

на правах рукописи

ДОЛГИХ
Вячеслав Васильевич

**БИОХИМИЧЕСКИЕ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
АДАПТАЦИИ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРОСПОРИДИЙ РОДА
PARANOSEMA К ВНУТРИКЛЕТОЧНОМУ ПАРАЗИТИЗМУ**

03.02.11 – паразитология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Научный консультант: **Исси Ирма Викторовна**
доктор биологических наук, профессор
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты: **Гранович Андрей Игоревич**
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский
государственный университет», заведующий
кафедрой зоологии беспозвоночных

Мордвинов Вячеслав Алексеевич
доктор биологических наук
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН,
заведующий лабораторией молекулярных
механизмов патологических процессов

Иешко Евгений Павлович
доктор биологических наук, профессор
ФГБУН Институт биологии Карельского
научного центра РАН, заведующий
лабораторией паразитологии животных и
растений

Ведущая организация: ФГБУН Институт систематики и экологии
животных СО РАН

Защита состоится « » 2017 г. в « » часов на заседании
диссертационного совета Д 002.223.01, созданного на базе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт
Российской академии наук, по адресу: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического
института РАН, <http://www.zin.ru/>

Автореферат разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Овчинникова Ольга Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Микроспоридии являются филогенетически близкими к грибам облигатными внутриклеточными паразитами и включают в круг своих хозяев представителей практически всех типов животного царства от простейших до приматов включительно. Уже первые результаты ультраструктурного анализа микроспоридий показали (1) наличие в спорах уникального аппарата, обеспечивающего механическое внесение зародыша в инвазируемую клетку, (2) отсутствие ряда органелл и структур, свойственных эукариотической клетке (гранул запасных питательных веществ, митохондрий, лизосом, пероксисом, “классического“ аппарата Гольджи). Все это свидетельствует о длительной истории взаимоотношений микроспоридий со своими хозяевами и характеризует их как чрезвычайно интересный объект для фундаментальных исследований.

Практическое значение этих паразитов также трудно переоценить. Особое внимание вызывает возрастающее число видов микроспоридий, описанных как возбудители серьезных заболеваний у людей с различными формами иммунодефицита, вызванных вирусом СПИД и действием иммунодепрессантов (Weber et al., 1994). Микроспоридии также являются возбудителями опасных заболеваний мидий, промысловых видов рыб и теплокровных домашних животных. Однако подавляющее большинство видов микроспоридий развивается в членистоногих, главным образом, в насекомых. Именно их широкое распространение среди насекомых и ярко выраженный антагонистичный характер взаимоотношений с этой группой хозяев во многом определяют практический интерес к группе. Например, микроспоридия *Nosema bombycis* является опасным патогеном тутового шелкопряда *Bombyx mori*, вызывая болезнь, известную как пембрина шелковичных червей. Огромный урон пчеловодству наносят микроспоридии *Nosema apis* и *Nosema ceranae*. Именно *N. ceranae* рассматривается в настоящее время как возбудитель синдрома разрушения колоний медоносных пчел.

Важную роль энтомопатогенные микроспоридии играют в защите растений, контролируя численность особей в популяциях фитофагов и вызывая эпизоотии у нескольких десятков видов вредителей, относящихся, чаще всего, к отрядам чешуекрылых, жесткокрылых и прямокрылых насекомых (Исси, 1984). Большое внимание уделяется микроспоридиям и как потенциальным агентам микробиологического метода защиты от вредителей сельскохозяйственных культур, леса, запасов (Canning, 1973, 1982 a,b; Кауа,

1975; Wilson, 1984; Исси, 1986). В качестве агентов для борьбы с вредными насекомыми-фитофагами в настоящее время изучаются микроспоридии родов *Nosema* (Lewis et al., 2009; Solter, Hajek, 2009; Solter et al. 2012) и *Vairimorpha* (Oi and Valles 2009; Briano et al. 2012; Solter, Hajek 2009; Solter et al. 2012). Однако наиболее перспективным для создания микробиологических препаратов, способных контролировать численность насекомых- вредителей, следует признать представителя рода *Paranosema*. В 1980 году препаративная форма на основе спор *Paranosema locustae* была зарегистрирована в США (NoloBait™) для борьбы с прямокрылыми и до настоящего времени является единственным коммерческим препаратом на основе спор микроспоридий.

Несмотря на значительный практический и фундаментальный интерес к микроспоридиям, к началу выполнения данной работы мы почти ничего не знали о биохимических и структурно-функциональных особенностях адаптации микроспоридий к внутриклеточному развитию и о молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенного воздействия этих паразитов на организм хозяина. Мало что было известно и о метаболизме микроспоридий и их взаимодействии с обменными процессами хозяина. Далекими от понимания оставались и механизмы, обеспечивающие формирование уникальной, сложноустроенной споры микроспоридий, ее выживание во внешней среде и последующую быструю активацию. На уровне гипотезы оставалось и предположение об активном вмешательстве этих паразитов в управление физиологическими и регуляторными процессами зараженной клетки.

Цель и задачи исследования. Основная цель работы - изучение метаболических и структурно-функциональных аспектов адаптаций энтомо-патогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному развитию и молекулярных механизмов патогенного воздействия этих паразитов на организм насекомого-хозяина. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить особенности энергетического и углеводного обмена микроспоридий и проследить перестройку метаболических процессов в ходе жизненного цикла паразитов.

2. Оценить степень метаболической зависимости микроспоридий от насекомого-хозяина и расшифровать молекулярные механизмы, позволяющие паразитам эффективно эксплуатировать энергетическую систему зараженной клетки.

3. Выявить структурно-функциональные особенности секреторного аппарата микроспоридий, способные обеспечить высокую скорость формирования спор.

4. Оценить возможность целенаправленного воздействия микроспоридий на хозяина с помощью секреторируемых белков и исследовать их роль в управлении зараженной клеткой.

5. Обнаружить биохимические особенности микроспоридий рода *Paranosema*, способные определять эффективность паразитов этой группы в качестве агентов для биоконтроля.

Научная новизна исследования. Впервые сделан вывод о способности микроспоридий поглощать готовую АТФ клетки хозяина с помощью специфичных белков-переносчиков и впервые показано, что наличие у микроспоридий генов, кодирующих пластидно-бактериальный тип АТФ/АДФ-транслоказ, является универсальной особенностью типа. Впервые показано, что эксплуатация микроспоридиями энергетической системы клетки хозяина с помощью уникальных переносчиков сопровождается выключением собственного метаболического аппарата, функционирующего только на стадии споры. В спорах микроспоридии *P. locustae* впервые выявлены митосомы - рудименты митохондрий и установлена локализация альтернативной дыхательной цепи на внутренней мембране митосом. Впервые изучена активность, субъединичный состав и показана эволюционная релокализация редуцированной пируватдегидрогеназы микроспоридий. Предложена схема участия фермента в активации спор.

У микроспоридий рода *Paranosema* впервые показана непрерывность секреторного пути и отсутствие изолированных транспортных везикул. Установлено, что минимизация аппарата гликозилирования белков является общей особенностью секреторного пути этих паразитов. Впервые доказана способность микроспоридий секретировать в цитоплазму зараженной клетки функционально различные белки, потенциально способные участвовать в управлении физиологическими и молекулярно-генетическими процессами насекомого-хозяина. Впервые получены данные о том, что секреторируемая микроспоридиями гексокиназа накапливается в ядре зараженной клетки.

Впервые клонированы белок-кодирующие последовательности 14 генов микроспоридии *P. locustae*, созданы генетические конструкции и осуществлена их эффективная экспрессия в бактериях или дрожжевых грибах, к рекомбинантным белкам получены специфичные антитела.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование внесло значительный вклад в познание биохимических и структурно-функциональных аспектов адаптации энтомопатогенных микроспоридий к развитию в клетке насекомого-хозяина. В результате этой работы показано, что длительная эволюция микроспоридий сопровождалась не только минимизацией функционального аппарата клетки, но и приобретением целого ряда уникальных особенностей, не обнаруженных у других эукариотических организмов. Особо интересной структурно-функциональной особенностью секреторного аппарата микроспоридий рода *Paranosema* следует признать отсутствие у них изолированных транспортных везикул.

Практическая значимость работы связана с выявлением белков, играющих ключевую роль в метаболизме паразитов, и с раскрытием основных механизмов их патогенного воздействия на зараженную клетку и организм хозяина в целом. Проведенное исследование показало очень глубокую зависимость энтомопатогенных микроспоридий от метаболической системы насекомого. Поскольку облигатный паразит «заинтересован» в длительном сохранении жизнеспособности хозяина, патогенез при микроспоридиозах развивается относительно медленно и сопровождается снижением содержания запасов в жировом теле насекомых, подавлением активности репродуктивной и защитных систем, функциональными нарушениями в зараженных клетках и тканях. Таким образом, в качестве основного результата применения микроспоридиальных препаратов следует ожидать не быструю гибель целевого объекта, а супрессирующее воздействие паразита, длительное время циркулирующего в популяции насекомых-фитофагов.

В результате проведенных исследований показано, что ведущую роль в обеспечении внутриклеточного развития микроспоридий играет их паразитирование на обменных процессах хозяина с использованием уникальных переносчиков, встроенных в цитоплазматическую мембрану паразитов. Именно эти белки следует рассматривать в качестве основных кандидатов при поиске мишеней для воздействия на патогенов при их внутриклеточном развитии в полезных объектах или у человека. Собственный метаболический аппарат микроспоридий играет важную роль лишь в обеспечении жизнеспособности и инвазионности уже сформированных спор. Следовательно, воздействие на метаболические ферменты этих паразитов в целях подавления их развития представляется менее эффективным. Вместе с тем, альтернативная оксидаза и пируватдегидрогеназа микроспоридий,

возможно, представляют интерес для разработки новых терапевтических средств лечения микроспориidioзов в силу своей уникальности.

На примере *P. locustae* мы впервые продемонстрировали, что энтомопатогенные микроспоридии секретируют функционально разные белки в зараженную клетку. Очевидно, что роль этих молекул связана с перестройкой метаболических процессов и молекулярных программ хозяина для обеспечения внутриклеточного развития патогена. Мы находимся пока лишь на первом этапе изучения этого тонкого и сложного процесса. Можно лишь предположить, что инструменты, используемые микроспоридиями для воздействия на зараженную клетку и организм хозяина, могут оказаться весьма полезными для разработки новых методов борьбы с вредными насекомыми и управления эукариотической клеткой в целом.

В ходе исследований показано, что микроспоридии секретируют в зараженную клетку насекомых значительные количества двух ферментов - α/β -гидролазы и гексокиназы. Антитела к этим белкам могут быть использованы для создания высокочувствительных систем иммунодиагностики микроспориidioзов насекомых.

Материалы диссертации использованы для чтения спецкурса «Молекулярные и биохимические аспекты паразитизма при протозойных и гельминтных инвазиях» на кафедре зоологии беспозвоночных Санкт-Петербургского государственного университета, а также при подготовке коллективных монографий:

1. «The Microsporidia and Microsporidiosis», American Society for Microbiology, Washington, 1999.
2. «Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты», Москва, 2001 г.
3. «Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution », Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Landes Bioscience, 2007.
4. «Microsporidia: Pathogens of Opportunity», John Wiley & Sons, Inc. 2014.

Методология и методы исследования. Для анализа функционального аппарата микроспоридий использован широкий набор методов световой и электронной микроскопии, биохимии, молекулярной и клеточной биологии, микробиологии, иммунохимии, иммуногистохимии, иммуноцитохимии, статистической обработки результатов и анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Многие из перечисленных подходов впервые использованы для изучения микроспоридий. В ходе проведения работ накоплен большой опыт по гетерологичной экспрессии паразитических генов

в бактериальных и дрожжевых клетках и иммунолокализации белков микроспоридий в клеточных структурах паразита и хозяина. В ходе работы разработаны оригинальные методики избирательной экстракции белков паразита из очищенных спор, приготовления срезов для иммуноцитохимического анализа, очистки антител на полосках нитроцеллюлозы с иммобилизованным антигеном.

Основные положения, выносимые на защиту.

I. При внутриклеточном развитии микроспоридии выключают собственный энергетический метаболизм, поглощая готовую АТФ клетки хозяина с помощью уникальных белков-переносчиков. Метаболическая система спор микроспоридий представлена набором активных ферментов и необходима для переживания во внешней среде и быстрой активации при заражении нового хозяина.

II. Структурно-функциональными особенностями секреторного аппарата микроспоридий являются: (1) непрерывность тубулярной сети, соединяющей цистерны эндоплазматического ретикулума с цитоплазматической мембраной и формирующей полярной трубкой, (2) отсутствие изолированных транспортных везикул, (3) минимизация набора ферментов, ответственных за гликозилирование мембранных и секретируемых белков.

III. Микроспоридии способны управлять физиологическими процессами насекомого-хозяина с помощью функционально различных белков, секретируемых в зараженную клетку.

IV. Длительная адаптация микроспоридий к внутриклеточному развитию привела к значительным перестройкам аппарата клетки и появлению ряда структурно-функциональных особенностей, не обнаруженных у других эукариотических организмов.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности полученных данных определена статистическим анализом, воспроизводимостью экспериментов и сопоставлением полученных данных с результатами расшифровки геномов многих видов микроспоридий. Материалы диссертации представлены на II и III Всероссийских съездах по защите растений (Санкт-Петербург, 2005, 2013), Всероссийской научной конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина» (Москва, 1998), Международном совещании по криптоспоридиозам и микроспоридиозам, как СПИД-сопровождающим инфекциям (Санкт-Петербург, 2004), I объединенном совещании по микроспоридиям беспозвоночных и позвоночных хозяев (Чехия, Ческе-Будеёвице, 2004), V Европейском протистологическом конгрессе

(Санкт-Петербург, 2007), Международном симпозиуме по функциональной геномике шелковичного червя (Китай, Чунцин, 2009), Международной научной конференции «Инфекционная патология членистоногих» (Санкт-Петербург, 2012), V съезде Паразитологического Общества РАН (Новосибирск, 2013), V межрегиональной конференции «Новые знания о паразитах» (Новосибирск, 2015), 49-х и 61-х Догелевских чтениях (Санкт-Петербург, 2004, 2016).

Публикации. Материалы работы опубликованы автором в виде 26 статей в отечественных и международных реферируемых научных журналах, а также в виде глав в трех международных коллективных монографиях, изданных в США.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 294 страницах машинописного текста, включая 11 таблиц и 56 рисунков. Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка литературы.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своим учителям И.В. Исси, А.А. Добровольскому, В.Д. Домкину за всестороннюю помощь и поддержку в освоении методологии научных исследований. Признателен действующим и бывшим сотрудникам лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР Ю.Я. Соколовой, К.В. Селезневу, М.В. Григорьеву, П.Б. Семенову, Ю.С. Токареву, И.В. Сендерскому, О.А. Павловой, А.М. Наумову, А.Н. Игнатъевой, С.А. Тимофееву, А.А. Цареву за помощь в выполнении экспериментальных работ, анализе полученных результатов и создании творческой атмосферы в научной группе. Отдельная благодарность сотрудникам института молекулярной онкологии (г. Милан, Италия) Г.В. Безнусенко и А.А. Миронову за помощь в изучении ультраструктуры секреторного аппарата и клетки микроспоридий, а также сотрудникам Института клеточной биохимии и генетики (г. Бордо, Франция) Национального центра научных исследований Франции В. Трезеге и Г. Лакину за помощь в поиске и изучении АТФ/АДФ-переносчиков микроспоридий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Описание материалов и методов исследования.

В первой главе диссертации подробно описаны объекты исследования, методы и методические подходы, использованные при проведении экспериментов.

Объекты исследования. Работа выполнена на лабораторных культурах насекомых - двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) и

перелетной саранчи *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). В жировом теле этих видов прямокрылых соответственно развиваются микроспоридии *Paranosema (Nosema, Antonospora) grylli* и *Paranosema locustae*. Лабораторная культура сверчков получена из инсектария ИЭФиБ им. И.М.Сеченова и поддерживается в условиях, сходных с описанными для инсектария этого института (Князев, 1985). Поддержание лабораторной культуры перелетной саранчи, заражение *per os* личинок третьего возраста спорами микроспоридии *P. locustae* проводили согласно методикам Соколовой Ю.Я. и Лэнга К. (Sokolova, Lange, 2002).

Стадии внутриклеточного развития и споры микроспоридий выделяли из жирового тела зараженных насекомых в градиенте плотности Перколла по методу, разработанному Селезевым К.В. (Селезев и др., 1994; Seleznjov et al., 1995). Экструзию спор микроспоридий *P. grylli* стимулировали согласно методу, разработанному Курти и соавторами (Kurtti et al., 1994).

Анализ обменных процессов в клетках паразита и хозяина. Методы приготовления проб и измерения удельных активностей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (глюкозо-6-ФДГ), гексокиназы, фосфоглюкомутазы, фосфоглюкоизомеразы, фосфофруктокиназы, 3-фосфоглицераткиназы, пируваткиназы, глицерол-3-ФДГ, АТФ-азы, трегалазы, фосфорилазы трегалозы (прямая и обратная реакция) описаны в главе 1, а также ряде публикаций (Dolgikh et al., 1997; Dolgikh, 2000; Долгих и др., 2002; Долгих, Семенов, 2003).

Для определения содержания липидов, гликогена, трегалозы, свободной глюкозы, глюкозо-6-фосфата, АТФ, АДФ, пирувата в исследуемых тканях и клетках использовали хроматографические и энзимологические методы (Долгих и др., 2002; Долгих, Семенов, 2003).

Методы, использованные для поиска АТФ/АДФ-переносчиков *P. grylli*. Геномную ДНК микроспоридий выделяли из механически разрушенных спор и очищали с помощью стандартной экстракции фенолом и хлороформом с последующим осаждением в присутствии этанола. С целью Саузерн-гибридизации геномной ДНК *P. grylli* с радиоактивно-мечеными фрагментами генов АТФ/АДФ-переносчиков различных организмов фрагментированную с помощью ферментов рестрикции геномную ДНК разделяли в 1% агарозном геле, переносили на нейлоновую мембрану Hybond-NX (Amersham, США) и гибридизовали с радиоактивно-мечеными фрагментами генов АТФ/АДФ-переносчиков различных организмов. Мечение фрагментов ДНК

радиоактивным ^{32}P осуществлено по общепринятой методике (Feinberg, Vogelstein, 1984).

Аmplификация фрагментов генов АТФ/АДФ-переносчиков *P. grylli* с помощью вырожденных праймеров осуществлена согласно стандартной методике проведения ПЦР. Отличительной особенностью проведения ПЦР в присутствии вырожденных праймеров была низкая температура отжига (42°C).

Для изоляции полноразмерной копии одного из генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики *P. grylli*, 3 мкг геномной ДНК фрагментировали с помощью фермента *Hind*III, разделяли в 1% агарозном геле и вырезали зону геля, соответствующую размеру фрагмента, гибридизующегося с ПЦР-амплифицированным ранее фрагментом гена. ДНК экстрагировали из геля и встраивали в вектор pBluescript II KS+ (Stratagene, США) по сайту *Hind*III. Скрининг полученной библиотеки с помощью ^{32}P - меченого фрагмента гена использовали для идентификации бактериальной колонии, несущей полноразмерную копию гена. Расшифрованная последовательность депонирована в банке генетической информации EMBL (AJ868111).

Компьютерный анализ последовательностей генов *P. locustae*. Последовательности изучаемых генов микроспоридии *P. locustae* взяты с сайта <http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01> проекта по расшифровке генома этого вида (Antonospora locustae Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272) и сайта Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Анализ последовательностей осуществляли с помощью пакета программ для молекулярной биологии DNASTAR® Lasergene 5.05. Наличие сигнального пептида в составе белковых молекул предсказывали с помощью серверов SignalP 4.0, TargetP, SIG-Pred, PrediSi и Signal-3D. Наличие гидрофобных трансмембранных доменов в составе белков оценивали с помощью сервера TMHMM 2.0.

Экспрессия белков *P. locustae* в бактериях *E. coli* и получение антител. Изучаемые гены *P. locustae* амплифицировали с помощью ПЦР с использованием геномной ДНК в качестве матрицы и встраивали в вектор pRSET (Thermo Fisher Scientific, США). Стратегия создания конструкций для экспрессии каждого гена подробно изложена в главах 3 и 5 при описании результатов исследований. Полученные конструкции проверяли с помощью секвенирования. Экспрессию осуществляли в С41 и С43 штаммах *E. coli* (Miroux, Walker, 1996). Бактерий, трансформированных полученными конструкциями, растили в жидкой среде LB, содержащей ампицилин, в

течение ночи при 37°C без добавления или с добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозиды в качестве индуктора экспрессии. Рекомбинантные белки, накапливающиеся в бактериях в виде нерастворимых белковых включений, тщательно отмывали и экстрагировали в присутствии 8М мочевины или 2% додецилсульфата натрия (ДСН) и 5% 2-меркаптоэтанола. Белки, накапливающиеся в цитоплазме *E. coli* в растворимой форме, выделяли на Ni-содержащей смоле с помощью металло-хелатной аффинной хроматографии.

Полученные рекомбинантные продукты использовали для иммунизации кроликов и мышей. Для очистки специфичных антител рекомбинантные белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Полосу мембраны с перенесенным белком вырезали и инкубировали в присутствии соответствующей иммунной сыворотки с последующей элюцией специфичных антител.

Экспрессия белков *P. locustae* в дрожжевых грибах *Pichia pastoris*. ПЦР-амплифицированные копии генов встраивали в вектор pPIC 3.5 (Thermo Fisher Scientific, США) и переносили в клетки *P. pastoris* (штамм GS115) с помощью электропорации. ПЦР-положительные колонии трансформантов инкубировали 2 дня на среде VMGY, содержащей глицерин в качестве источника углерода, и переносили в среду VMMY, в которой глицерин был заменен на метанол - специфичный индуктор промотора AOX, контролирующего экспрессию встроенных генов. После 2 дней инкубации уровень накопления белков *P. locustae* в клетках и культуральной среде оценивали с помощью иммуноблоттинга.

ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинг. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГЭ) проводили согласно методу Лэммли (Laemmli, 1970) с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США). Гели окрашивали красителем Кумасси R-250. Для иммуноблоттинга разделенные в геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot®. Процедура иммуноблоттинга подробно описана в диссертации и публикациях (Bezoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2009).

Иммунофлюоресцентная и иммуноэлектронная микроскопия. Для иммунолокализации белков в зараженных клетках хозяина жировое тело зараженной саранчи фиксировали в 4% параформальдегиде, отмывали, инкубировали в присутствии 30% сахарозы, замораживали в жидком азоте и изготовленные на криотоме MicromHM 520 криосрезы толщиной 10 мкм

помещали на предметное стекло. Препараты обрабатывали полученными в работе антителами, а затем антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями AlexaFluor 546 и AlexaFluor 488 (Invitrogen, США). Анализ флюоресценции осуществляли с использованием микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия).

Методика изготовления ультратонких криосрезов зараженных клеток хозяина и спор микроспоридий, окраска специфичными антителами и анализ с помощью электронной микроскопии подробно описаны в диссертации и публикациях (Bezoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2009).

Ультраструктурный анализ секреторного аппарата микроспоридий. Процедуры обработки клеток паразита и хозяина тетрафлюоридом алюминия (AlF_4) и N-этилмалеимидом (NEM), фиксации, осмирования и заключения в смолу образцов для электронной микроскопии приведены в главах 1 и 4 настоящей диссертации. Метод ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением (McIntosh, 2001) любезно выполнен проф. Мироновым А. А. Полученный материал использовали для получения ультратонких 60 нм срезов на ультрамикротоме Reichert 2E (Reichert Jung, Германия) и анализировали с помощью электронного микроскопа Tecnai 20 (FEI/Philips Electron Optics, Нидерланды), как это описано в главе 1 диссертации. Метод электронной томографии 150-200 нм серийных срезов также подробно описан в главе 1 настоящей диссертации.

Анализ особенностей гликозилирования белков микроспоридий. Окраску гелей на гликопротеины после разделения белков методом ДСН-ПААГЭ проводили с помощью периодата и реагента Шиффа (Гааль и др., 1982). Инкубацию белков микроспоридии *P. grylli* и жирового тела сверчков с лектином WGA, конъюгированным с пероксидазой хрена, осуществляли согласно протоколу для иммуноблоттинга, добавляя лектин вместо антител.

Процедуры обработки белков спор *P. grylli* N-гликозидазой F и их связывания с лектином GNA подробно описаны в главе 1 диссертации.

Анализ экспрессии генов микроспоридий. РНК выделяли из спор и стадий внутриклеточного развития микроспоридий реагентом PureZOL (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы и использовали для постановки ПЦР, добавляя в каждую пробирку количество матрицы, синтезированное на 200 нг суммарной РНК. В качестве контроля за примесью в пробах геномной ДНК использовали смесь для синтеза кДНК без добавления ОТ. Подробная

процедура ОТ-ПЦР приведена в диссертации и одной из публикаций (Долгих и др., 2010).

Глава 2. Особенности энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии.

В первой части главы приведены накопленные к началу исследования данные об особенностях развития микроспоридий в организме насекомых и их влиянии на физиологические и биохимические процессы хозяина. Обобщение литературных данных позволило предположить, что развитие микроспоридий во многом зависит от обменных процессов хозяина. Однако глубина этой зависимости и молекулярные механизмы, позволяющие паразитам эффективно эксплуатировать метаболическую систему зараженной клетки, оставались неизвестными. Наиболее интересным и важным представлялся вопрос о том, обладают ли микроспоридии способностью поглощать АТФ непосредственно из цитоплазмы зараженной клетки, паразитируя тем самым на ее энергетической системе. На первом этапе исследования проведен сравнительный анализ активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах и стадиях внутриклеточного развития микроспоридии *P. grylli*, а также анализ влияния заражения на содержание резервных веществ, субстратов и интермедиатов энергетического обмена хозяина.

Биохимический анализ особенностей взаимодействия микроспоридий с энергетической системой зараженной клетки хозяина. В проведенном исследовании получен ряд данных, косвенно свидетельствующих об использовании микроспоридиями АТФ клетки хозяина (Weidner et al., 1999; Dolgikh, 2000; Долгих и др., 2002). Во-первых, показана значительно более низкая активность ферментов гликолиза в активно пролиферирующих меронтах и споронтах *P. grylli* чем в покоящихся спорах (Таблица 1). Во-вторых, установлено, что в зараженном жировом теле сверчков наблюдается приблизительно одинаковое снижение содержания основных энергетических резервов - гликогена и триглицеридов, сопровождающееся увеличением в 4 раза концентрации АТФ (Рисунок 1, Таблица 2).

Поскольку лишенные митохондрий микроспоридии не могут использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата, полученные данные позволили предположить, что они эксплуатируют энергетическую систему хозяина, поглощая экзогенную АТФ с помощью

Таблица 1

Сравнение активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах и стадиях внутриклеточного развития *Paranosema grylli*.

Фермент	Споры	Меронты и споронты
Глюкозо-6-ФДГ	$15 \pm 1^a (7)^b$	$7 \pm 1 (8)$
Фосфоглюкомутаза	$7 \pm 1 (7)$	– (4)
Гексокиназа*	– (8)	– (5)
Фосфогюкоизомераза*	$1549 \pm 255 (5)$	$23 \pm 2 (9)$
Фосфофруктокиназа*	$10 \pm 1 (4)$	– (5)
Фосфоглицераткиназа*	$16 \pm 4 (4)$	$8 \pm 1 (9)$
Пируваткиназа*	$6 \pm 1 (6)$	$2 \pm 0,3 (5)$
Глицерол-3-ФДГ	$16 \pm 2 (7)$	$17 \pm 3 (5)$
АТФ-аза	$7 \pm 1 (3)$	$17 \pm 4 (4)$

^a - удельная активность выражена в нмоль превращаемого субстрата /мин / мг белка;

^b - значения в скобках показывают число независимо проведенных процедур очистки;

– - активность ниже границы чувствительности метода тестирования (<0.2 нмоль / мин / мг белка);

* - звездочкой отмечены ферменты гликолиза.

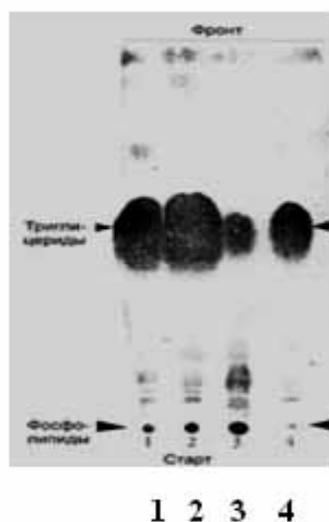


Рисунок 1. Разделение липидов жирового тела сверчков *G. bimaculatus* методом тонкослойной хроматографии. Крупные пятна соответствуют фракции триглицеридов. 1, 2 - незараженное жировое тело; 3 - жировое тело сверчка, зараженное микроспоридией *P. grylli*; 4 - стандарт.

переносчиков, сходных с обнаруженными у внутриклеточных бактерий родов *Chlamydia* и *Rickettsia* (Weidner et al., 1999). В 2001 году были опубликованы результаты расшифровки первого генома микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka et al., 2001), подтвердившие присутствие в геноме паразита четырех генов переносчиков, сходных с АТФ/АДФ-транспортёрами пластид и внутриклеточных паразитических бактерий.

Таблица 2

Сравнение содержания гликогена, общих липидов и промежуточных соединений энергетического обмена в жировом теле контрольных и зараженных микроспорицией *Paranosema grylli* двупятнистых сверчков.

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95% уровень достоверности различий
Гликоген ¹	88 ± 17 (17) ^a	30 ± 8 (14)	+
Общие липиды ²	247 ± 30 (10)	114 ± 10 (5)	+
Глюкоза ³	152 ± 69 (7)	187 ± 45 (7)	–
Глюкозо-6-Ф	16 ± 6 (10)	35 ± 6 (10)	–
Пируват	не обнаружен	не обнаружен	
АТФ	7 ± 1 (10)	30 ± 6 (10)	+
АДФ	21 ± 6 (8)	26 ± 6 (11)	–
АТФ/АДФ	0,3 ± 0,1 (9) ^б	1,2 ± 0,3 (9)	+

¹- содержание гликогена выражено в нм глюкозы/мг сырого веса ткани;

²- содержание общих липидов выражено в мкг липидного экстракта/мг сырого веса ткани;

³- содержание субстратов энергетического обмена выражено в нмоль/мг белка в гомогенате жирового тела после осаждения паразитов;

^a – значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков;

^б – среднее соотношений концентраций АТФ/АДФ, вычисленных для каждой отдельно проанализированной особи.

АТФ/АДФ-транслоказы пластидно-бактериального типа как инструмент паразитирования микроспоридий на энергетической системе хозяина. Для ответа на вопрос, является ли присутствие АТФ/АДФ-переносчиков универсальным свойством микроспоридий в работе был предпринят поиск гомологичных генов у филогенетически удаленного от *E. cuniculi* вида *P. grylli*. На первом этапе была проведена гибридизация геномной ДНК *P. grylli* с мечеными копиями генов, кодирующих два переносчика бактерии *Chlamydia trachomatis*, два переносчика из пластид *Arabidopsis thaliana* и четыре переносчика микроспоридии *E. cuniculi*. Несмотря на мягкие условия гибридизации и отмывки, специфичного распознавания последовательностей в геноме *P. grylli* не произошло. Поставленную задачу удалось решить с использованием вырожденных праймеров к наиболее консервативным участкам в молекуле переносчиков (Dolgikh et al., 2004; Долгих и др., 2011). Использование двух сочетаний вырожденных праймеров (Рисунок 2) позволило амплифицировать сложную смесь фрагментов, клонировать фрагменты двух генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики *P. grylli*, выделить полноразмерную копию одного из них, депонированную в 2004 году в GenBank, под номером AJ868111, и показать приблизительно одинаковый уровень его экспрессии в стадиях внутриклеточного развития и спорах.

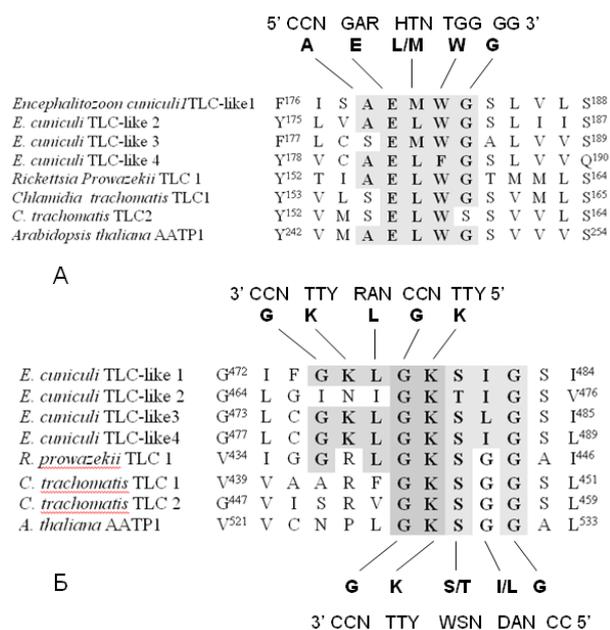


Рисунок 2. Консервативные участки в аминокислотной последовательности известных пластидно-бактериальных переносчиков, использованных для подбора прямого (А) и двух обратных (Б) вырожденных праймеров. N-сочетание четырех нуклеотидов, R- G или A, H-A или C или T, Y -T или C, W- A или T, S-G или C, D-A или G или T.

Впоследствии наши данные о присутствии АТФ/АДФ-переносчиков в различных группах микроспоридий были подтверждены в ходе расшифровки геномов паразитов, относящихся к разным филогенетическим кладам.

Выключение метаболического аппарата микроспоридий при внутриклеточном развитии. С целью проверки гипотезы о том, что паразиты выключают свой метаболизм при внутриклеточном развитии и полностью полагаются на обменные процессы зараженной клетки, мы использовали постгеномные технологии для сравнительного анализа содержания метаболических ферментов и белков «домашнего хозяйства» в стадиях внутриклеточного развития и спорах микроспоридии *P. locustae* - паразита перелетной саранчи *L. migratoria* (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011; Долгих и др., 2011; Williams et al., 2014).

ПЦР-амплификация десяти генов *P. locustae*, их гетерологичная экспрессия в бактериях *E. coli* позволили наработать соответствующие рекомбинантные продукты, получить к ним поликлональные антитела и сравнить содержание белков в спорах и стадиях внутриклеточного развития микроспоридий с помощью иммуноблоттинга. Эксперимент показал специфичное накопление пяти ферментов углеводного и энергетического метаболизма (фосфофруктокиназа, митохондриальная глицерол-3-ФДГ,

альтернативная оксидаза, альфа и бета субъединицы фермента Е1 пируватДГ) в зрелых спорах, но не в мерогональных и спорогональных стадиях внутриклеточного развития микроспоридий (Рисунок 3).

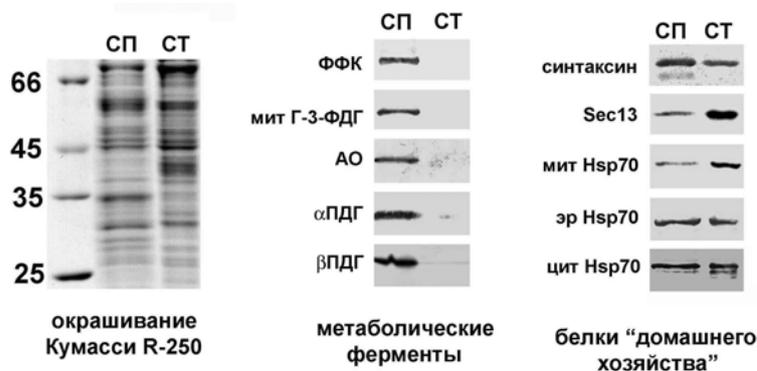


Рисунок 3. Иммуноблоттинг белков *P. locustae* с антителами к белкам, экспрессированным в бактериях. Осветленный гомогенат спор (СП) и стадии внутриклеточного развития, выделенные в градиенте плотности Перколл (СТ), выровненные по концентрации белка нанесены на гель. **ФФК** - фосфофруктокиназа, **мит Г-3-ФДГ** - митохондриальная глицерол-3-ФДГ, **АО** - альтернативная оксидаза, **αПДГ** и **βПДГ** - две субъединицы фермента Е1 пируватдегидрогеназы, **синтаксин** - SNARE-белок, **Sec13** - субъединица комплекса COPII, **Hsp70** - митохондриальная, ЭР-специфичная и цитоплазматическая формы шаперонов семейства Hsp70.

В тех же самых пробах спор и стадий внутриклеточного развития паразитов наблюдалось приблизительно одинаковое содержание таких компонентов «домашнего хозяйства» как молекулярные шапероны семейства Hsp70 и белки, вовлеченные в процессы внутриклеточного транспорта (SNARE-белок синтаксин и Sec13 субъединица комплекса COPII). Полученный результат неоспоримо доказывал глубокую метаболическую зависимость микроспоридий от обменных процессов хозяина. Удивительная минимизация функционального аппарата клетки микроспоридий, выявленная при расшифровке их геномов, оказалась еще более выраженной на стадии внутриклеточного развития. Оказалось, что меронты и споронты микроспоридий не только в значительной степени полагаются на метаболическую систему зараженной клетки, но и полностью выключают свой энергетический обмен при внутриклеточном развитии.

На основании полученных результатов можно было заключить, что дальнейшие исследования собственного метаболического аппарата микроспоридий целесообразно осуществлять на зрелых спорах, но не на вегетативных деспоровых стадиях. Следующая глава посвящена описанию

результатов исследования особенностей энергетического и углеводного метаболизма в спорах микроспоридий на примере энтомопатогенных паразитов рода *Paranosema*.

Глава 3. Особенности энергетического и углеводного обмена в спорах микроспоридий.

В первом разделе главы приведены немногочисленные данные о метаболизме микроспоридий, накопленные к началу данного исследования. В связи с отсутствием в то время методик выделения внутриклеточных стадий этих паразитов, все исследования выполнялись исключительно на спорах, и данный обзор можно охарактеризовать как обобщение данных о метаболических особенностях спор микроспоридий. Особое внимание в этом разделе уделено описанию результатов изучения активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах *P. grylli*, выполненное нами при подготовке кандидатской диссертации (Долгих и др., 1996; Dolgikh et al., 1997) и результаты первой расшифровки генома микроспоридии *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001). Они позволили наметить наиболее актуальные направления исследования биохимии спор, связанные, прежде всего, с обнаружением в геноме этих амитохондриальных паразитов целого ряда митохондриальных белков, включая метаболические ферменты. Однако в первую очередь требовалось доказать, что именно дисахарид трегалоза выполняет функцию энергетического резерва в спорах паразитов.

Роль трегалозы в физиологии спор микроспоридий *P. grylli*. Высокое содержание трегалозы и отсутствие резервных полисахаридов в спорах микроспоридий уже давно позволили предположить, что этот дисахарид и служит основным энергетическим резервом спор (Vandermeer, Gochnauer, 1971). Однако позднее были получены данные о резком снижении содержания внутриспоровой трегалозы и значительном увеличении концентрации глюкозы при выбросе полярных трубок микроспоридии *Anncaliia algerae* (Undeen et al., 1987; Undeen, 1990). Это позволило предположить, что основное назначение дисахарида, запасаемого в спорах, связано с необходимостью повышения осмотического давления внутри споры, служащего движущей силой процесса экструзии.

В данном исследовании мы показали, что в спорах *P. grylli* процесс экструзии полярных трубок не сопровождается изменением содержания трегалозы и образованием свободной глюкозы. Постепенное снижение содержания трегалозы наблюдается только при длительном хранении спор

(Долгих, Семенов, 2003). При этом в спорах обнаруживается крайне невысокая, но достоверная активность фермента трегалазы, гидролизующей дисахарид с образованием двух молекул глюкозы. Отсутствие гидролиза трегалозы в спорах *P. grylli* в ходе экструзии полярных трубок при наличии активной трегалазы позволило заключить, что основная функция фермента *P. grylli* связана не с быстрым созданием осмотического давления, а с медленным расходом внутриспоровых энергетических запасов в ходе длительного переживания спор во внешней среде.

Следующий этап в изучении метаболических особенностей спор был связан с обнаружением в клетках микроспоридий митосом - сильно редуцированных митохондрий. Исследования, выполненные нашей группой и зарубежными коллегами, позволили оценить вклад этих уникальных органелл в метаболизм микроспоридий.

Участие митосом в энергетическом обмене спор. Обнаруженные зарубежными коллегами в 2002 году в клетках микроспоридий митосомы (Williams et al., 2002), представляют собой небольшие (от 50 до 200 нм), окруженные двойной мембраной органеллы, распознаваемые антителами против митохондриального шаперона Hsp70. Более позднее обнаружение генов альтернативной оксидазы (АО) у микроспоридий из двух филогенетических клад (Williams et al., 2010) позволило предположить, что митосомы могут участвовать в энергетическом обмене спор. Доказательством наличия альтернативной дыхательной цепи в митосомах микроспоридий мог бы послужить факт колокализации АО и митохондриальной глицерол-3-ФДГ на внутренней мембране этих органелл.

Иммуномечение ультратонких криосрезов спор *P. locustae* анти-митHsp70 антителами позволило впервые обнаружить митосомы в спорах микроспоридий (Рисунок 4). Двойное мечение криосрезов спор антителами к АО и митHsp70 или к митГ-3-ФДГ и митHsp70 показало ко-локализацию обоих компонентов альтернативной дыхательной цепи с митосомальным маркером. Как и предполагалось, АО и митГ-3-ФДГ локализовались на внутренней мембране митосом, повторяя контуры органелл. Данный результат впервые продемонстрировал, что митосомы *P. locustae* сохраняют альтернативную электрон-транспортную цепь в своей внутренней мембране, играя важную роль в энергетическом обмене паразитов (Dolgikh et al., 2011, Долгих и др., 2011). Это позволило составить окончательную схему энергетического метаболизма, обеспечивающую положительный выход АТФ

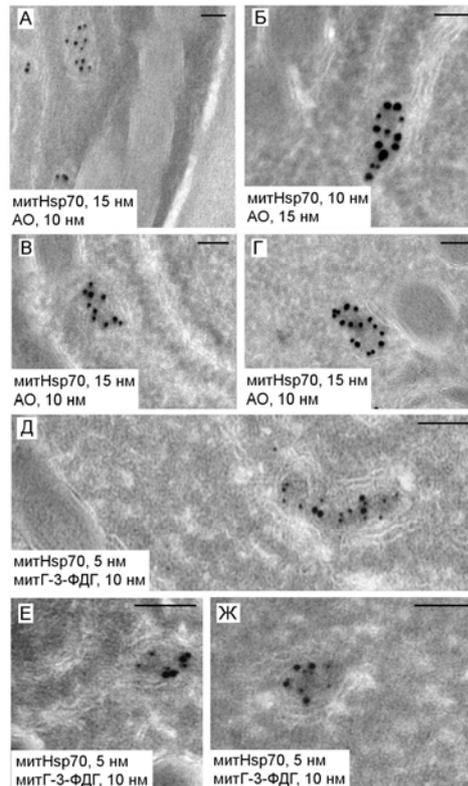


Рисунок 4. Иммунолокализация АО и митГ-3-ФДГ в митосомах *P. locustae*. А-Г. Двойное мечение криосрезов спор антителами против АО и митHsp70 показало колокализацию обоих белков в этих органеллах. Д-Ж. Иммуноэлектронная микроскопия криосрезов спор с анти-митГ-3-ФДГ и анти-митHsp70 антителами также показала сходную колокализацию обоих белков в митосомах *P. locustae*. Размер шкалы, 0,1 мкм.

в спорах микроспоридий, располагающих геном АО (Рисунок 5).

Пируватдегидрогеназа микроспоридий и предполагаемая роль пирувата в спорах. Представленная на рисунке 5 схема энергетического обмена в спорах *P. locustae* предполагает, что все образующиеся в ходе гликолиза триозы превращаются в пируват. Единственным ферментом, обнаруженным в геномах микроспоридий и способным метаболизировать накапливающийся в ходе гликолиза пируват, оказался компонент E1 пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ) (Katinka et al., 2001; Fast, Keeling, 2001). О важной роли фермента в физиологии микроспоридий свидетельствовало: (1) присутствие генов у всех изученных микроспоридий, (2) наличие мРНК обеих (альфа и бета) субъединиц ПДГ в спорах *P. locustae* (Williams, Keeling, 2005); (3) высокое содержание обоих белков в спорах *P. locustae* (Рисунок 3).

В данной работе показано присутствие пируват-метаболизирующей активности в растворимой фракции гомогената спор двух видов

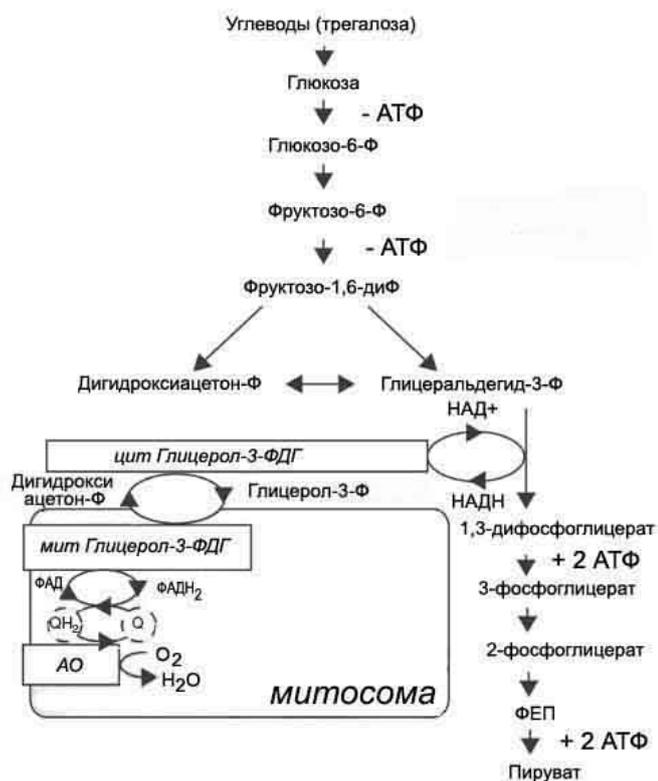


Рисунок 5. Схема энергетического метаболизма в спорах *P. locustae*. Перенос электронов от НАДН на кислород при участии альтернативной дыхательной цепи обеспечивает положительный выход 2 молекул АТФ на каждую катаболизируемую молекулу глюкозы.

микроспоридий и осуществлена иммунолокализация ПДГ в цитоплазме спор *P. locustae* (Рисунок 6). Иммунопреципитация ПДГ показала, что альфа и бета субъединицы ПДГ *P. locustae* действительно образуют единый олигомерный комплекс. На заключительном этапе исследования с помощью иммуноаффинной хроматографии нам удалось выделить ПДГ в гомогенном состоянии и показать отсутствие каких-либо дополнительных субъединиц в составе фермента (Рисунок 7). Таким образом, мы получили прямые доказательства эволюционной релокализации митохондриального фермента ПДГ *P. locustae* в цитоплазму спор паразита, а также показали, что в его состав входят только две субъединицы (Dolgikh et al., 2011; Долгих и др. 2011; Williams et al., 2014). Это позволило предположить, что основная роль ПДГ в цитоплазме спор связана с образованием уксусной кислоты, необходимой для биосинтеза ацетил-КоА при участии фермента ацетил-КоА синтетазы, обнаруженного в геномах различных видов микроспоридий. Специфичное накопление ПДГ в зрелых спорах позволяет предположить, что ацетил-КоА

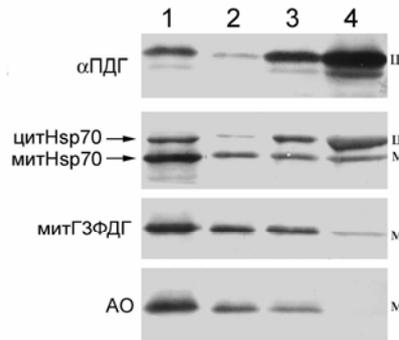


Рисунок 6. Различное распределение ПДГ и митосомальных белков после центрифугирования гомогената спор микроспоридии *P. locustae*. Осветленный гомогенат спор последовательно центрифугировали при различных скоростях, осадки ресуспендировали до объема конечного супернатанта и пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга. 1 - осадок после центрифугирования гомогената при 14000 g 20 мин; 2 и 3 - нижний и верхний слои осадка после дальнейшего ультрацентрифугирования гомогената при 200 000 g в течение часа; 4 - итоговый супернатант. Ц и М - белки цитоплазмы и митосом.

играет важную роль в их активации, например, посредством ацетилирования гистонов при запуске транскрипционной активности хроматина.

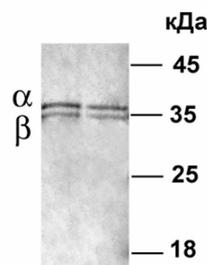


Рисунок 7. Анализ ПДГ микроспоридии *P. locustae*, выделенной с помощью иммуно-аффинной хроматографии. Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ и окрашивали Кумасси R-250.

Глава 4. Морфо-функциональные особенности секреторного аппарата микроспоридий.

Секреторный аппарат, как и метаболическая система, играет очень важную роль в развитии микроспоридий. Он обеспечивает доставку разнообразных переносчиков к цитоплазматической мембране, обеспечивает секрецию белков паразита в зараженную клетку, участвует в формировании сложной споры. В этой главе диссертации представлены результаты изучения системы внутриклеточного транспорта и секреции у энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema*.

Ультраструктурный анализ комплекса Гольджи микроспоридий. Электронно-микроскопический анализ микроспоридии *P. grylli* на стадии меронта обнаружил присутствие в клетках Гольджи-подобных кластеров мембран размером 300-700 нм, состоящих из продолговатых структур диаметром 30-50 нм, часто соединенных с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), плазматической мембраной (ПМ) и между собой тонкими (25-35 нм) тубулами (Рисунок 8). При формировании споронта диаметр Гольджи-подобных кластеров возрастал до 800-900 нм, а их связь с ПМ и ЭР просматривалась более четко. В споробластах, приступивших к построению полярной трубки, наблюдалось наличие единого, крупного, хорошо развитого комплекса Гольджи, соединенного тубулами с формирующейся полярной трубкой (Veznoussenko et al., 2007).

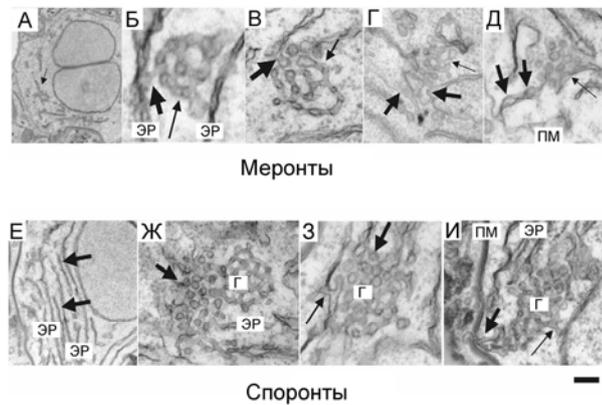


Рисунок 8. Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры Гольджи-подобных структур в клетках микроспоридии *P. grylli*. А-Д. В меронтах присутствуют кластеры продолговатых и округлых мембранных структур размером около 300-700-нм (тонкие стрелки), соединенные с ЭР (Б, В, толстые стрелки) и ПМ (Г, Д, толстые стрелки). Е-И. В споронтах возрастает количество цистерн ЭР (Е, толстые стрелки) и размер кластеров (Ж-И). При этом в комплексе Гольджи споронтов преобладает более «везикулярная» часть, представленная скоплением округлых структур диаметром до 70 нм (Ж, З, толстые стрелки) и также часто соединенная с ЭР (З, И, тонкие стрелки) и ПМ (И, толстая стрелка). ЭР - эндоплазматический ретикулум, ПМ - цитоплазматическая мембрана, Г - комплекс Гольджи. Размер линейки 1400 нм (А); 130 нм (Б); 160 нм (В); 270 нм ((Г, Ж, И); 1000 нм (Е); 200 нм (Д, З).

Анализ трехмерной структуры секреторного аппарата *P. grylli* с помощью электронно-микроскопической томографии и реконструкции трехмерной структуры кластеров показал отсутствие изолированных везикул на всех стадиях внутриклеточного развития паразитов (Рисунки 9, 10).

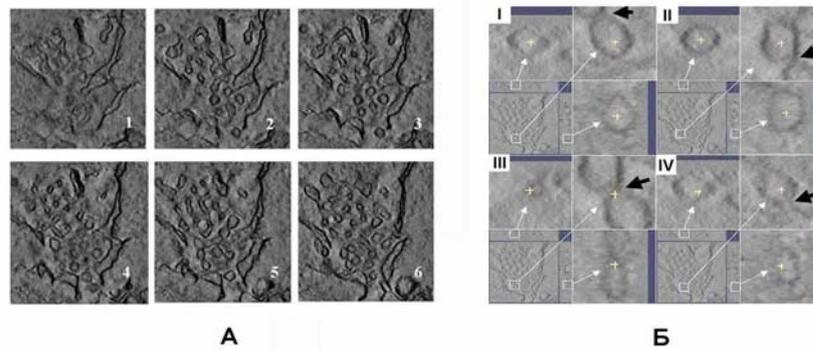
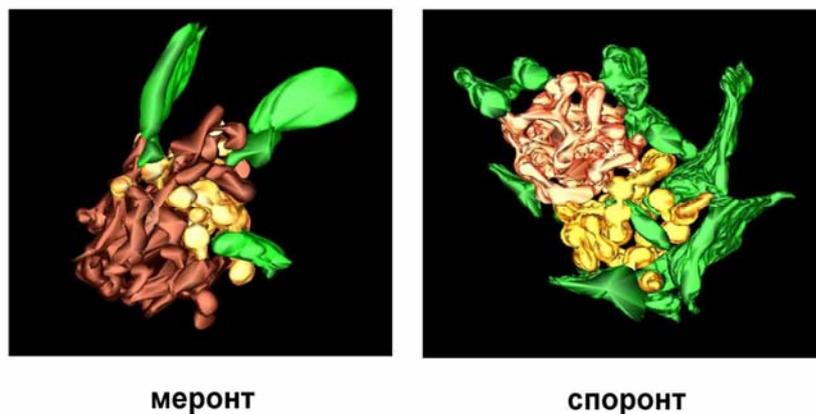


Рисунок 9. Электронная томография Гольджи-подобных структур микроспоридии *P. grylli*. А. Сопоставление серийных виртуальных срезов отдельных кластеров показало, что все мембранные структуры Гольджи микроспоридий связаны в единую непрерывную сеть. Б. Анализ трех перпендикулярных проекций для десяти отдельных округлых структур подтвердил, что все они пространственно соединены между собой тонкими тубулами в единую сеть.



меронт

споронт

Рисунок 10. Трехмерная реконструкция тубулярных кластеров *P. grylli*. Проведенный анализ позволил обнаружить в окруженных цистернами ЭР (зеленый цвет) кластерах тубулярную (коричневый цвет) и варикозную (желтый цвет) части комплекса Гольджи. Все мембранные структуры оказались соединенными в единую непрерывную сеть с помощью тонких тубул. Изолированные везикулы отсутствовали в изучаемых структурах.

Использование (1) метода ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением (McIntosh, 2001), (2) ингибирование процессов SNARE-зависимого слияния мембран в присутствии N-этилмалеимида (Mironov et al., 2001; Kweon et al., 2004), (3) ингибирование процессов “раздевания” (снятия белковой оболочки) COPI-зависимых везикул с помощью тетрафлюорида алюминия (AlF₄) (Cole et al., 1996) также не

позволили обнаружить изолированные везикулы в клетках микроспоридий (Dolgikh et al., 2005b; Veznoussenko et al., 2007).

Анализ роли тубулярных кластеров во внутриклеточном транспорте и гликозилировании структурных белков спор *P. grylli*. С целью показать, что структурные белки спор микроспоридий действительно транспортируются к формируемым структурам с участием тубулярной сети, были разработаны оригинальные схемы избирательного выделения основного белка оболочки спор и трех белков полярной трубки микроспоридии *P. grylli* (Dolgikh, Semtnov, 2003; Dolgikh et al., 2005a). Получение антител к выделенным белкам позволило осуществить их иммунолокализацию в оболочке спор паразита (экзоспоре), полярной трубке и Гольджи-подобной тубулярной сети (Dolgikh et al., 2005a; Veznoussenko et al., 2007), пространственно соединенной с формируемыми структурами паразита (Рисунок 11).

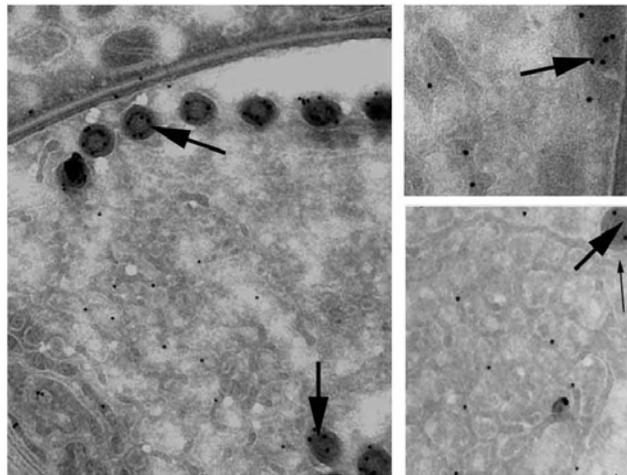


Рисунок 11. Иммуноэлектронная микроскопия Гольджи-подобных структур *P. grylli* с помощью антител к основному белку полярной трубки показала участие тубулярных кластеров во внутриклеточном транспорте белка к формируемой полярной трубке (указана стрелками).

Анализ особенностей гликозилирования структурных белков спор *P. grylli* показал, что у микроспоридий полностью отсутствуют N-гликозилированные белки (Рисунок 12). При этом было установлено, что паразиты сохраняют способность к O-маннозилированию белков, а основной компонент полярной трубки *P. grylli* является наиболее гликозилированным белком в зараженном жировом теле сверчков (Долгих и др., 2007; Veznoussenko et al., 2007). Сопоставление полученных результатов с данными расшифровки геномов микроспоридий позволило сделать выводы (1) об универсальном характере минимизации аппарата гликозилирования белков этих паразитов, (2) об

участии тубулярных кластеров во внутриклеточном транспорте и гликозилировании структурных белков споры.

Экспрессия генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *P. locustae*. На заключительном этапе исследования секреторного аппарата микроспоридий мы попытались выяснить коррелирует

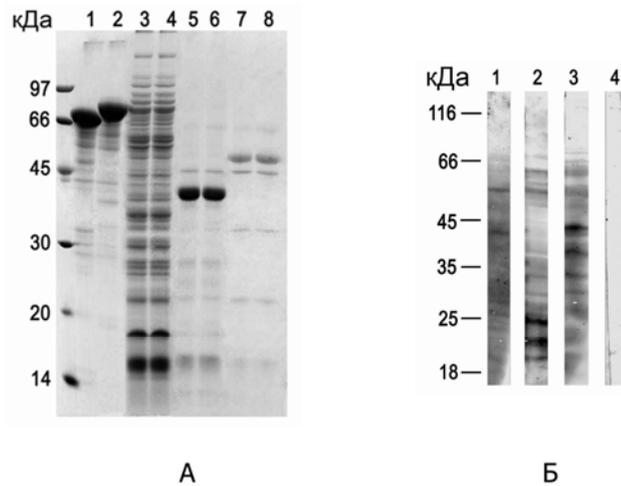


Рисунок. 12. Поиск N-гликозилированных белков в спорах *P. grylli*. А. Обработка ферментом N-гликозидаза F не привела к изменению электрофоретической подвижности внутренних (дорожки 3, 4), поверхностных (дорожки 5, 6) белков спор и белков полярной трубки (дорожки 7, 8). В качестве положительного контроля использовали трансферрин человека (1, 2). Дорожки 1, 3, 5, 7 - обработанные ферментом пробы; дорожки 2, 4, 6, 8 - контроль; ДСН-ПААГЭ, окраска Кумасси R-250. Б. Гибридизация белков жирового тела сверчка и спор *P. grylli* с конъюгатом пероксидазы хрена и лектина WGA, распознающего остатки N-ацетил-D-глюкозамина, специфичного для N-гликозилированных белков соединения. Дорожки: 1, 2 - белки хозяина (жирового тела сверчка), окрашенные Понсо или инкубированные с WGA-пероксидазой после переноса на нитроцеллюлозу; 3, 4 - аналогично проанализированные белки спор паразита.

ли отсутствие у микроспоридий COP-зависимых везикул с отсутствием или низким уровнем экспрессии генов, вовлеченных в их формирование и последующее слияние с мембранными компартментами (Долгих и др., 2010).

Анализ содержания мРНК 6 генов *P. locustae*, вовлеченных в везикулярный транспорт (β и β' -субъединиц коатомерного комплекса COPI, Sec13 и Sec31- субъединиц комплекса COPII, синтаксин-подобного белка и SNARE- белка синаптобrevина), методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показал достаточно высокий уровень их экспрессии (Рисунок 13). Он

оказался соизмерим с уровнем экспрессии гена альтернативной оксидазы - фермента, участвующего в энергетическом обмене паразита. Наряду с высоким уровнем экспрессии генов везикулярного транспорта в клетках микроспоридий, было показано накопление белков Sec13 и синтаксина в

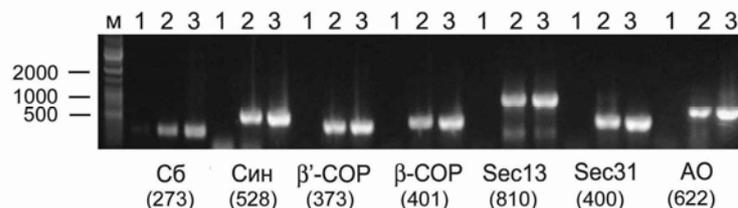


Рисунок 13. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих COP- и SNARE-белки, а также альтернативную оксидазу в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae* с помощью ОТ-ПЦР. *Сб* - синаптобrevин, *Син* - синтаксин-подобный белок, *β'-COP* и *β-COP* - субъединицы комплекса COPI, *Sec13* и *Sec31*-субъединицы COPII, *АО* - альтернативная оксидаза. В скобках указан ожидаемый размер ПЦР-амплифицируемых фрагментов в п. н. 1 - отрицательный контроль (обратная транскриптаза (ОТ) не добавлена в смесь для синтеза кДНК), 2 - опыт (кДНК синтезирована в присутствии ОТ), 3 - положительный контроль (амплификация с использованием геномной ДНК в качестве матрицы), *М*-маркеры молекулярного веса (п. н.).

мембранах клеток и спор *P. locustae* с помощью полученных ранее (глава 2) антител.

Непрерывность секреторного пути микроспоридий и отсутствие транспортных везикул в клетках паразитов (Beznoussenko et al., 2007) были позднее подтверждены американскими коллегами в ходе трехмерной томографической реконструкции комплекса Гольджи спороплазм микроспоридии *Anncaliia algerae* (Takvorian et al. 2013). Это свидетельствует об универсальности авезикулярной структуры секреторного пути этих паразитов. При этом относительно высокая транскрипционная активность генов, вовлеченных в формирование и слияние транспортных везикул в клетках *P. locustae*, а также накопление в клетках паразита белков Sec13 и синтаксина хорошо согласуются с фактом присутствия генов везикулярного транспорта во всех расшифрованных к настоящему времени геномах микроспоридий. Важная роль этих белков в физиологии микроспоридий поднимает вопрос об их предполагаемой функции в авезикулярных клетках паразита. В работе также обсуждаются вопросы о том, представляет ли пример

авезикулярного транспорта, обнаруженный в клетках микроспоридий, уникальное явление, связан ли он с минимизацией паразитической клетки при переходе к внутриклеточному паразитизму и наблюдается ли подобная ситуация у других организмов.

Глава 5. Роль секретируемых белков микроспоридий в управлении зараженной клеткой хозяина.

Состояние изученности проблемы к началу исследований. Белки, секретируемые внутриклеточными паразитами из двух систематических групп простейших - тип Apicomplexa и класс Kinetoplastida, представляют собой эффективный инструмент воздействия патогена на зараженную клетку хозяина. В связи с неизученностью этого вопроса у микроспоридий в начале главы представлены данные, косвенно свидетельствующие о способности этих паразитов управлять молекулярно-генетическими программами и физиологическими процессами зараженной клетки хозяина.

Для проверки такой возможности в качестве объектов исследования были выбраны белки *P. locustae*, потенциально способные воздействовать на зараженную клетку хозяина: (1) гидролитический фермент, относящийся к семейству α/β -гидролаз; (2) фермент гексокиназа; (3) два представителя мультигенных семейств, кодирующих белки с обогащенными лейцином повторами. ПЦР-амплификация кодирующих последовательностей, их гетерологичная экспрессия, получение антител к рекомбинантным полипептидам и иммунолокализация позволили подтвердить предположение о секреции микроспоридиями в цитоплазму зараженной клетки хозяина белков, относящихся к различным функциональным категориям.

Роль α/β -гидролазы *P. locustae* во взаимоотношениях с зараженной клеткой хозяина. Анализ гена α/β -гидролазы *P. locustae* с помощью сервера TargetP показал наличие в составе молекулы N-концевого сигнального пептида (СП) протяженностью 18 аминокислот остатков, ответственного за ее секрецию. В составе фермента также обнаружены от 3 до 8 копий C-концевых повторов VPENPLVSTLSVP(E/D)DLP(A/T)STQH, обогащенных остатками пролина (подчеркнуты). Наличие таких повторов предполагает функциональное сходство гидролазы микроспоридий с липазами млекопитающих, активируемыми солями желчных кислот (Wang, Hartsuck, 1993). Поскольку истощение жировых запасов в клетках насекомых под действием микроспоридий хорошо известно (Canning, 1962; Darwish et al., 1989), наиболее вероятная функция секретируемого фермента может быть

связана с мобилизацией запасных липидов хозяина при внутриклеточном развитии паразитов.

Получение антител к гидролазе *P. locustae*, экспрессированной в *E. coli*, иммуноблоттинг, иммунофлюоресцентная и иммуноэлектронная микроскопия позволили подтвердить секрецию значительных количеств фермента в цитоплазму зараженной клетки (Senderskiy et al., 2014), а также показать ассоциацию выделяемого паразитом белка с митохондриями и другими мембранными структурами зараженной клетки хозяина (Рисунок 14). Поскольку жирные кислоты, высвобождаемые в ходе мобилизации триацилглицеридов, расщепляются по механизму β -окисления именно в матриксе митохондрий, пространственная связь липолитического фермента паразита с митохондриями клетки хозяина может иметь важный физиологический смысл.

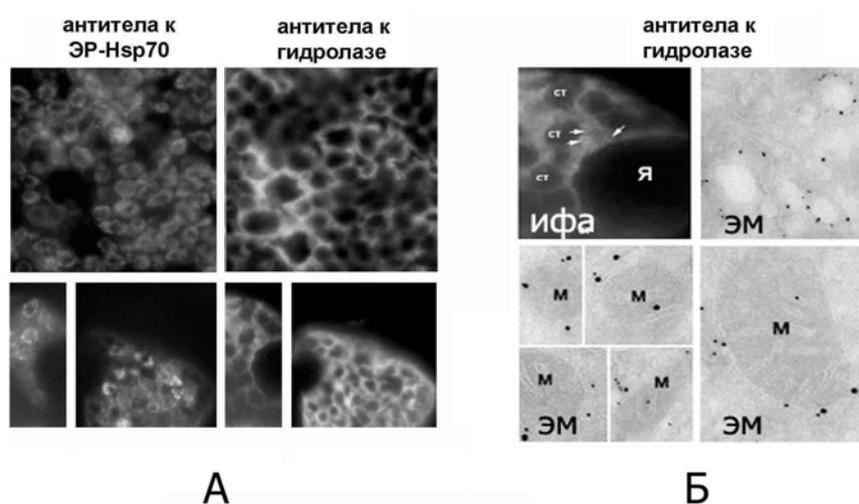


Рисунок 14. Иммунолокализация α/β -гидролазы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи. А. На срезах зараженного жирового тела саранчи антитела к α/β -гидролазе метили цитоплазму клетки хозяина вокруг клеток паразита, визуализированных с помощью антител к шаперону ЭР-HSP70 (иммунофлюоресцентная микроскопия). Б. Иммунофлюоресцентная (ИФА) и иммуноэлектронная (ЭМ) микроскопия срезов зараженного жирового тела саранчи позволила получить данные о связи α/β -гидролазы микроспоридии *P. locustae* с митохондриями и другими мембранными структурами зараженной клетки (в случае ИФА отмечены стрелками). Я - ядро зараженной клетки хозяина, СТ-стадии внутриклеточного развития микроспоридий, М - митохондрии хозяина.

Гексокиназа *P. locustae* и ее роль во взаимоотношениях паразита с зараженной клеткой хозяина. Компьютерный анализ гена гексокиназы *P.*

locustae показал присутствие в составе фермента N-концевого СП, ответственного за его секрецию (Долгих и др., 2010). Сравнительный анализ гексокиназ других видов показал, что наличие СП в их составе является общим свойством микроспоридий. У других организмов, включая близкие к микроспоридиям грибы, СП в составе гомологичных гексокиназ отсутствовал. Следует отметить, что все другие гликолитические ферменты микроспоридий также лишены СП. Это позволило предположить активное участие секретируемых гексокиназ микроспоридий в воздействии на зараженную клетку. Косвенным подтверждением этого послужили и данные о том, что клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* распознавали СП гексокиназ шести видов микроспоридий и выделяли в культуральную среду слитый с ними маркерный белок (Cuomo et al., 2012).

Для проверки данного предположения были проведены гетерологичная экспрессия гексокиназы *P. locustae* в *E. coli* и получение антител к наработанному белку. Иммуноблоттинг с использованием полученных антител показал накопление значительных количеств гексокиназы в цитоплазме зараженных клеток хозяина (Рисунок 15, А, дорожка М), но не в контрольной (незараженной) ткани (дорожка К). Фермент также присутствовал в выделенных стадиях внутриклеточного развития микроспоридий (дорожка С), но в значительно меньшем количестве. Наиболее интересным и значимым результатом иммунофлюоресцентного анализа замороженных срезов зараженного жирового тела саранчи оказалось накопление гексокиназы *P. locustae* в ядрах зараженных клеток хозяина (Senderskiy et al., 2014). Наиболее яркое окрашивание наблюдалось в ядрах интенсивно зараженных клеток в центре очага заражения. Интенсивность флюоресценции снижалась на периферии очага и отсутствовала в ядрах незараженных клеток (Рисунок 15, Б). Полученный результат согласуется с данными о том, что гексокиназа II накапливается в ядрах *S. cerevisiae* и раковых клеток HeLa, участвуя в регуляции активности генов углеводного обмена (Neary, Pastorino, 2010). Ядерная локализация гексокиназы микроспоридий в ядре зараженных клеток свидетельствует о приобретении ферментом паразита дополнительной функции, связанной с регуляцией уровня транскрипции генов хозяина.

Секретируемые LRR-белки микроспоридии *P. locustae*. Одним из интригующих результатов расшифровки геномов некоторых видов микроспоридий оказалось обнаружение обширных генных семейств,

кодирующих белки, содержащие обогащенные аминокислотой лейцин повторы (LRR-белки). Обширные семейства LRR-белков обнаружены в

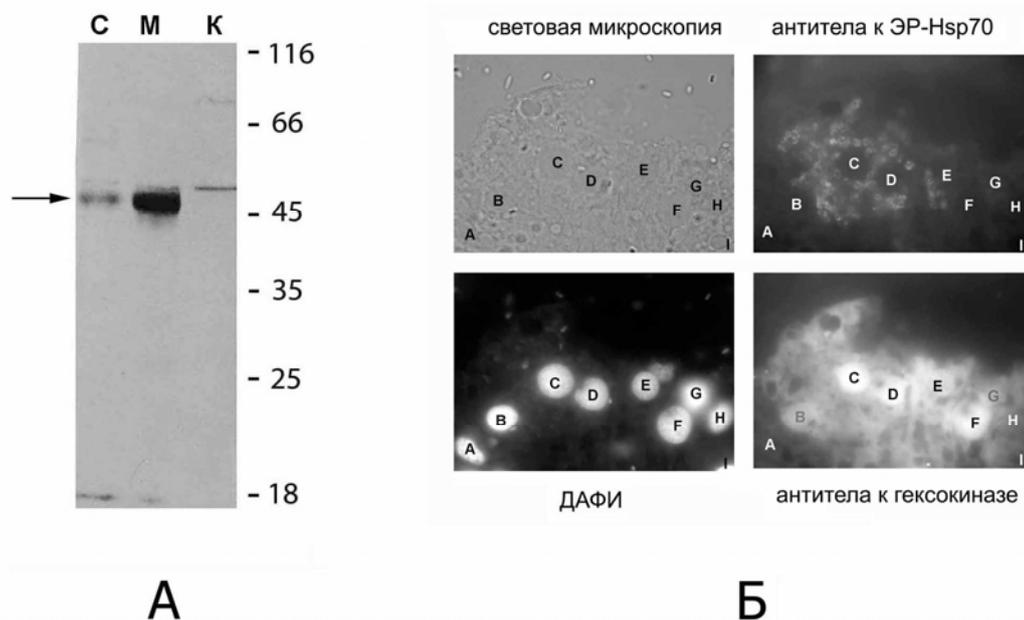


Рисунок 15. Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи. А. Иммуноблотинг с антителами против гексокиназы показал специфичное накопление белка с мол. весом около 48-49 кДа в цитоплазме зараженного жирового тела. С - белки выделенных в Перколле стадий внутриклеточного развития паразита, М и К - растворимые белки зараженного и контрольного жирового тела саранчи. Б. Накопление паразитического фермента в ядрах зараженных клеток доказано с помощью анализа замороженных 10 мкм срезов зараженной ткани с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии. Латинские буквы черного цвета указывают на ядра зараженных клеток хозяина. Белые буквы указывают на ядра незараженных клеток, а серые на ядра клеток, находящихся на периферии очага заражения.

генах микроспоридий *Trachipleistophora hominis* (Heinz et al. 2012) и *Spraguea lophii* (Campbell et al. 2013). Проведенный нами анализ генов, обнаруженных в геноме *P. locustae*, позволил обнаружить два таких семейства, кодирующих 55 (семейство А) и 25 (семейство Б) LRR-белков соответственно. Мультигенные семейства, присутствующие в геномах различных паразитов, играют важную роль в их взаимоотношениях с хозяином. С этой точки зрения интересно отметить, что в состав многих LRR-белков микроспоридий входит секреторный СП, а основная функция обогащенных лейцином повторов - формирование подковообразных структур, обеспечивающих

пространственное взаимодействие между самыми разными белками, в том числе между белками паразитов и их хозяев (Kedzierski et al., 2004).

С целью экспериментального подтверждения факта секреции LRR-белков микроспоридий в цитоплазму клетки хозяина мы осуществили гетерологичную экспрессию двух белков *P. locustae* в бактериях *E. coli* и получили поликлональные антитела к рекомбинантным белкам. Высокая степень сходства LRR-белков внутри семейств позволила заранее предположить, что антитела к одному белку могут распознавать несколько полос при иммуноблоттинге. Кроме того, гомология LRR-белков микроспоридий с регуляторными белками других организмов свидетельствовала об их относительно низком содержании в зараженной клетке. Как и ожидалось, в ходе иммуноблоттинга антитела против обоих LRR-белков распознавали в пробах цитоплазмы зараженного жирового тела саранчи несколько полос с относительно невысокой интенсивностью окраски (Senderskiy et al., 2014). В случае антител к LRR-белку семейства А наблюдалось распознавание 7-8 полос с молекулярным весом от 20 до 105 кДа (Рисунок 16), что соответствовало значениям, предсказанным по данным расшифровки генома *P. locustae*. Антитела к LRR-белку семейства Б показали специфичное накопление в цитоплазме зараженных клеток трех белков размером от 63 до 80 кДа (Рисунок 16). Это также соответствовало молекулярному весу изучаемого белка (78.8 кДа) и наиболее близких к нему форм (от 63.3 до 85.8 кДа).

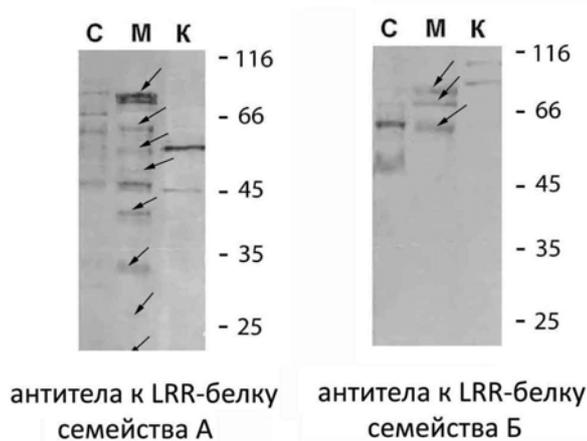


Рисунок 16. Иммуноблоттинг с антителами к LRR-белкам *P. locustae*. Дорожки обозначены как и на Рисунке 15.

Экспрессия полноразмерных копий генов в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* подтвердила, что оба изучаемых LRR-белка *P. locustae*

секретируются за пределы клетки паразита (Senderskiy et al., 2014; Тимофеев и др., 2014). Дрожжевые клетки распознавали LRR-белки микроспоридий как секретируемые, выделяя их в культуральную среду в ходе гетерологичной экспрессии (Рисунок 17). Более эффективная секреция наблюдалась для LRR-белка семейства А. В этом случае большая часть белка паразита накапливалась в культуральной жидкости за пределами дрожжевых клеток. Размер секретируемых молекул, оцененный с помощью ДСН-ПААГЭ, полностью соответствовал предсказанному размеру белка (42 кДа), что свидетельствует об отсутствии (или очень низком содержании) углеводных остатков в составе секретируемой молекулы. Размер LRR-белка семейства Б, накапливающегося в дрожжевых клетках, также соответствовал предсказанному значению (около 79 кДа). При этом экспрессия сопровождалась накоплением в культуральной жидкости диффузной полосы значительно большего размера, что соответствует гликозилированной форме белка.

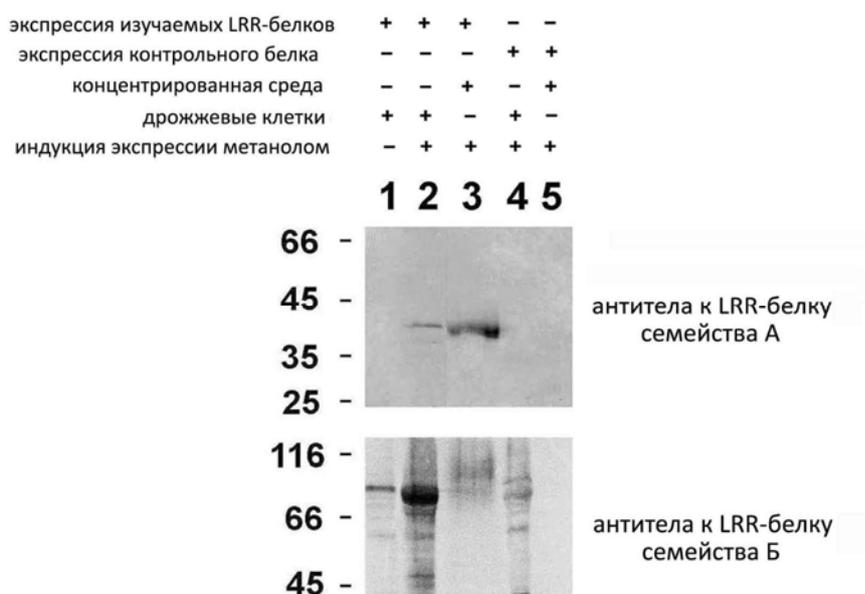


Рисунок 17. Гетерологичная экспрессия LRR-белков *P. locustae* в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. 1- дрожжевые клетки до индукции гетерологичной экспрессии в присутствии метанола; 2- дрожжевые клетки экспрессирующие гетерологичный белок после добавления в среду метанола, 3- среда после культивирования клеток *P. pastoris*, экспрессирующих гетерологичные белки, сконцентрированная приблизительно в 50 раз; 4- дрожжевые клетки, экспрессирующие другой белок (гидролазу) паразита (контрольные клетки); 5- концентрированная культуральная среда после экспрессии контрольных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы получены оригинальные данные о физиологических, биохимических и ультраструктурных особенностях энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema*, подтверждающие уникальный характер их адаптации к развитию в клетках насекомых. На первом этапе исследований собраны доказательства глубокой зависимости микроспоридий от метаболической системы насекомого-хозяина при внутриклеточном развитии и выдвинута гипотеза об эксплуатации паразитами энергетической системы зараженной клетки с помощью уникальных белков-переносчиков. Последующая расшифровка французскими исследователями генома микроспоридии *E. cuniculi* подтвердила полученные нами данные и поставила новые вопросы об уникальных особенностях физиологии этих паразитов, возникших вследствие их длительной адаптации к внутриклеточному развитию и не обнаруженных у других организмов.

Используя молекулярно-биологические методы, мы впервые обнаружили гены, кодирующие АТФ/АДФ-переносчики пластидно-бактериального типа в геноме *P. grylli*, а также показали транскрипционную активность одного из них на стадии споры и при внутриклеточном развитии паразита. Наличие гомологичных последовательностей у филогенетически удаленных видов (*E. cuniculi* и *P. grylli*) позволило заключить, что паразитирование микроспоридий на энергетической системе зараженной клетки следует признать общим свойством типа. Приобретение этих генов микроспоридиями в результате горизонтального переноса от паразитических бактерий могло стать ключевым событием на пути адаптации их предков к внутриклеточному развитию. Последующая расшифровка геномов микроспоридий из различных филогенетических групп подтвердила присутствие генов АТФ/АДФ-переносчиков этого типа у всех изученных видов.

Поглощение энтомопатогенными микроспоридиями готовой АТФ из цитоплазмы зараженной клетки подчеркивает крайнюю степень метаболической зависимости этих паразитов от насекомого-хозяина. Поскольку облигатный паразит для завершения своего развития нуждается в длительном сохранении его жизнеспособности, патогенез при микроспоридиозах развивается относительно медленно, сопровождаясь снижением содержания запасов в жировом теле насекомых, подавлением активности репродуктивной и защитных систем, потерей способности к перелетам и функциональными нарушениями в зараженных клетках и тканях.

Далее мы осуществили гетерологичную экспрессию ряда генов, кодирующих метаболические ферменты и белки «домашнего хозяйства» микроспоридии *P. locustae*, в бактериях *E. coli* и получили антитела к наработанным рекомбинантным продуктам. Данный подход позволил впервые доказать, что при внутриклеточном развитии микроспоридии выключают свой энергетический обмен, полностью полагаясь на метаболическую систему зараженной клетки насекомого-хозяина. Этот результат также получил подтверждение в более поздних публикациях зарубежных коллег (Heinz et al., 2012), а полученные к белкам *P. locustae* антитела были использованы нами в последующих экспериментах.

В частности, нам удалось локализовать два компонента альтернативной дыхательной цепи *P. locustae* на внутренней мембране митосом - рудиментов митохондрий в клетках паразита. Таким образом, впервые подтверждено участие этих редуцированных органелл в энергетическом обмене микроспоридий. Во введении отмечалось, что *P. locustae* - пока единственный вид микроспоридий, успешно использованный для создания нескольких промышленных биопрепаратов. Одно из необходимых условий создания и успешного использования таких препаратов - длительная сохранность жизнеспособности спор паразита вне организма хозяина. Мы полагаем, что способность *P. locustae* (необычная для наземных микроспоридий) использовать альтернативную дыхательную цепь для энергетического обеспечения спор при хранении может быть одной из причин такого успеха.

Другим интересным результатом анализа белков *P. locustae* с использованием полученных антител оказалась обнаруженная нами эволюционная релокализация редуцированной пируватдегидрогеназы микроспоридий из митохондрий в цитоплазматический компартмент спор. Вероятно, данный фермент, совместно с ацетил-СоА-синтетазой, участвует в генерации нуклео-цитозольного пула ацетил-СоА, необходимого для ацетилирования гистонов и структурных белков при активации споры. Сопоставление полученных нами данных с результатами расшифровки геномов нескольких видов микроспоридий еще раз подтвердило тот факт, что эти облигатные внутриклеточные паразиты не только крайне редуцировали свой метаболический аппарат, но и приобрели целый ряд уникальных структурно-функциональных особенностей, не обнаруженных у других эукариотических организмов.

Одной из таких особенностей оказалась структурная организация секреторного аппарата микроспоридий. Внутриклеточный транспорт и

секреция белков играют чрезвычайно важную роль в физиологии этих паразитов, обеспечивая (1) доставку переносчиков на цитоплазматическую мембрану клетки паразита, (2) формирование сложно устроенной споры, (3) участие секретируемых белков паразита в воздействии на зараженную клетку. В данном исследовании на примере микроспоридий рода *Paranosema* мы показали, что комплекс Гольджи паразитов представляет собой непрерывную тубулярную сеть, соединяющую цистерны эндоплазматического ретикулума с цитоплазматической мембраной и формирующейся полярной трубкой. Быстрый транспорт белков к формируемым структурам споры по непрерывным тубулам, возможно, необходим для обеспечения высокой интенсивности и скорости спорогенеза у микроспоридий. Широко известны примеры массовой трансформации споронтов в сложно устроенную спору за короткое время (от суток до нескольких суток). Стимулом для массового образования спор могут быть условия среды или физиологическое состояние хозяина.

Самой интересной структурно-функциональной особенностью секреторного аппарата микроспоридий оказалось полное отсутствие изолированных транспортных везикул в клетках паразита на всем протяжении жизненного цикла. Изолированные везикулы не обнаружены в клетках микроспоридий рода *Paranosema* при использовании методов электронной томографии и трехмерной реконструкции аппарата Гольджи на стадии меронта, споронта и споробласта. Использование метода ультрабыстрой криофиксации структур клетки микроспоридий под высоким давлением, ингибирование процесса слияния везикул с компартментом-акцептором в присутствии N-этилмалеимида и ингибирование “раздевания” (снятия белковой оболочки) COP1-зависимых везикул с помощью тетрафлюорида алюминия (AlF_4) также не привели к их обнаружению. Через шесть лет после публикации наших результатов непрерывность секреторного пути микроспоридий и отсутствие у этих паразитов транспортных везикул подтверждены американскими коллегами в ходе трехмерной томографической реконструкции комплекса Гольджи спороплазм *Anncaliia algerae* (Takvorian et al. 2013). Отсутствие транспортных везикул у микроспоридий представляет интерес не только для паразитологов, но и для цитологов, изучающих общие вопросы внутриклеточного транспорта. Данный результат показывает, что, несмотря на важную роль изолированных везикул для эукариотической клетки, существуют такие организмы как микроспоридии, способные успешно осуществлять внутриклеточный транспорт без их участия. Интересно

отметить, что у микроспоридий наблюдается транскрипционная активность генов, ответственных за формирование везикул (СОР-субъединицы) и их слияние (SNARE-белки). Для выяснения функции этих белков в клетках паразита требуются дополнительные исследования.

Наличие у микроспоридий хорошо развитого секреторного аппарата и их глубокая зависимость от метаболической системы хозяина позволяют предположить, что эти паразиты способны выделять белки, относящиеся к различным функциональным категориям, с целью целенаправленного воздействия на зараженную клетку. В данной работе мы полностью подтвердили эту гипотезу и показали, что секретируемые белки микроспоридии *P. locustae* могут участвовать в мобилизации резервных липидов зараженного жирового тела саранчи (α/β -гидролаза), регуляции транскрипционной активности генов хозяина (гексокиназа), взаимодействии с разнообразными белками зараженной клетки (LRR-белки). Полученный результат открывает широкие перспективы для дальнейших исследований молекулярных инструментов патогенного воздействия этих интересных паразитов на зараженную клетку и организм хозяина в целом.

В конце обсуждения полученных результатов следует еще раз остановиться на уникальных биохимических особенностях, обнаруженных у микроспоридии *P. locustae*. В данной работе мы показали, что в отличие от других наземных паразитов насекомых, относящихся к родам *Nosema* и *Vairimorpha*, этот патоген располагает: (1) альтернативной дыхательной цепью в спорах на внутренней мембране митосом; (2) двумя мультигенными семействами, кодирующими секретируемые LRR-белки; (3) уникальными пролин-богатыми С-концевыми повторами в составе секретируемой α/β -гидролазы. Мы полагаем, что обнаруженные биохимические особенности паразитов рода *Paranosema* могут определять успешность и перспективность их использования в качестве биопрепаратов.

ВЫВОДЫ

1. При изучении метаболических и структурно-функциональных адаптаций микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному развитию получены данные о приобретении этими паразитами ряда структурно-функциональных особенностей, не обнаруженных у других эукариотических паразитов, что обуславливает уникальный характер их взаимоотношений с зараженной клеткой насекомого-хозяина.

2. Способность поглощать готовую АТФ зараженной клетки с помощью уникальных белков-переносчиков позволяет микроспоридиям полностью выключать собственный энергетический обмен при внутриклеточном развитии.
3. Споры микроспоридий, в отличие от стадий внутриклеточного развития, используют собственный метаболический аппарат для обеспечения энергией процесса экстррузии спороплазмы, заражения нового хозяина и выживания во внешней среде.
4. Энтомопатогенные микроспоридии приобрели способность управлять физиологическими процессами и молекулярно-генетическими программами зараженной клетки насекомого-хозяина с помощью функционально разнообразных секретлируемых белков.
5. К структурно-функциональным особенностям секреторного аппарата микроспоридий относятся (1) непрерывность тубулярной сети, соединяющей цистерны ЭР с цитоплазматической мембраной и формирующейся полярной трубкой, (2) отсутствие изолированных транспортных везикул, (3) редукция набора ферментов, ответственных за гликозилирование мембранных и секретлируемых белков.
6. В отличие от наземных паразитов насекомых, относящихся к родам *Nosema* и *Vairimorpha* (класс Terresporidia), микроспоридия *P. locustae* относится к классу Aquasporidia и располагает: (1) альтернативной дыхательной цепью на внутренней мембране митосом спор; (2) двумя мультигенными семействами, кодирующими секретлируемые LRR-белки; (3) уникальными пролин-богатыми С-концевыми повторами в составе секретлируемой α/β -гидролазы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в работе данные о крайней степени метаболической зависимости энтомопатогенных микроспоридий от хозяина позволяют заключить, что при использовании препаратов на основе их спор наиболее результативным следует признать профилактическое внесение инфекционного начала в популяции вредителя для создания долговременных очагов микроспоридиоза. Длительная циркуляция паразитов в популяциях насекомых-фитофагов, обеспечивая супрессирующее воздействие паразита на вредителей, будет предотвращать вспышки их массовых размножений. В случае перелетной саранчи, внесение спор в места откладки кубышек будет предотвращать рост численности и дальнейшую миграцию.

2. В разработке новых методов терапии микроспориозов человека и животных в качестве белков-мишеней паразитов большой интерес представляют уникальные переносчики, используемые микроспоридиями для эксплуатации зараженной клетки хозяина. Собственный метаболический аппарат микроспоридий играет важную роль лишь в обеспечении жизнеспособности и инвазионности уже сформированных спор.

3. Микроспоридии секретируют в зараженную клетку насекомых значительные количества ферментов α/β -гидролаза и гексокиназа. Антитела к этим белкам могут быть использованы для создания высокочувствительных систем иммунодиагностики микроспориозов насекомых.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования:

1. Долгих, В.В. Влияние микроспоридии *Nosema grylli* и кокцидии *Adelina grylli* на активность четырех ферментов энергетического и углеводного обмена в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus* // В.В. Долгих / Паразитология. - 1998. - Т. 32, вып. 5. - С. 464-469.

2. Sokolova, J. Analysis of antibodies raised against soluble and membrane bound proteins of *Nosema grylli* (Microspora) spores // J. Sokolova, V.V. Dolgikh, A. Weck-Heimann, R. Entzeroth / Цитология. - 2000. - Т. 42, вып. 10. - С. 993-1003.

3. Долгих, В.В. Особенности энергетического обмена микроспоридии *Nosema grylli* при внутриклеточном развитии // В.В. Долгих, П.Б. Семенов, М.В. Григорьев / Паразитология. - 2002. - Т. 36, вып. 6. - С. 493-501.

4. Долгих, В.В. Особенности катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *Nosema grylli* // В.В. Долгих, П.Б. Семенов / Паразитология. - 2003. - Т. 37, вып. 4. - С. 333-342.

5. Dolgikh, V.V. The spore wall and polar tube proteins of the Microsporidian *Nosema grylli*: the major spore wall protein is released before spore extrusion // V.V. Dolgikh, P.B. Semenov / Цитология. - 2003. - Т. 45, вып. 3. - С. 324-329.

6. Sokolova, Y.Y. Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., Comb. Nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. // Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, E.V. Morzhina, E.S.

Nassonova, I.V. Issi, R.S. Terry, J.E. Ironside, J.E. Smith, C.R. Vossbrinck / J. Invertebr. Pathol. - 2003. - V.84, N. 3. - P. 159-172.

7. **Dolgikh, V.V.** Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli* // V.V. Dolgikh, P.B. Semenov, A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko / Protist. - 2005. - V. 156, N. 1. - P. 77-87.

8. **Dolgikh, V.V.** Intracellular transport of secretory proteins in microsporidia occurs in the absence of small, coat-dependent vesicles / V.V. Dolgikh, G.V. Beznoussenko, P.B. Semenov, Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov // Folia parasitologica. - 2005. - V.52. - P. 2A.

9. Nassonova, E. On the species concept for Microsporidia: *Paranosema grylli* and *Paranosema locustae* are closely related but yet distinct species // E. Nassonova, **V. Dolgikh**, P. Semenov, Y. Tokarev, E. Cornillot, G. Méténier, C.P. Vivarès³, Y. Sokolova, I. Issi / Folia parasitologica. - 2005. - V. 52. - P. 8A.

10. Сесорова, И.С. Эволюционный подход в понимании структурно-функциональной организации комплекса Гольджи // И.С. Сесорова, Г.В. Безнусенко, В.В. Банин, **В.В. Долгих** / Морфология. - 2006. - V. 129, вып. 1. - С. 91-94.

11. **Dolgikh, V.V.** Pyruvate-converting mactivityum inm the spores of the microsporidian genus *Paranosema (Antonospora)* // V.V. Dolgikh, R.I. Al-Shekhadat / FEMS Microbiol. Lett. - 2006. - V. 259, N. 1. - P. 142-146.

12. **Долгих, В.В.** Особенности гликозилирования белков в спорах микроспоридии *Paranosema (Antonospora) grylli* // В.В. Долгих, П.Б. Семенов, Г.В. Безнусенко / Цитология. - 2007. - Т. 49, вып. 7. - С. 607-613.

13. Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avescular mechanisms of function // G.V. Beznoussenko, **V.V. Dolgikh**, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D. Di Giandomenico, P. Auinger, I.V. Senderskiy, S.O. Skarlato, E.S. Snigireskaya, Y.Y. Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov / J. Cell Sci. - 2007. - V. 120. - P. 1288-1298.

14. **Dolgikh, V.V.** Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells // V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, A.M. Naumov, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, G.V. Beznoussenko / FEMS Microbiol. Lett. - 2009. - V. 293, N. 2. - P.285-291.

15. Долгих, В.В. Анализ экспрессии генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *Paranosema (Antonospora) locustae* // В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, Г.В. Безнусенко / Цитология. - 2010. - Т. 52, вып. 1. - С. 5-11.
16. Долгих, В.В. Уникальные особенности энергетического обмена микроспоридий, как результат длительной адаптации к внутриклеточному развитию // В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, А.М. Наумов / Паразитология. - 2011. - Т. 45, вып. 2. - С. 147-157.
17. Исси, И.В. Можно ли называть споры микроспоридий покоящейся стадией? // И.В. Исси, В.В. Долгих, Ю.С. Токарев / Паразитология. - 2011. - Т. 45, вып. 4. - С. 324-337.
18. Dolgikh, V.V. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora (Paranosema) locustae* spores: mitosomes retain their role in microsporidial energy metabolism // V.V. Dolgikh, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, A.M. Naumov, G.V. Beznoussenko / Eukaryot. Cell. - 2011. - V. 10, N. 4. - P.588-593.
19. Долгих, В.В. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 в изучении секрета внутриклеточных паразитов // В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, С.А. Тимофеев, А.М. Наумов / Паразитология. - 2012. - Т.46, вып. 6. - С. 479-492.
20. Сендерский, И.В. Иммунолокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *Paranosema locustae* Canning в зараженном жировом теле саранчи // И.В. Сендерский, О.А. Павлова, С.А. Тимофеев, В.В. Долгих / Паразитология. - 2014. - Т. 48, вып. 1. - С. 63-70.
21. Тимофеев, С.А. Особенности экспрессии, структуры и локализации субтилизин-подобной протеиназы микроспоридии *Paranosema locustae* // С.А.Тимофеев, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, В.В. Долгих / Паразитология. - 2014. - Т. 48, вып. 5. - С. 337-347.
22. Senderskiy, I.V. Secretion of *Antonospora (Paranosema) locustae* proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes // I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, E.V. Seliverstova, O.A. Pavlova, V.V. Dolgikh / PLoS One. - 2014. - V. 9, N. 4. - P. e93585.

23. Тимофеев, С.А. Взаимоотношения микроспоридий с зараженной клеткой // С.А. Тимофеев, Ю.С. Токарев, А.В. Симакова, А.А. Царев, **В.В. Долгих** / Цитология. - 2016. - Т. 58, вып. 8. - С. 594-601.

Публикации в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ:

1. **Dolgikh, V.V.** Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the intracellular stages of the microsporidian *Nosema grylli* // V.V. Dolgikh / Protistology. - 2000. - V. 1. - P. 87-91.

2. **Долгих, В.В.** Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria* // В.В. Долгих, О.А. Павлова, И.В. Сендерский, Г. Пэн / Вестник Защиты Растений. - 2010. - N.1 - С. 48-51.

3. Леднев, Г.Р. Стратегии паразитизма энтомопатогенных микроорганизмов и их роль в снижении численности фитофагов // Г.Р. Леднев, **В.В. Долгих**, В.А. Павлюшин / Вестник защиты растений. - 2013. - N. 3. - С. 3-17.

Международные коллективные монографии:

1. Weidner, E. Microsporidian biochemistry and physiology / E. Weidner, A.M. Findley, **V. Dolgikh**, J. Sokolova // The Microsporidia and Microsporidiosis. - Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999. - P. 172-195.

2. Mironov, A.A. Evolution of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex // A.A. Mironov, V.V. Banin, I.S. Sesorova, **V.V. Dolgikh**, A. Luini, G.V. Beznoussenko / Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution. Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 607. - Landes Bioscience, 2007. - P.61-72.

3. Williams, B.A.P. Microsporidian biochemistry and physiology // B.A.P. Williams, **V.V. Dolgikh**, Y.Y. Sokolova / Microsporidia: Pathogens of Opportunity. - John Wiley & Sons, Inc., 2014. - P. 245-260.

Публикации в других научных журналах:

1. Тимофеев, С.А. Гетерологичная экспрессия в дрожжевых клетках как метод изучения факторов патогенности микроспоридий // С.А. Тимофеев, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, **В.В. Долгих** / Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. - 2014. - N. 6-1. С. 104-107.