs. 1. Cell reactions]. *Parazitologiya*, vol. 38, no. 4, pp. 342–351. (In Russian)
- Ataev, G. L., Prokhorova, E. E., Kudryavtsev, I. V., Polevshchikov, A. V. (2016) The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). *Invertebrate Survival Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 164–171. (In English)
- Ataev, G. L., Prokhorova, E. E., Tokmakova, A. S. (2020) Zashchitnye reaktsii legochnykh mollyuskov pri parazitarnoj invazii [Defense reactions of pulmonate molluscs during parasitic invasion]. *Parazitologiya*, vol. 54, no. 5, pp. 371–401. <https://doi.org/10.31857/S1234567806050028> (In Russian)
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S. et al. (2003) Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 22, pp. 6127–6136. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg572> (In English)
- Blanc, G., Font, B., Eichenberger, D. et al. (2007) Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold: conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 23, pp. 16924–16933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701610200> (In English)
- Bowie, A., O'Neill, L. A. J. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 67, no. 4, pp. 508–514. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.508> (In English)
- Bridger, J. M., Brindley, P. J., Knight, M. (2018) The snail *Biomphalaria glabrata* as a model to interrogate the molecular basis of complex human diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 12, no. 8, article e0006552. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006552> (In English)
- Brown, R., Soldánová, M., Barrett, J., Kostadinova, A. (2011) Small-scale to large-scale and back: larval trematodes in *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* in Central Europe. *Parasitology Research*, vol. 108, pp. 137–150. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2047-z> (In English)
- Chen, H., Cai, X., Li, R. et al. (2022) A novel toll-like receptor from *Crassostrea gigas* is involved in innate immune response to *Vibrio alginolyticus*. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 97, article 105159 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105159> (In English)
- Clemmensen, I., Petersen, L. C., Kluft, C. (1986) Purification and characterization of a novel, oligomeric, plasminogen kringle-4 binding protein from human plasma: tetranectin. *European Journal of Biochemistry*, vol. 156, no. 2, pp. 327–333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09586.x> (In English)
- Dheilly, N. M., Duval, D., Mouahid, G. et al. (2015) A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 48, no. 1, pp. 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.009> (In English)
- Donaghy, L., Hong, H.-K., Lambert, C. et al. (2010) First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 28, no. 1, pp. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.10.006> (In English)
- Du, Y., Shi, H., Guo, Q. et al. (2023) Hirudomacin: a Protein with Dual Effects of Direct Bacterial Inhibition and Regulation of Innate Immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 89, no. 7, article e0052723. <https://doi.org/10.1128/aem.00527-23> (In English)
- Faltýnková, A., Našincová, V., Kablášková, L. (2008) Larval trematodes (Digenea) of planorbid snails (Gastropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. *Systematic Parasitology*, vol. 69, pp. 155–178. <https://doi.org/10.1007/s11230-007-9127-1> (In English)
- Fraser, I. P., Koziel, H., Ezekowitz, R. A. B. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology*, vol. 10, no. 5, pp. 363–372. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0141> (In English)
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z. et al. (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, vol. 28, no. 23, pp. 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565> (In English)
- Galinier, R., Portela, J., Mone, Y. et al. (2013). Biomphalysin, a new β pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*, vol. 9, no. 3., article e1003216. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003216> (In English)
- Gong, H., Kobayashi, K., Sugi, T. et al. (2012) A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification. *PLoS One*, vol. 7, no. 1, article e30169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030169> (In English)
- Gordy, M. A., Pila, E. A., Hanington, P. C. (2015) The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 46, no. 1, pp. 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.005> (In English)

- Gough, P. J., Gordon, S. (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and Infections*, vol. 2, no. 3, pp. 305–311. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00297-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00297-5) (In English)
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z. et al. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, vol. 29, pp. 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883> (In English)
- Graversen, J. H., Sigurskjold, B. W., Thøgersen, H. C., Etzerodt, M. (2000) Tetraneurin-binding site on plasminogen kringle-4 involves the lysine-binding pocket and at least one additional amino acid residue. *Biochemistry*, vol. 39, no. 25, pp. 7414–7419. <https://doi.org/10.1021/bi000155j> (In English)
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, no. 2, pp. 95–98. (In English)
- Hanington, P. C., Forsys, M. A., Dragoo, J. W. et al. (2010a) Role for a somatically diversified lectin in the resistance of an invertebrate to parasite infection. *PNAS*, vol. 107, no. 49, pp. 21087–21092. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011242107> (In English)
- Hanington, P. C., Forsys, M. A., Loker, E. S. (2012) A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to Schistosoma infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 3, article e1591. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001591> (In English)
- Hanington, P. C., Lun, C.-M., Adema, C. M., Loker, E. S. (2010b) Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *International Journal of Parasitology*, vol. 40, no. 7, pp. 819–831. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.005> (In English)
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, vol. 52, no. 2, pp. 269–279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90516-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8) (In English)
- Hernandez, J. D., Baum, L. G. (2002) Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, vol. 12, no. 10, pp. 127R–136R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwf081> (In English)
- Huang, M., Song, X., Zhao, J. et al (2013) A C-type lectin (AiCTL-3) from bay scallop *Argopecten irradians* with mannose/galactose binding ability to bind various bacteria. *Gene*, vol. 531, no. 1, pp. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.042> (In English)
- Inohara, N., Nuñez, G. (2002) ML — a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 27, no. 5, pp. 219–221. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02084-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02084-4) (In English)
- Ittiprasert, W., Miller, A., Myers, J. et al. (2010) Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, vol. 169, no. 1, pp. 27–39. <https://doi.org/j.molbiopara.2009.09.009> (In English)
- Janeway, C. A. Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, vol. 20, pp. 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359> (In English)
- Jung, S., Sönnichsen, F. D., Hung, C.-W. et al. (2012) Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 17, pp. 14246–14258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336495> (In English)
- Kanzok, S. M., Hoa, N. T., Bonizzoni, M. et al. (2004) Origin of Toll-like receptor-mediated innate immunity. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 58, pp. 442–448. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2565-8> (In English)
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S. L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, vol. 12, no. 4, pp. 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317> (In English)
- Kim, J. Y., Kim, Y. M., Cho, S. K. et al. (2008) Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Developmental and comparative immunology*, vol. 32, no. 10, pp. 1131–1141. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.03.002> (In English)
- Kohda, D., Morton, C. J., Parkar, A. A. et al. (1996) Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell*, vol. 86, no. 5, pp. 767–775. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80151-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80151-8) (In English)
- Kokryakov, V. N. (2006) *Ocherki o vrozhdennom immunitete [Essays on innate immunity]*. Saint Petersburg: Nauka Publ., 261 p. (In Russian)
- Kron, N. S. (2022) In search of the *Aplysia* immunome: an in silico study. *BMC Genomics*, vol. 23, article 543. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08780-6> (In English)
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, vol. 30, no. 1, pp. 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976> (In English)

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L. et al. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, vol. 86, no. 6, pp. 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5) (In English)
- Letunic, I., Khedkar, S., Bork, P. (2021) SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, vol. 49, no. D1, pp. D458–D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937> (In English)
- Li, H., Gharamah, A. A., Hambrook, J. R. et al. (2022) Single-cell RNA-seq profiling of individual *Biomphalaria glabrata* immune cells with a focus on immunologically relevant transcripts. *Immunogenetics*, vol. 74, pp. 77–98. <https://doi.org/10.1007/s00251-021-01236-3> (In English)
- Li, H., Hambrook, J. R., Pila, E. A. et al. (2020) Coordination of humoral immune factors dictates compatibility between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. *eLife*, vol. 9, article e51708. <https://doi.org/10.7554/eLife.51708> (In English)
- Liu, C., Jiang, S., Wang, M. et al. (2016) A novel siglec (CgSiglec-1) from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with broad recognition spectrum and inhibitory activity to apoptosis, phagocytosis and cytokine release. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 61, pp. 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.026> (In English)
- Liu, L., Yang, J., Qiu, L. et al. (2011) A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 35, no. 2, pp. 227–239 <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.010> (In English)
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S.-M., Kepler, T. (2004) Invertebrate immune systems — not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, vol. 198, no. 1, pp. 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x> (In English)
- Lu, L., Bu, L., Zhang, S.-M. et al. (2022) An Overview of Transcriptional Responses of Schistosome-Susceptible (M line) or -Resistant (BS-90) *Biomphalaria glabrata* Exposed or Not to *Schistosoma mansoni* Infection. *Frontiers in Immunology*, vol. 12, article 805882. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.805882> (In English)
- Lv, Z., Qiu, L., Wang, W. et al. (2020) The Members of the Highly Diverse *Crassostrea gigas* Integrin Family Cooperate for the Generation of Various Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, vol. 11, article 1420. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01420> (In English)
- Marcel, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, vol. 17, no. 1, pp. 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200> (In English)
- Moné, Y., Gourbal, B., Duval, D. et al. (2010) A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 9, article e813. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000813> (In English)
- Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S. et al. (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, vol. 182, no. 1, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.036> (In English)
- Natarajan, K., Mage, M. G., Margulies, D. H. (2015) Immunoglobulin Superfamily. [Online]. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000926.pub2> (accessed 12.12.2023) (In English)
- Oreste, U., Ametrano, A., Coscia, M. R. (2021) On Origin and Evolution of the Antibody Molecule. *Biology*, vol. 10, no. 2, article 140. <https://doi.org/10.3390/biology10020140> (In English)
- Orlov, I. A., Ataev, G. L., Gourbal, B. et al. (2023) The transcriptomic analysis of *Planorbarius corneus* hemocytes (Gastropoda) naturally infected with *Bilharziella polonica* (Schistosomatidae). *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 140, article 104607. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104607> (In English)
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I. et al. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, vol. 14, pp. 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197> (In English)
- Peterson, N. A., Hokke, C. H., Deelder, A. M., Yoshino, T. P. (2009) Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: Differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 12, pp. 1331–1344. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.002> (In English)
- Pila, E. A., Li, H., Hambrook, J. R. et al. (2017) Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. *Trends in parasitology*, vol. 33, no. 11, pp. 845–857. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.006> (In English)
- Pinaud, S., Portela, J., Duval, D. et al. (2016) A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *PLOS Pathogens*. Vol. 12, no. 1, article e1005361. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361> (In English)

- Pinaud, S., Portet, A., Allienne, J.-F. et al. (2019) Molecular characterisation of immunological memory following homologous or heterologous challenges in the schistosomiasis vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 92, pp. 238–252. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.12.001> (In English)
- Portela, J., Duval, D., Rognon, A. et al. (2013) Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the Lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *Journal of Innate Immunity*, vol. 5, no. 3, pp. 261–276. <https://doi.org/10.1159/000345909> (In English)
- Prabhudas, M., Bowdish, D., Drickamer, K. et al. (2014) Standardizing scavenger receptor nomenclature. *Journal of Immunology*, vol. 192, no. 5, pp. 1997–2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1490003> (In English)
- Ren, Y., Liu, H., Fu, S. et al. (2021) Transcriptome-wide identification and characterization of toll-like receptors response to *Vibrio anguillarum* infection in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 111, pp. 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.01.007> (In English)
- Saco, A., Novoa, B., Greco, S. et al. (2023) Bivalves Present the Largest and Most Diversified Repertoire of Toll-Like Receptors in the Animal Kingdom, Suggesting Broad-Spectrum Pathogen Recognition in Marine Waters. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 40, no. 6, article msad133. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad133> (In English)
- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M. et al. (2008) Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 2, pp. 1083–1095. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1083> (In English)
- Schumacher, C., Wang, H., Honer, C. et al. (2000) The SCAN domain mediates selective oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 22, pp. 17173–17179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000119200> (In English)
- Seppälä, O., Walser, J.-C., Cereghetti, T. et al. (2021) Transcriptome profiling of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) for ecoimmunological research. *BMC Genomics*, vol. 22, article 144. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07428-1> (In English)
- Seppy, M., Manni, M., Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1962, pp. 227–245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14 (In English)
- Serebryakova, M. K., Tokmakova, A. S., Prokhorova, E. E., Ataev, G. L. (2022) Changes in the cell composition of the hemolymph in the snail *Planorbarius corneus* after infection with the trematode *Plagiorchis* sp. *Invertebrate Biology*, vol. 141, no. 4, article e12389. <https://doi.org/10.1111/ivb.12389> (In English)
- Schultz, J. H., Bu, L., Adema, C, M. (2018) Comparative immunological study of the snail *Physella acuta* (Hydrophila, Pulmonata) reveals shared and unique aspects of gastropod immunobiology. *Molecular Immunology*, vol. 101, pp. 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.029> (In English)
- Sivakamavalli, J., Park, K., Kwak, I.-S., Vaseeharan, B. (2021) Purification and partial characterization of carbohydrate-recognition protein C-type lectin from *Hemifusus pugilinus*. *Carbohydrate Research*, vol. 499, article 108224. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108224> (In English)
- Sminia, T, van der Knaap, W. P. W. (1987) Cells and molecules in molluscan immunology. *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 11, no. 1, pp. 17–28. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(87\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0145-305x(87)90004-8) (In English)
- Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R. et al. (2016) TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, vol. 26, no. 8, pp. 1134–1144. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115> (In English)
- Tenner, A. J. (1998) C1q receptors: regulating specific functions of phagocytic cells. *Immunobiology*, vol. 199, no. 2, pp. 250–264. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(98\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(98)80031-4) (In English)
- Tetreau, G., Pinaud, S., Portet, A. et al. (2017) Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. *Frontiers In Immunology*, vol. 8, article 1249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01249>
- Unno, H., Matsuyama, K., Tsuji, Y. et al. (2016) Identification, Characterization, and X-ray Crystallographic Analysis of a Novel Type of Mannose-Specific Lectin CGL1 from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Scientific reports*, vol. 6, article 29135. <https://doi.org/10.1038/srep29135> (In English)
- Van der Knaap, W. P. W. (1981) Recognition of foreignness in the internal defense system of the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. In: J. B. Solomon (ed.). *Aspects of Developmental and Comparative Immunology. Proceedings of the 1st Congress of Developmental and Comparative Immunology, 27 July — 1 August 1980, Aberdeen*. Aberdeen: Pergamon Press, pp. 91–97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025922-2.50018-8> (In English)

- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al. (eds.). (2022) *Essentials of Glycobiology*. 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 859 p. PMID: 35536922 (In English)
- Vasta, G. R., Ahmed, H. (eds.). (2008) *Animal lectins. A functional view*. Boca Raton: CRC Press, 596 p. <https://doi.org/10.1201/9781420006971> (In English)
- Vogel, C., Teichmann, S. A., Chothia, C. (2003) The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity. *Development*, vol. 130, no. 25, pp. 6317–6328. <https://doi.org/10.1242/dev.00848> (In English)
- Wang, P., Zhang, Z., Xu, Z. et al. (2019) A novel invertebrate toll-like receptor with broad recognition spectrum from thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 89, pp. 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.059> (In English)
- Wang, W., Song, X., Wang, L., Song, L. (2018) Pathogen-Derived Carbohydrate Recognition in Molluscs Immune Defense. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 3, article 721. <https://doi.org/10.3390/ijms19030721> (In English)
- Watson, A., Agius, J., Ackerly, D. et al. (2022) The Role of Anti-Viral Effector Molecules in Mollusc Hemolymph. *Biomolecules*, vol. 12, no. 3, article 345. <https://doi.org/10.3390/biom12030345> (In English)
- Worthley, D. L., Bardy, P. G., Mullighan, C. G. (2005) Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, vol. 35, no. 9, pp. 548–555. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2005.00908.x> (In English)
- Wu, R., Patocka, J., Nepovimova, E., et al. (2021) Marine Invertebrate Peptides: Antimicrobial Peptides. *Frontiers In Microbiology*, vol. 12, article 785085. <https://doi.org/10.1016/10.3389/fmicb.2021.785085> (In English)
- Yoshino, T. P., Dinguirard, N., Kunert, J., Hokke, C. H. (2008) Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Gene*, vol. 411, no. 1–2, pp. 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.01.003> (In English)
- Żbikowska, E. (2004) Infection of snails with bird schistosomes and the threat of swimmer's itch in selected Polish lakes. *Parasitology Research*, vol. 92, pp. 30–35. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0997-0> (In English)
- Zelensky, A. N., Gready, J. E. (2005) The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, vol. 272, pp. 6179–6217. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x> (In English)
- Zhang, Q., Zmasek, C. M., Godzik, A. (2010) Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors. *Immunogenetics*, vol. 62, no. 5, pp. 263–272. PMID: 20195594 (In English)
- Zhang, S.-M., Zeng, Y., Loker, E. S. (2008) Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. *Innate Immunity*, vol. 14, no. 3, pp. 175–189. <https://doi.org/10.1177/1753425908093800> (In English)
- Zhao, Q. P., Gao, Q., Zhang, Y. et al. (2018) Identification of Toll-like receptor family members in *Oncomelania hupensis* and their role in defense against *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*, vol. 181, pp. 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.008> (In English)

Для цитирования: Прохорова, Е. Е., Бобровская, А. В., Цымбаленко, Н. В. (2024) Патогенраспознающие молекулы гемоцитов моллюсков *Planorbarius corneus* (Planorbidae, Pulmonata). *Амурский зоологический журнал*, т. XVI, № 1, с. 36–55. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-1-36-55>

Получена 21 декабря 2023; прошла рецензирование 30 января 2024; принята 1 февраля 2024.

For citation: Prokhorova, E. E., Bobrovskaya, A. V., Tsybalenko, N. V. (2024) Pathogen recognition molecules from hemocytes of *Planorbarius corneus* molluscs (Planorbidae, Pulmonata). *Amurian Zoological Journal*, vol. XVI, no. 1, pp. 36–55. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-1-36-55>

Received 21 December 2023; reviewed 30 January 2024; accepted 1 February 2024.