

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
“Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”

*на правах рукописи*

**Долгих  
Вячеслав Васильевич**

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

03.02.11- паразитология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**Научный консультант:** доктор  
биологических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории микробиологической  
защиты растений ФГБНУ ВИЗР  
**Исси И.В.**

**Санкт-Петербург**

**2016**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	10
Глава 1. Материалы и методы	20
1.1. Объекты исследования	20
1.2. Биохимические методы анализа обменных процессов	21
1.2.1. Анализ активности ферментов углеводного и энергетического обмена в стадиях внутриклеточного развития <i>P. grylli</i>	21
1.2.2. Тестирование активности ферментов катаболизма трегалозы в спорах <i>P. grylli</i>	23
1.2.3. Пируват-метаболизирующая активность в спорах микроспоридий	25
1.2.4. Определение содержания запасных веществ и субстратов энергетического обмена в жировом теле сверчков, а также клетках и спорах микроспоридий	26
1.3. Молекулярно-биологические методы, использованные для поиска АТФ/АДФ- переносчиков микроспоридии <i>P. grylli</i>	28
1.3.1. Выделение геномной ДНК из спор микроспоридий	28
1.3.2. Саузерн-гибридизация геномной ДНК с радиоактивно мечеными фрагментами генов	28
1.3.3. ПЦР-амплификация фрагментов генов с помощью выродженных праймеров	29
1.3.4. Выделение полноразмерной копии гена	29
1.4. Методы гетерологичной экспрессии генов микроспоридии <i>P. locustae</i>	30
1.4.1. Компьютерный анализ генов	30
1.4.2. ПЦР-амплификация генов микроспоридии <i>P. locustae</i>	31
1.4.3. Создание генетических конструкций для экспрессии генов микроспоридий в бактериях <i>E. coli</i>	31

1.4.4.	Гетерологичная экспрессия генов <i>P. locustae</i> в клетках <i>E. coli</i> и очистка рекомбинантных белков	32
1.4.5.	Гетерологичная экспрессия белков микроспоридий в клетках метилотрофных дрожжей <i>Pichia pastoris</i>	33
1.5.	Иммунохимические и иммуноцитохимические методы анализа белков микроспоридий	34
1.5.1.	Получение и очистка антител к рекомбинантным белкам	34
1.5.2.	ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинг	35
1.5.3.	Иммунофлюоресцентная микроскопия	36
1.5.4.	Иммуноэлектронная микроскопия криосрезов	37
1.6.	Методы ультраструктурного и биохимического анализа секреторного аппарата микроспоридий	38
1.6.1.	Приготовление образцов и электронная микроскопия	38
1.6.2.	Электронная томография	40
1.6.3.	Методы анализа особенностей гликозилирования белков микроспоридий	42
1.7.	Анализ экспрессии генов в клетках микроспоридий	44
	Глава 2. Особенности энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии	47
2.1.	Состояние проблемы к началу исследований	47
2.1.1	Зависимость микроспоридий от метаболической системы хозяина	47
2.1.2.	Влияние микроспоридий на биохимические процессы в организме насекомого-хозяина	48
2.1.3.	Воздействие микроспоридий на зараженную клетку	51
2.2.	Биохимический анализ особенностей взаимодействия микроспоридий с энергетической системой зараженной клетки хозяина	54
2.2.1.	Сравнительный анализ активности ферментов углеводного	

и энергетического обмена в спорах и стадиях внутриклеточного развития <i>P. grylli</i>	55
2.2.2. Влияние микроспоридий <i>P. grylli</i> на содержание запасных веществ в зараженном жировом теле сверчков	59
2.2.3. Влияние микроспоридий <i>P. grylli</i> на содержание субстратов и интермедиатов энергетического обмена в зараженном жировом теле сверчков	61
2.2.4. Влияние микроспоридий <i>P. grylli</i> на активность ферментов углеводного и энергетического обмена в жировом теле хозяина	63
2.2.5. Сопоставление биохимических данных с результатами расшифровки генома микроспоридии <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	67
2.3. АТФ/АДФ-транслоказы пластидно-бактериального типа как инструмент паразитирования микроспоридий на энергетической системе хозяина	69
2.3.1. Научное значение обнаружения уникальных переносчиков в геноме <i>E. cuniculi</i> .	69
2.3.2. Саузерн-гибридизация геномной ДНК <i>P. grylli</i> с мечеными генами АТФ/АДФ-переносчиков бактерий ( <i>Chlamydia trachomatis</i> ), пластид растений ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) и микроспоридии <i>E. cuniculi</i>	72
2.3.3. ПЦР-амплификация фрагментов двух генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики <i>P. grylli</i> с использованием вырожденных праймеров	73
2.3.4. Выделение полноразмерной копии гена <i>ANCI</i>	78
2.3.5. Экспрессия гена <i>ANCI</i> в спорах и стадиях внутриклеточного развития <i>P. grylli</i>	80
2.3.6. Анализ полученных данных и сопоставление с результатами других исследований	81
2.4. Выключение метаболического аппарата клетки микроспоридий при внутриклеточном развитии	84

2.4.1.	ПЦР-амплификация генов и создание генетических конструкций для экспрессии изучаемых белков в <i>E. coli</i>	85
2.4.2.	Гетерологичная экспрессия белков в бактериях <i>E. coli</i> , выделение рекомбинантных продуктов и получение специфичных антител	87
2.4.3.	Сравнительный анализ содержания метаболических ферментов и белков «домашнего хозяйства» в спорах и стадиях внутриклеточного развития <i>P. locustae</i>	89
2.4.4.	Сопоставление полученных результатов с данными других исследований	92
Глава 3. Особенности энергетического и углеводного обмена в спорах микроспоридий		94
3.1.	Состояние проблемы к началу исследований	94
3.1.1.	Данные о метаболических особенностях спор микроспоридий, накопленные к середине 90-х годов прошлого столетия	94
3.1.2.	Особенности энергетического обмена эндопаразитических простейших	99
3.1.3.	Активность ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах микроспоридии <i>P. grylli</i>	104
3.1.4.	Новые направления исследования метаболического аппарата микроспоридий	108
3.2.	Роль трегалозы в физиологии спор микроспоридий <i>P. grylli</i>	110
3.2.1.	Влияние выброса полярных трубок на содержание трегалозы и глюкозы в спорах <i>P. grylli</i>	111
3.2.2.	Влияние длительного хранения на содержание трегалозы и глюкозы в спорах <i>P. grylli</i>	114
3.2.3.	Анализ активности трегалазы и фосфорилазы трегалозы в спорах <i>P. grylli</i>	114
3.2.4.	Научное значение полученных данных	117

3.3.	Участие митосом микроспоридий в энергетическом обмене спор	119
3.3.1.	Научное значение обнаружения митосом у микроспоридий	119
3.3.2.	Обнаружение митосом в спорах <i>P. locustae</i>	122
3.3.3.	Иммунолокализация компонентов альтернативной дыхательной цепи в митосомах спор <i>P. locustae</i>	123
3.3.4.	Связь митосом микроспоридий с мембранами спор	129
3.3.5.	Научное значение полученных данных	131
3.4.	Уникальный пируват-метаболизирующий фермент микроспоридий и роль пирувата в физиологии паразитов	134
3.4.1.	Состояние проблемы на момент начала исследований	134
3.4.2.	Пируват-конвертирующая активность в спорах микроспоридий	136
3.4.3.	Имунолокализация ПДГ в спорах микроспоридий: эволюционная релокализация митохондриального белка в цитоплазму спор паразита	143
3.4.4.	Иммунопреципитация ПДГ <i>P. locustae</i>	147
3.4.5.	Научное значение полученных результатов	150
Глава 4. Морфофункциональные особенности секреторного аппарата микроспоридий		154
4.1.	Уникальная структура комплекса Гольджи микроспоридий: непрерывность тубулярной сети и отсутствие транспортных везикул	154
4.1.1.	Состояние изученности проблемы к началу исследований	154
4.1.2.	Морфологический анализ Гольджи-подобных структур <i>P. grylli</i>	159
4.1.3.	Подтверждение отсутствия изолированных везикул в клетках микроспоридий <i>P. grylli</i> с использованием различных методических подходов	166
4.2.	Участие Гольджи-подобных авезикулярных структур во внутриклеточном транспорте основных белков оболочки споры и	

полярной трубки микроспоридий	172
4.2.1. Выделение (избирательная солюбилизация) основного белка оболочки спор <i>P. grylli</i>	172
4.2.2. Выделение трех белков полярной трубки <i>P. grylli</i>	175
4.2.3. Получение поликлональных антител к белкам оболочки споры и полярной трубки <i>P. grylli</i> и анализ их специфичности	177
4.2.4. Внутриклеточный транспорт структурных белков полярной трубки и оболочки спор <i>P. grylli</i> с участием тубулярных кластеров	186
4.3. Особенности гликозилирования белков микроспоридии <i>P. grylli</i> , транспортируемых через комплекс Гольджи	191
4.3.1. Состояние изученности особенностей гликозилирования белков микроспоридий к началу исследования	191
4.3.2. Общая оценка степени гликозилирования белков спор <i>P. grylli</i>	193
4.3.3. Отсутствие N-гликозилированных белков в спорах <i>P. grylli</i>	195
4.3.4. Выявление остатков маннозы в структурных белках спор <i>P. grylli</i>	197
4.4. Экспрессия генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии <i>P. locustae</i>	201
4.4.1. Анализ содержания мРНК-транскрипов, кодирующих субъединицы COPI, COPII и SNARE-белки в клетках микроспоридий	202
4.4.2. Накопление Sec13 субъединицы COPII и SNARE-белка синтаксина в клетках микроспоридий и их связь с мембранами паразита	205
4.4.3. Предполагаемая роль генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридий	208
Глава 5. Роль секретируемых белков микроспоридий в управлении физиологическими процессами и молекулярно-генетическими программами зараженной клетки насекомого-хозяина	211
5.1. Состояние изученности проблемы к началу исследований	211
5.1.1. Секретируемые белки внутриклеточных паразитов как	

инструмент воздействия на клетку хозяина	211
5.1.2. Косвенные данные о способности микроспоридий управлять молекулярно-генетическими программами и физиологическими процессами зараженной клетки хозяина	214
5.2. Изучение роли $\alpha/\beta$ -гидролазы <i>P. locustae</i> во взаимоотношениях паразита с зараженной клеткой хозяина	217
5.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена $\alpha/\beta$ -гидролазы, обнаруженной в геноме <i>P. locustae</i>	217
5.2.2. Гетерологичная экспрессия $\alpha/\beta$ -гидролазы <i>P. locustae</i> в клетках бактерии <i>E. coli</i>	220
5.2.3. Получение проб цитоплазмы зараженных клеток хозяина	222
5.2.4. Анализ содержания $\alpha/\beta$ -гидролазы <i>P. locustae</i> в клетках паразита и хозяина с помощью иммуноблотинга	224
5.2.5. Локализация $\alpha/\beta$ -гидролазы <i>P. locustae</i> в зараженных клетках жирового тела саранчи	226
5.3. Гексокиназа <i>P. locustae</i> и ее роль во взаимоотношениях паразита с зараженной клеткой хозяина	232
5.3.1. Уникальные свойства гексокиназы микроспоридий	232
5.3.2. Гетерологичная экспрессия гексокиназы <i>P. locustae</i> в бактериях <i>E. coli</i> и получение антител к рекомбинантному белку	234
5.3.3. Иммунолокализация гексокиназы <i>P. locustae</i> в клетках зараженного жирового тела саранчи	236
5.4. Секретируемые LRR-белки микроспоридии <i>P. locustae</i>	240
5.4.1. Роль LRR-белков во взаимоотношениях между паразитом и хозяином	240
5.4.2. Гетерологичная экспрессия LRR-белков <i>P. locustae</i> в бактериях <i>E. coli</i> и получение антител к рекомбинантным продуктам	243
5.4.3. Анализ особенностей накопления LRR-белков <i>P. locustae</i> в цитоплазме зараженного жирового тела саранчи	245

5.4.4. Гетерологичная экспрессия LRR-белков <i>P. locustae</i> в клетках метилотрофных дрожжей <i>P. pastoris</i>	248
5.5. Научное значение полученных данных и новые направления исследований	251
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	253
ВЫВОДЫ	258
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	260

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в мире значительно возрос интерес исследователей к группе одноклеточных паразитических простейших, объединенных в тип *Microsporidia*. Микроспоридии являются облигатными внутриклеточными паразитами и включают в круг своих хозяев представителей практически всех типов животного царства от простейших до приматов включительно. Это свидетельствует о длительной истории взаимоотношений микроспоридий со своими хозяевами и характеризует их как чрезвычайно интересный объект для фундаментальных исследований. Уже первые результаты ультраструктурного анализа спор микроспоридий показали наличие у них уникального, сложноустроенного аппарата, обеспечивающего экструзию (выброс) полярной трубки и механическое внесение зародыша (спороплазмы) в инвазируемую клетку. В то же время, у паразитов отсутствует целый ряд органелл и структур, свойственных эукариотической клетке - гранулы запасных питательных веществ, митохондрии, лизосомы, пероксисомы, "классический" аппарат Гольджи. На основании этих данных микроспоридий длительное время рассматривали как наиболее древних паразитов среди эукариот, происхождение которых датируется ранним палеозоем (Исси, 1978). Однако особенности митотического аппарата микроспоридий, а также выявление в их спорах хитина и дисахарида трегалозы свидетельствовали в пользу близкой филогенетической связи с грибами. В настоящее время филогенетическая близость микроспоридий и грибов подтверждена в ходе анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей целого ряда генов (Van de Peer et al., 2000).

Практическое значение микроспоридий также трудно переоценить. Особое внимание в современной науке и медицине 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). Микроспориозы человека протекают крайне тяжело, некоторые виды этих протистов поражают глаза и вызывают помутнение хрусталика, другие – мускулатуру, полностью замещая ее своими стадиями и спорами, третьи развиваются в стенках кишечника, вызывая хроническую диарею, часто не поддающуюся лекарственному излечению. Микроспоридии также являются возбудителям опасных заболеваний полезных насекомых, мидий, промысловых видов рыб, и теплокровных домашних животных.

Подавляющее большинство видов микроспоридий развивается в членистоногих, главным образом, в насекомых. Широкое распространение микроспоридий 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; Canning, 1982; Kaya, 1975; Wilson, 1984; Исси, 1986). В качестве агентов для борьбы с вредными насекомыми-фитофагами в настоящее время изучаются микроспоридии родов *Nosema* и *Vairimorpha* (Lewis et al., 2009; Solter, Hajek 2009; Solter et al. 2012). Однако наиболее перспективным для создания

микробиологического препарата, способного контролировать численность насекомых - вредителей, следует признать представителя рода *Paranosema*. Обнаруженная в культуре перелетной саранчи *Locusta migratoria* микроспоридия *Paranosema (Antonospora, Nosema) locustae* (Canning, 1953) оказалась способной заражать 122 вида прямокрылых (Lange 2005; Lange 2010) и сохранять инвазионную активность спор при хранении в виде готового препарата в течение нескольких месяцев. В 1980 году препаративная форма на основе спор *P. locustae* была зарегистрирована в США (Nolo Bait™, Semaspore™) 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 механизмах, лежащих в основе патогенного воздействия этих паразитов на организм насекомого-хозяина. Мало было известно и о метаболизме микроспоридий и их взаимодействии с обменными процессами хозяина. Далекими от понимания оставались и процессы, 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.

Для исследований, описанных в диссертации, мы выбрали микроспоридий рода *Paranosema*, паразитирующих в жировом теле прямокрылых. Как уже отмечено, именно на основе спор *P. locustae* создан первый и пока единственный микроспоридиальный биопрепарат. Используя микроспоридий *Paranosema grylli* и *P. locustae*, паразитирующих

соответственно в жировом теле двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* и перелетной саранчи *Locusta migratoria*, в качестве объекта исследований мы планировали не только изучить перечисленные выше вопросы, но и попытаться найти какие-либо биохимические особенности паразитов этого рода, обуславливающие их перспективность для создания биопрепаратов.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы - изучение метаболических и структурно-функциональных аспектов адаптации энтомопатогенных 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 секретируемых 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.** Использование в работе биохимических, молекулярно-биологических, электронно-микроскопических, иммунохимических и иммуноцитохимических методов позволило впервые получить ряд важных результатов.

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 секретлируемая микроспоридиями гексокиназа накапливается в ядре зараженной клетки.

Впервые клонированы белок-кодирующие последовательности 14 генов микроспоридии *Paranosema locustae*, созданы генетические конструкции и

осуществлена их эффективная экспрессия в бактериях или дрожжевых грибах, к рекомбинантным белкам получены специфичные антитела.

**Практическая ценность.** 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, такие ферменты микроспоридий как

альтернативная оксидаза и пируватдегидрогеназа возможно представляют интерес в силу своей уникальности для разработки новых терапевтических препаратов при лечении микроспориозов.

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 -  $\alpha/\beta$ -гидролазы и гексокиназы. Антитела к этим белкам могут быть использованы для создания высокочувствительных систем иммунодиагностики микроспориозов 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.
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.

### **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 микроспоридиозов 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  $\alpha/\beta$ -гидролаза и гексокиназа. Антитела к этим белкам могут быть использованы для создания высокочувствительных систем иммунодиагностики микроспоридиозов насекомых.

### **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 ретикулюма с цитоплазматической мембраной и формирующейся 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.

**Апробация работы.** 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 микробиологического метода 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. Игнатьевой, 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 лаборатории клеточной биологии и онкологии института Фармакологических исследований Марио Негри (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 Национального центра научных исследований Франции В. Трезеге и Г. Лакину за помощь в поиске и изучении АТФ/АДФ-переносчиков микроспоридий.

## Глава 1. Материалы и методы.

### 1.1. Объекты исследования.

Все исследования выполнены на лабораторных культурах двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera, Gryllidae) и перелетной саранчи *Locusta migratoria migratorioides* R. & F (Orthoptera, Acrididae). В жировом теле этих видов прямокрылых соответственно развиваются микроспоридии *Paranosema (Nosema, Antonospora) grylli* и *Paranosema locustae* (Sokolova et al., 2003). Оба патогена развиваются в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина, имеют диплокарион, мономорфны и образуют споры овально-цилиндрической формы размером 4-5.2 x 1.8-2.5 мкм с 18-20 витками полярной трубки, расположенными в два слоя. Микроспоридия *P. grylli* (Соколова и др., 1994) оказалась чрезвычайно удобным объектом исследования. Сверчки для заражения *P. grylli* круглый год легко разводятся в условиях лаборатории и имеют относительно крупные размеры, что немаловажно для получения достаточных количеств биологического материала. При микроспориidioзе наблюдается очень высокая интенсивность инвазии, сопровождающаяся сильной гипертрофией жирового тела. Это позволяет получить достаточное для биохимических исследований количество спор и внутриклеточных стадий развития микроспоридий. Интерес к микроспоридии *P. locustae* обусловлен высокой патогенностью паразита в отношении различных видов прямокрылых насекомых и, в первую очередь, перелетной саранчи. Это в свою очередь послужило одной из причин появления проекта по расшифровке генома паразита, выполняемого американскими исследователями (Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272, <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/index.html> <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?page=intro>). Следует отметить, что

*P. grylli* и *P. locustae* филогенетически очень близки, что подтверждается 95 % идентичности последовательностей малой субъединицы рРНК обоих видов (Sokolova et al., 2003).

Лабораторная культура сверчков получена из инсектария ИЭФиБ им. И.М.Сеченова и поддерживалась по методике инсектария (Князев, 1985). Поддержание лабораторной культуры перелетной саранчи, заражение *per os* личинок третьего возраста спорами микроспоридии *P. locustae* проводили согласно методикам, описанным Соколовой и Лэнгом (Sokolova, Lange, 2002). Стадии внутриклеточного развития (меронты, споронты) и споры микроспоридии выделяли из жирового тела искусственно зараженных насекомых с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла по методу, разработанному Селезевым К.В. (Селезев и др., 1994; Seleznev et al., 1995).

Экструзию спор микроспоридий *P. grylli* стимулировали согласно методу, разработанному Курти с соавторами (Kurtti et al., 1994). Споры инкубировали 30 мин при комнатной температуре в растворе 1 (1 мМ Трис (трис(гидроксиметил)аминометан), 10 мМ ЭДТА (этилендиаминтетраацетат)). После центрифугирования спор в течение 10 мин при 600 g осадок ресуспендировали в 12 объемах раствора 2 (10 мМ КОН, 170 мМ КСl) и инкубировали еще 30 мин. После очередного центрифугирования споры ресуспендировали в 6 объемах раствора 3 (25 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА, 170 мМ КСl). Перенос спор в последний раствор вызывал выброс полярных трубок и выход спороплазм (Dolgikh, Semenov, 2003).

## **1.2. Биохимические методы анализа обменных процессов.**

### **1.2.1. Анализ активности ферментов углеводного и энергетического обмена в стадиях внутриклеточного развития *P. grylli*.**

Очищенные в градиенте плотности Перколла меронты и споронты ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ, 138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.8), лизировали на льду 10 мин в присутствии 0.1% детергента Тритон X-100 и центрифугировали при 17 000 g 10 мин. Отобранный супернатант использовали для измерения активности ферментов.

Концентрацию белка во всех пробах определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Активность изучаемых ферментов определяли спектрофотометрическим методом в термостатируемых кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при температуре 37°C. В работе использован спектрофотометр СФ-46 (производство ЛОМО). При измерении активности дегидрогеназ (ДГ) коэффициент дифференциальной молярной экстинкции НАД(НАДФ) и НАДН(НАДФН) (окисленный и восстановленный никотинамидадениндинуклеотид и никотинамидадениндинуклеотидфосфат) при длине волны 340 нм принимали равным  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Реакционные смеси для каждого из ферментов содержали следующие компоненты.

**Глюкозо-6-фосфатДГ:** 100 мМ Трис-Cl (pH 7.8), 5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 1.25 мМ глюкозо-6-фосфат, 0.1 мМ НАДФ, проба. Контроль не содержал глюкозо-6-фосфат или НАДФ.

**Фосфоглюкомутаза:** 100 мМ Трис-Cl (pH 7.8), 5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 1 мМ глюкозо-1-фосфат (содержащий приблизительно 1% глюкозо-1,6-бифосфата), 0.5 мМ НАДФ, 0.4 ед./мл активности глюкозо-6-фосфатДГ, проба. Контроль не содержал глюкозо-1-фосфат.

**Гексокиназа:** 100 мМ Трис-Cl (pH 7.8), 5 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 1 мМ глюкоза, 1 мМ АТФ или 1 мМ пирогосфат-Na ( $\text{PP}_i$ ), 0.5 мМ НАДФ, 0.4 ед./мл активности глюкозо-6-фосфатДГ, проба. Контроль не содержал глюкозу или АТФ ( $\text{PP}_i$ ).

**Фосфоглюкоизомераза:** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ фруктозо-6-фосфат, 0.5 мМ НАДФ, 0.4 ед./мл активности глюкозо-6-фосфатДГ, проба. Контроль не содержал фруктозо-6-фосфат.

**Фосфофруктокиназа:** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 5 мМ К-фосфат (рН 7.0), 5мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ фруктозо-6-фосфат, 1 мМ АТФ, 1 мМ НАД, 2 ед./мл активности альдозазы, 1.5 ед./мл активности глицеральдегид-3-фосфатДГ, проба. Контроль не содержал фруктозо-6-фосфат или АТФ.

**3-фосфоглицераткиназа:** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 5мМ MgSO<sub>4</sub>, 2 мМ 3-фосфоглицерат, 1 мМ АТФ, 0.125 мМ НАДН, 1.5 ед./мл активности глицеральдегид-3-фосфатДГ, проба. Контроль не содержал 3-фосфоглицерат или АТФ.

**Пируваткиназа:** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 100 мМ КСl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ фосфо(енол)пируват (ФЕП), 1 мМ АДФ, 0.125 мМ НАДН, 0.5 ед./мл активности лактатДГ, проба. Контроль не содержал пробу или ФЕП или АДФ.

**Глицерол-3-фосфатДГ:** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 1 мМ глицерол-3-фосфат, 0.5 мМ НАД, проба. Контроль не содержал α-глицерофосфат или НАД.

**АТФ-аза.** 100 мМ Трис-Сl (рН 7.8), 100 мМ КСl, 5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ АТФ, 1 мМ ФЕП, 1 мМ АТФ, 0.125 мМ НАДН, 0.5 ед./мл активности пируваткиназы и лактатДГ, проба. Контроль не содержал АТФ или пробу.

### **1.2.2. Тестирование активности ферментов катаболизма трегалозы в спорах *P. grylli*.**

**Трегалаза и фосфорилаза трегалозы (прямая реакция).** Очищенные споры (около 300 мкл) осадка ресуспендировали в 1.5 мл раствора содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 1 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>, 1мМ 2-МЭ (2-меркаптоэтанол), 1 мМ ФМСФ (фенилметилсульфонидфторид) и разрушали встряхиванием в присутствии стеклянных бус. Для солюбилизации мембран к гомогенату добавляли до 0.5% детергент Тритон Х-100, инкубировали в

течении 10 мин и центрифугировали 10 мин при 16000 g. С целью удаления нуклеиновых кислот и нуклеопротеиновых комплексов к супернатанту после центрифугирования добавляли сухой  $MnSO_4$  до конечной концентрации 60 mM и через 15 мин инкубации повторяли центрифугирование. К супернатанту после осаждения нуклеиновых кислот при постоянном перемешивании мелкими порциями добавляли сухой сульфат аммония (СА) до концентрации 35 %. После добавления последней порции СА инкубацию продолжали еще 15 мин и белки осаждали центрифугированием при тех же условиях. Супернатант использовали для дальнейшего фракционирования высаливаемых белков увеличивая концентрацию СА до 75% и затем до 100 %. pH контролировали с помощью лакмусовой бумажки и поддерживали добавлением 1 M раствора раствора Трис. Все операции и хранение осадков полученных при фракционировании белков СА осуществляли при 4°C.

Активность трегалазы и фосфорилазы трегалозы (прямая реакция) тестировали в осадках после осаждения белков СА. Осадки ресуспендировали в 10 mM Трис-HCl (pH7.8) непосредственно перед добавлением в реакционную смесь содержащую 50 mM Na-фосфат, 100 mM трегалозу (pH 7.0) или 50 mM Na-ацетат, 50 mM Na-фосфат, 100 mM трегалозу (pH 5.0). Реакцию проводили в течении 20 часов при 30°C после чего белки удаляли кипячением проб на водяной бане в течении 10 мин с последующим центрифугированием. Содержание глюкозы и глюкозо-1-фосфата в пробах определяли энзиматическим методом с использованием препаратов глюкозо-6-фосфатДГ, гексокиназы и фосфоглюкомутазы в качестве вспомогательных ферментов.

**Фосфорилаза трегалозы (обратная реакция).** Очищенные споры *P. grylli* разрушали в плотном стеклянном гомогенизаторе в присутствии 50 mM MOPS (3-морфолинопропансульфоновая кислота) -NaOH, 4 mM ЭДТА- $Na_2$  и 2 mM 2-МЭ (pH 6.6). Гомогенат центрифугировали при 16000 g 10 мин и часть супернатанта сразу использовали для тестирования активности

фосфорилазы трегалозы. Активность фермента тестировали и в осадке ресуспендированном в объеме буфера для гомогенизации равном объему супернатанта. Остаток супернатанта тщательно диализовали против 10 мМ MOPS-NaOH (pH 6.6) и также использовали для измерения фосфорилазы трегалозы. Разрушение спор, хранение и центрифугирование гомогенатов, а также диализ осуществляли при 4°C. Реакционная смесь содержала 50 мМ MOPS-NaOH (pH 6.6), 200 мМ глюкозу, 20 мМ глюкозо-1-фосфат и приблизительно 160 мкг белка супернатанта (или равный объем ресуспендированного осадка). Конечный объем реакционной смеси составлял 1 мл. Контроль не содержал глюкозу. Реакцию проводили в течении 2 часов при 30°C. Белки удаляли добавлением хлорной кислоты до 2.5 % с последующим центрифугированием и нейтрализацией супернатанта добавлением 30% КОН. Неорганический фосфат определяли по методу Ратбуна и Бетлах с использованием молибдата аммония и хлористого олова (Северин и др., 1989).

### **1.2.3. Пируват-метаболизирующая активность в спорах микроспоридий.**

В первом эксперименте по тестированию активности очищенные споры *P. grylli* разрушали встряхиванием в течение 30 мин при 4°C на вортексе со стеклянными бусами в 50 мМ Трис-Cl буфере (pH 8.0), содержащем 0.5 мМ ФМСФ, 0.5 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub> и 0.5 мМ 2-МЭ. Для последующих экспериментов, связанных с дифференциальным центрифугированием или обессоливанием гомогената, споры разрушали в растворе ТС (50 мМ Трис-Cl (pH 8.0), 0.25 М сахароза). Пируват-метаболизирующую активность в спорах измеряли по снижению концентрации пирувата в реакционной смеси, содержащей пробу, 25 мМ К-фосфатный буфер (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ пируват-Na<sub>2</sub>. Контрольная смесь не содержала белка микроспоридий. Реакцию проводили 16 часов при комнатной температуре или 1 час при 30°C, белки денатурировали кипячением 10 мин споследующим удалением

денатурированного материала центрифугированием. Содержание пирувата в супернатанте измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм с использованием препарата лактатДГ. Смесь содержала 50 мМ Трис-Cl (рН 7.5), 1.3 мМ НАДН, 3ед./мл лактатДГ и аликвоту супернатанта.

#### **1.2.4. Определение содержания запасных веществ и субстратов энергетического обмена в жировом теле сверчков, а также клетках и спорах микроспоридий.**

**Гликоген.** Жировое тело контрольных и зараженных личинок сверчков последнего возраста взвешивали и гликоген экстрагировали кипячением в 30% КОН. Нерастворенный материал удаляли центрифугированием, а гликоген осаждали добавлением 1.2 объемов 96% этанола, переосаждали, осадок высушивали и гидролизовали в 0.6 н HCl. В нейтрализованном растворе определяли концентрацию глюкозы энзиматическим методом с использованием препаратов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатДГ.

**Липиды.** Липиды экстрагировали по методу Фолча (Северин и др., 1989) и после выпаривания растворителя определяли конечную массу экстракта. Экстракт разводили хлороформом и хроматографировали на пластинках с силикагелем G в системе гексан/этиловый эфир/ледяная уксусная кислота в соотношении 90/20/1. Проявление пластинок проводили с парами йода. В качестве свидетеля использовали липидные экстракты свиного сала и митохондрий быка.

**Субстраты энергетического обмена.** Поскольку зараженное жировое тело содержит значительное количество стадий и тяжелых спор микроспоридий концентрацию субстратов определяли в гомогенате жирового тела после осаждения паразитов. С этой целью отпрепарированные жировые тела промывали в ФСБ и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе тefлоновым пестиком в том же растворе. Гомогенат центрифугировали при 300 g 5 мин и к супернатанту добавляли хлорную

кислоту до 5%. Все операции проводили быстро и при 0°C. Полученные безбелковые экстракты нейтрализовали КОН и использовали для определения концентрации субстратов. Содержание всех субстратов измеряли энзиматическим методом. В качестве вспомогательных ферментов использовали: глюкозо-6-фосфатДГ в случае определения **глюкозо-6-фосфата**, гексокиназу и глюкозо-6-фосфатДГ в случае определения **свободной глюкозы** и **АТФ**, ЛДГ при определении **пирувата**, пируваткиназу и лактатДГ при определении концентрации **АДФ**. Содержание компонентов в реакционной смеси была идентичной указанной выше для каждого фермента. Содержание субстратов рассчитывали в нмолях на мг белка в супернатанте после осаждения паразитов.

**Анализ содержания трегалозы и глюкозы в спорах *P. grylli* с помощью бумажной хроматографии.** С целью определения содержания трегалозы и глюкозы в спорах методом бумажной хроматографии, 50 мкл осадка свежевыделенных спор были последовательно инкубированы в растворах для стимуляции экстрезии 1,2 и ресуспендированы в 150 мкл раствора 3. После выброса полярных трубок (эффективность экстрезии 70-80%) споры были дополнительно разрушены встряхиванием со стеклянными бусами при 4°C. Одновременно, аналогичному разрушению были подвергнуты такие же объемы (50 мкл) осадков интактных (не подвергнутых стимуляции экстрезии) свежевыделенных спор, а также интактных спор после различных сроков хранения, ресуспендированных в 150 мкл воды. Белки и нерастворимый дебрис удаляли кипячением на водяной бане в течение 10 мин с последующим центрифугированием при 16000g 10 мин и 6 мкл супернатанта наносили на хроматографическую бумагу. В качестве стандартов наносили 0.4 мкмоль глюкозы и 0.8 мкмоль трегалозы. Разделение проводили в течение ночи в системе изопропанол : вода (4:1), повторяя процедуру три раза после высушивания бумаги. Специфичную окраску на углеводы проводили с использованием нитрата серебра и

гидроксида натрия (Досон и др., 1991). Содержание свободной глюкозы в пробах дополнительно определяли энзиматическим методом с использованием препаратов глюкозо-6-фосфатДГ и гексокиназы.

### **1.3. Молекулярно-биологические методы, использованные для поиска АТФ/АДФ-переносчиков микроспоридии *P. grylli*.**

#### **1.3.1. Выделение геномной ДНК из спор микроспоридий.**

Споры разрушали встряхиванием на вортексе со стеклянными бусами в течение 30 мин в ФСБ при комнатной температуре с добавлением протеиназы К (100 мкг/мл), 0.5% ДСН. ДНК последовательно экстрагировали равным объемом фенола, хлороформа и осаждали после добавления 1/10 объема 3 М ацетата-Na (рН 5.2) и 3 объемов 96% этанола. Осадки ресуспендировали в буфере ТЕ (10 мМ Трис-Cl (рН 7.5), 1 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>), инкубировали 1 час при 37°C в присутствии РНКазы А (0.05 мг/мл) для удаления примесей РНК, повторно экстрагировали фенолом и хлороформом и осаждали с помощью этанола (Манитатис и др., 1984). Подсушенные осадки растворяли в воде и хранили при -20°C.

#### **1.3.2. Саузерн-гибридизация геномной ДНК с радиоактивно мечеными фрагментами генов.**

Фрагментированную с помощью различных ферментов рестрикции ДНК разделяли в 1% агарозном геле, переносили на нейлоновую мембрану Hybond-NX (Amersham, США) и пришивали к фильтру с помощью ультрафиолета. После блокирования 1 час при 42°C в присутствии 25% формамида, 1% саркозила, 2% денатурированной ДНК спермы лосося к раствору добавляли радиоактивно меченую пробу и инкубацию продолжали в течение ночи. Мембрану трижды отмывали 2X буфером SSPE в присутствии 0.5% саркозила при 42°C или 50°C и анализировали с

помощью автордиографии. Пробы генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики *Chlamydia trachomatis*, *Arabidopsis thaliana* и *E. cuniculi* любезно предоставлены профессором Г. Лакином (Бордо, Франция). Мечение фрагментов ДНК радиоактивным  $^{32}\text{P}$  осуществлено с помощью общепринятой методики (Feinberg, Vogelstein, 1984).

### **1.3.3. ПЦР-амплификация фрагментов генов с помощью вырожденных праймеров.**

Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 50 мкл содержала 50 нг геномной ДНК *P. grylli*, 67 mM Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 16.6 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3 mM каждого дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфата), 5 мкл раствора прямого праймера F (5'GCNGA(A/G)(A/C/T)TNTGGGG3') с концентрацией 8.7 ед. оптической плотности при 260 нм и длине оптического пути 1 см, 10 мкл одного из двух обратных праймеров R1 (5'(C/T)TTNCCNA(G/A)(C/T)TTNCC3', 5.2 ед. опт. пл.) и R2 (5'CCNA(A/G/T)N(G/C)(A/T)(C/T)TTNCC3' 6.0 ед. опт. пл.) и 2.5 ед. *Taq*-полимеразы DNA polymerase (Силекс, Россия). Матрицу денатурировали 3 мин при 94°C, и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов каждый из которых включал денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг в мягких условиях (42°C, 30 сек) и синтез при 72°C в течение 40 сек. Продукты реакции разделяли в 1.6% агарозном геле. Фрагменты размером около 900 п.н. выделяли с помощью набора DNA extraction Kit (Fermentas, Литва), клонировали с использованием набора InsT/A clone<sup>TM</sup> PCR Product Cloning Kit того же производителя и секвенировали с использованием секвенатора ABI PRISM 310.

### **1.3.4. Выделение полноразмерной копии гена.**

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 *Hind*III/*Hind*III, выявленного с помощью Саузерн-гибридизации. ДНК была экстрагирована из геля с помощью технологии GENECLAN<sup>®</sup> (Vogelstein, Gillespie, 1979) и встроена в вектор pBluescript II KS+ (Stratagene, США) по сайту *Hind*III. Скрининг полученной библиотеки с помощью гибридизации бактериальных колоний с <sup>32</sup>P-меченым фрагментом гена согласно стандартному протоколу (Маниатис и др., 1984) использован для изоляции полноразмерной копии гена. Расшифрованная последовательность депонирована в банке генетической информации EMBL (AJ868111).

#### **1.4. Методы гетерологичной экспрессии генов микроспоридии *P. locustae*.**

##### **1.4.1. Компьютерный анализ генов.**

Последовательности изучаемых генов микроспоридии *P. locustae* находятся в свободном доступе на сайте <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). Последовательности гомологичных белков других видов микроспоридий находятся на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Последовательности анализировали с помощью пакета программ для молекулярной биологии DNASTAR<sup>®</sup> Lasergene 5.05. Наличие сигнального пептида в составе белковых молекул предсказывали с помощью серверов SignalP 4.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), SIG-Pred ([http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/prot\\_analysis/Signal.html](http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html)), PrediSi (<http://www.predisi.de/index.html>) и Signal-3D

(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>). Наличие гидрофобных трансмембранных доменов в составе белков оценивали с помощью сервера ТМНММ 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)).

#### **1.4.2. ПЦР-амплификация генов микроспоридии *P. locustae*.**

Геномную ДНК *P. locustae* выделяли из очищенных зрелых спор согласно методике, описанной выше для ДНК микроспоридии *P. grylli*. Полимеразную цепную реакцию осуществляли с помощью ДНК-амплификатора «Терцик» (ДНК-технологии, Россия) в 20 мкл реакционной смеси. Реакционная смесь содержала 0.5 мкг геномной ДНК микроспоридий, 67 mM Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль соответствующих праймеров и 0.5 ед. высокоточной *Pfu*-полимеразы (Fermentas, Литва). Список праймеров представлен в главе 3 (Табл. 10). Матрицу денатурировали 3 мин при 94°C, и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов каждый из которых включал денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг (58°C, 30 сек) и синтез при 72°C. Время синтеза было различным в зависимости от размера амплифицируемого фрагмента и средней скорости синтеза ДНК *Pfu*-полимеразой (около 500 нуклеотидов/мин).

#### **1.4.3. Создание генетических конструкций для экспрессии генов микроспоридий в бактериях *E. coli*.**

ПЦР-амплифицированные продукты обрабатывали рестриктазами, чьи сайты были добавлены к 5'-концам праймеров или присутствовали в белок-кодирующей последовательности и встраивали в виде полноразмерных копий генов или их фрагментов в вектор pRSET (Life Technologies, США), специально созданный для гетерологичной экспрессии белков в бактериальных клетках *E. coli*. Более подробно стратегия создания конструкций для экспрессии каждого гена изложена в главах 3 и 5 при

описании результатов исследований. Полученные конструкции проверены с помощью секвенирования около 600 нуклеотидов ниже промотора T7, встроенного в вектор pRSET.

#### **1.4.4. Гетерологичная экспрессия генов *P. locustae* в клетках *E. coli* и очистка рекомбинантных белков.**

Экспрессию осуществляли в C41 и C43 штаммах *E. coli*, созданных для эффективной наработки белков на основе клеток BL21(DE3) (Miroux, Walker, 1996). Свежие колонии бактерий, трансформированных полученными конструкциями, инокулировали в среду LB, содержащую ампицилин (100мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C без добавления или с добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в качестве индуктора экспрессии. В последнем случае культуру растили до оптической плотности 0.6 (измерение при длине волны 600 нм) и добавляли в среду ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Бактерий осаждали центрифугированием при 3000 g 10 мин, отмывали дистиллированной водой и разрушали на льду ультразвуком в 50 мМ Трис-Cl буфере (pH 8.0). Эффективность экспрессии и присутствие белков в растворимой и нерастворимой фракциях оценивали методом электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГЭ) после центрифугирования разрушенных бактерий при различных режимах. Рекомбинантные белки, накапливающиеся в бактериальных клетках в виде нерастворимых белковых включений, осаждали при 1500 g 10 мин, тщательно отмывали тем же раствором в присутствии 0.5% Тритона X-100 и экстрагировали раствором 8М мочевины на 50 мМ Трис-Cl буфере, удаляя нерастворенный дебрис центрифугированием при 14000 g 5 мин. Длительное хранение рекомбинантных белков при -20°C осуществляли в виде очищенных белковых включений в нерастворимом виде на стадии предшествующей добавлению 8М мочевины.

В случае накопления гетерологичных белков в цитоплазме *E. coli* в растворимой форме, гомогенат после разрушения бактерий ультразвуком центрифугировали при 18000 g в течение 10 минут. Далее к супернатанту добавляли 10 mM имидазол, 0.3 M NaCl (конечные концентрации) и 1/10 объема смолы Ni-CAM<sup>TM</sup> HC Resin (Sigma-Aldrich, США), уравновешенной 50 mM Трис-HCl буфером (pH 8.0), содержащим 0.3 M NaCl, 10 mM имидазол. После мягкого перемешивания в течение ночи при 4°C, смолу тщательно отмывали раствором для уравновешивания и рекомбинантный продукт элюировали тем же раствором с концентрацией имидазола 0.25 M.

#### **1.4.5. Гетерологичная экспрессия белков микроспоридий в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*.**

Процедура создание конструкций на основе вектора pPIC3.5 (Life Technologies, США) и фрагментов ДНК, кодирующих полноразмерные формы двух белков, содержащих обогащенные лейцином повторы, микроспоридии *P. locustae* описана в главе 5. Полученные плазмиды линеаризовали с помощью рестриктазы *SacI* и дополнительно очищали с помощью стандартной экстракции фенолом и хлороформом с последующим переосаждением ДНК в присутствии этанола. Трансформацию дрожжевых клеток осуществляли методом электропорации с использованием прибора Electroporator 2510 (Eppendorf, Германия). После электропорации клетки незамедлительно ресуспендировали в 1 M сорбитоле и высевали на чашки с твердой минимальной средой MD, содержащей агар, 1.34% YNB (азот-содержащая основа для дрожжей),  $4 \times 10^{-5}$ % биотин, 2% глюкозу и инкубировали в течение 2 дней при 28°C. Отобранные на минимальной среде колонии дополнительно проверяли на наличие конструкций, встроенных в дрожжевой геном, методом ПЦР с праймерами, специфичными для каждого гена (Ling et al., 1995). ПЦР-позитивные колонии инокулировали в среду BMGY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 0.1 M К-

фосфатный буфер (рН 6.0), 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % биотин, 1% глицерин) и культивировали при интенсивном перемешивании в течение 2 дней при 28°C. После этого клетки осаждали центрифугированием при 1200 g 10 мин, переносили в среду ВММУ (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 0.1 М К-фосфатный буфер (рН 6.0), 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % биотин, 0.5% метанол) и культивировали еще 2 дня при тех же условиях. Осажденные центрифугированием клетки и культуральная среда, сконцентрированная приблизительно в 50 раз с помощью центрифужных концентраторов (Millipore, США), были проанализированы с помощью ДСН-ПААГЭ и иммуноблотинга (см. ниже п. 1.5.2.).

## **1.5. Иммунохимические и иммуноцитохимические методы анализа белков микроспоридий.**

### **1.5.1. Получение и очистка антител к рекомбинантным белкам.**

Белки специфично экстрагированные из нерастворимых белковых включений с помощью 8М мочевины разводили в 10 раз буфером для разрушения (50 мМ Трис-Cl (рН8.0)), смешивали с равным объемом адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) (полный для первой инъекции и неполный для последующих) и использовали для иммунизации.

Белки очищенные методом металло-хелатной аффинной хроматографии диализовали против трис-солевого буферного раствора (ТСБ), содержащего 50 мМ Tris-Cl (рН 7.4) и 150 мМ NaCl, перед смешиванием с адьювантом. Животных иммунизировали с помощью четырех внутримышечных инъекций (около 0.3 мг белка на одну инъекцию в случае иммунизации кроликов и 0.07 мг белка при иммунизации мышей) с десятидневным интервалом. Через 10 дней после последней иммунизации было отобрано 15 мл крови у иммунизированных кроликов и 0.5 мл у мышей для последующего анализа.

Для очистки специфичных антител, около 0.5 мг рекомбинантного белка разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ в 12% геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану согласно инструкции изготовителя оборудования для электропереноса белков (Bio-Rad, США) и окрашивали с помощью красителя Понсо С. Полосу мембраны, соответствующую перенесенному рекомбинантному белку аккуратно вырезали, отмывали ТТСБ (ТСБ и 0.05% Tween-20), блокировали 1 час при комнатной температуре в ТТБС в присутствии 1% БСА (бычьего сывороточного альбумина) и инкубировали с 50 мл иммунной сывороткой, разведенной 1:100 в ТТБС. После инкубации в течение 12 часов при 4°C сыворотку меняли на свежеразведенную и процедуру повторяли еще 3 раза. После тщательной отмывки мембран ТТБС и затем ТБС антитела элюировали в 250 мкл 0.2 М глицин-Cl (pH 2.5), нейтрализовали добавлением 15 мкл 1М Трис (нетитрованного) и 2.5 мкл 5М NaCl. Элюцию повторяли несколько раз, фракции объединяли, концентрировали с помощью концентратора Microcon<sup>®</sup> (Millipore, США) и очищенные антитела хранили при -20°C в присутствии БСА (1мг/мл) и 50% глицерина.

### **1.5.2. ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинг.**

Пробы белков смешивали с равным объемом 125 mM Трис-Cl буфера содержащего 4% ДСН, 10 % 2-МЭ, 20 % глицерин и инкубировали в течение 10 мин при 95°C. Белки разделяли методом ДСН-ПААГЭ (Laemmly, 1970) в 12% геле с использованием камеры Mini-PROTEAN<sup>®</sup> (Bio-Rad, США), окрашивали с помощью красителя Кумасси R-250. Для иммуноблоттинга разделенные в геле белки переносили на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot<sup>®</sup> согласно инструкции. Мембраны блокировали 1 час в присутствии ТТСБ с 1% БСА и инкубировали с разбавленными тем же раствором иммунными сыворотками и очищенными антителами в течение

ночи при 4°C или 2 часа при комнатной температуре. После отмывки ТТСБ мембраны инкубировали 2 часа при комнатной температуре с разведенными тем же раствором 1:4000 вторыми антителами, специфичными к IgG кролика или мыши и конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). После очередной отмывки ТТСБ мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции содержащем ТТСБ, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich, США), 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **1.5.3. Иммунофлюоресцентная микроскопия.**

Для иммунофлюоресцентного анализа (ИФА) стадий внутриклеточного развития микроспоридии *P. locustae* зараженные жировые тела саранчи мягко разрушали в стеклянном гомогенизаторе тефлоновым пестиком в присутствии ФСБ и помещали на покрытые полилизинном покровные стекла. Стадии внутриклеточного развития (меронты, споронты) фиксировали на стеклах 15 мин в присутствии 4% параформальдегида, отмывали ФСБ и покрывали 5% желатиной. Клетки пермеабелизовали инкубируя в блокирующем ФСБ, содержащем 0.1% Тритон X-100, 50 мМ NaCl, 0.5% БСА, в течение 1 часа. В случае иммунофлюоресцентного анализа клеток жирового тела саранчи, зараженного микроспоридией *P. locustae*, отпрепарированную ткань незамедлительно фиксировали в ФСБ, содержащем 4% параформальдегид, отмывали ФСБ, содержащем 50 мМ глицин, инкубировали в 30% растворе сахарозы, использованном в качестве криопротектора, и замораживали в жидком азоте. Замороженные срезы толщиной 10 мкм приготовлены с использованием криотома Microm HM 520 (Microm International GmbH Германия) и помещены на предметные микроскопические стекла.

Полученные препараты блокировали 1 час при комнатной температуре в присутствии ТТСБ с 1% БСА и инкубировали с очищенными антителами,

разбавленными 1:50 в блокирующем растворе в течение ночи при 4°C или 2 часа при комнатной температуре. После качественной отмывки в ТТСБ клетки обрабатывали вторыми антителами против иммуноглобулинов кролика или мыши, конъюгированными с флуоресцентными красителями Alexa Fluor 546 и Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США). Коммерческие антитела разводили 1:50 в блокирующем растворе. В случае ко-локализации  $\alpha/\beta$ -гидролазы и гексокиназы *P. locustae* с молекулярным шапероном семейства Hsp70 паразита (см. главу 5) антитела против последнего белка получали в мышах. При этом антитела к гексокиназе и  $\alpha/\beta$ -гидролазе получены в кроликах. После тщательной отмывки стекла инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре соответственно с конъюгатами Alexa Fluor 488 Anti-Mouse IgG и Alexa Fluor 546 Anti-Rabbit IgG (Life Technologies, США), разведенными 1:50 в блокирующем растворе. Ядра клеток жирового тела саранчи красили с помощью красителя 4',6-диамино-2-фенилиндола (ДАФИ). Обработанные антителами препараты заключали в Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, США) и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager M1 (Carl Zeiss, Германия).

#### **1.5.4. Иммуноэлектронная микроскопия криосрезов.**

Отпрепарированные кусочки зараженной ткани (жирового тела) насекомых или зрелые споры микроспоридий фиксировали смесью 4% параформальдегида и 1 % глутарового альдегида на буфере РНЕМ (60 мМ PIPES, 25 мМ HEPES, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ЭДТА, pH 7.4) и отмывали тем же буфером. Пробы заключали в 10% желатин, охлаждали на льду и резали на блоки размером 1 мм<sup>3</sup> в холодной комнате. Блоки вымачивали в растворе 2.3 М сахарозы при 4°C в течение 2 часов и замораживали в жидком азоте. 45-60-нм криосрезы получали при -120°C на ультракриотоме Ultracut R/FCS (Leica, Италия), оснащенном алмазным ножом и антистатическим

оборудованием (Diatome, Швейцария). Ультратонкие криосрезы собирали в раствор 1,8% метилцеллюлозы и 2.3 М сахарозы (1:1), помещали на медные сетки, покрытые формвар-углеродной подложкой и последовательно инкубировали с очищенными антителами против белков микроспоридий, разведенными 1:100 в ФСБ с 0.1% БСА-с (Aurion, Нидерланды), а затем с белком А, конъюгированным с коллоидным золотом (Slot, Geuze, 1985), как было описано ранее (Beznoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011). Двойное мечение с использованием частиц коллоидного золота разного размера проводили, как описано в литературе (Slot, Geuze, 1985; Webster, 1999). С целью повышения специфичности двойного мечения после обработки первыми антителами и белком А срезы дополнительно фиксировали 1% глутаровым альдегидом в течение 5 мин, отмывали 0.12% раствором глицина, блокировали в ФСБ с 0.01% БСА-с, как рекомендовано в литературе (Webster, 1999).

После мечения срезы обрабатывали 1% глутаровым альдегидом, контрастировали уранил ацетатом, заключали в раствор метил целлюлозы и уранил ацетата, как описано в литературных источниках (Slot et al., 1991). Автоматический анализ срезов проводили на электронном микроскопе Tecnaï 20 (FEI/Philips Electron Optics, Нидерланды) при 200 кV, оборудованном медленно сканирующей ПЗС (прибор с зарядовой связью) - камерой.

## **1.6. Методы ультраструктурного и биохимического анализа секреторного аппарата микроспоридий.**

### **1.6.1. Приготовление образцов и электронная микроскопия.**

Процедуры предварительной (до фиксации) обработки клеток паразита и насекомого-хозяина тетрафлюоридом алюминия ( $\text{AlF}_4$ ) и N-этилмалеимидом (NEM) с целью ингибирования процессов внутриклеточного транспорта приведены в главе 4 при описании

соответствующих результатов. Метод ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением (McIntosh, 2001) любезно выполнен проф. Мироновым А. А.

Фиксация, осмирование и заключение в эпоксидную смолу Epon 812 (Sigma-Aldrich, США) проводили следующим образом: ткани фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида на 0,2 М буфере HEPES pH 7,2-7,4, а затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со смесью 2% тетраоксида осмия и 3% ферроцианида калия в пропорции 1:1 на 0.2 М какодилатном буфере pH 7.4, затем после 6-ти кратной промывки ФСБ, начинали дегидратацию. В спиртовых растворах возрастающей концентрации образцы находились по 10 минут с трехкратной сменой в 50%, 70%, 90% и 100% этаноле. Затем образцы инкубировались в течение 2 часов при комнатной температуре в смеси 100% этанола и эпоксидной смолы в пропорции 1:1, смесь удалялась с помощью пипетки и на 2-3 часа при комнатной температуре добавлялась эпоксидная смола, затем смола полимеризовалась в течение 24 часов в термостате при 60° С.

Для лучшей визуализации белков использовали 1% раствор таниновой кислоты. После стадии осмирования клетки отмывали 0,05М какодилатным буфером (pH 7,0) и добавляли свежеприготовленный раствор 1% раствор таниновой кислоты на 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,0) на 1 час. Затем отмывали тем же 0,05 М какодилатным буфером (pH 7,0), трижды раствором ФСБ и обезвоживали в спиртах. Далее следовала описанная выше процедура заключения в эпоксидные смолы. Для дополнительного усиления контраста уже после получения ультратонких срезов, данные срезы контрастировали раствором уранилацетата и цитрата свинца (Reynolds, 1963). Для улучшения контраста липидов мембран применяли метод, основанный на использовании 0,5 % раствора тиокарбоксихидразида (Seligman et al., 1966).

Полученный материал использовали для получения ультратонких срезов толщиной 60 нм с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Reichert 2E

(Reichert Jung, Германия) и анализировали с помощью электронного микроскопа Tecnai 20 (FEI/Philips Electron Optics, Нидерланды), как это описано в п. 1.5.4. При получении серийных срезов залитый в смолу материал использовали для приготовления  $40 \times 300$  мкм пирамидок с помощью стеклянного ножа. Далее с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме Reichert 2E изготавливали 25-35 серийных срезов толщиной 65 нм и переносили их на сетки размером  $2 \times 1.5$  мм (Electron Microscopy Sciences, США) покрытых Формвар / углеродной пленкой. Срезы также контрастировали раствором уранилацетата и цитрата свинца (Reynolds, 1963). Непрерывность секреторного аппарата микроспоридий прослеживали на последовательных срезах и изображения, полученные с помощью электронной микроскопии серийных срезов, совмещали с помощью программ IMOD и ImageJ.

### **1.6.2. Электронная томография.**

Толстые (толщиной 150-200 nm) серийные эпоновые срезы были изготовлены на ультратоме Leica Ultracut-UCT (Leica, Germany). Затем цепочка из 10-15 серийных срезов переносилась на покрытые формваром бленды. После высушивания на воздухе при комнатной температуре на срезы наносили протеин-А, конъюгированный с золотом диаметром 10 нм, разведенным на дистиллированной воде (1:25). Плотность мечения в среднем оставляла 1-2 гранул на  $100 \text{ nm}^2$ . Гранулы золота служили для компьютера маркерами одного и того же участка среза при сопоставлении и ориентации изображений. После окраски и высушивания сетка помещалась в держатель гониометра и затем на электронном микроскопе Tecnai 12 EM (FEI, Голландия), имеющим ускоряющее напряжение 120 кВ, осуществлялось центрирование оси вращения, после того как срез предварительно облучался 3-5 минут дефокусированным пучком электронов без диафрагмы, чтобы обеспечить предварительное равномерное выжигание

недополимеризированной смолы. Тогда срез оставался одинаковой толщины в процессе длительного облучения при заборе изображений. После "отжига" среза устанавливали диафрагму на обычное место.

Далее на основе критериев хорошей морфологической сохранности структур и метода случайных чисел на серийных срезах при увеличении 26,000X или 43,000X отбирались вертикальные срезы изучаемых структур с использованием системы поиска в составе программы "AnalySis". После выбора структуры начинали забор изображений, начиная с угла  $+70^\circ$  до  $-70^\circ$  наклона гониометра через каждый градус, чем достигалось высокое разрешение на томограмме, т.к. уровень разрешения также зависит от толщины среза (чем тоньше срез, тем лучше разрешение), от угла между проекциями (чем меньше угол, тем больше разрешение) и от увеличения (чем больше увеличение, тем лучше разрешение). В зависимости от целей эксперимента забирали изображения при увеличениях 26,000X, 43,000X, 60,000 и 83,000 X. Забрав всю серию изображений, т. е. 141 изображение, посылали их другой компьютер, содержащий программу для томографии IMOD. Компьютер, используя гранулы золота, выстраивал срезы точно по одной оси изображения, а после выстраивания срезов высчитывал оптическую плотность для каждой единицы объема нашей структуры, т.е. для каждого "вокселя". Результат вычисления компьютером мог быть представлен в виде виртуальных серийных срезов толщиной 2-3 нм, следовательно, формальное разрешение было 4-6 нм, что значительно превосходит разрешение на обычном ультратонком срезе (например, при толщине среза 60 нм разрешение составляет около 120 нм) Однако возможность анализа виртуальных серийных срезов вдоль всех трех осей (XYZ) позволила повысить уровень разрешения до 2-3 нм. Далее, получив виртуальные серийные срезы, мы использовали их для построения трехмерного изображения с использованием той же программы "IMOD".

Количественный анализ проведен для каждой отдельной томограммы. Для каждого эксперимента с применением томографии оценивались как минимум 5 томограмм для каждой временной точки эксперимента. Поверхность мембран аппарата Гольджи реконструировалась с помощью программы IMOD, доступной в сети Интернет.

### **1.6.3. Методы анализа особенностей гликозилирования белков микроспоридий.**

**Общую окраску на гликопротеины** после разделения белков методом ДСН-ПАГЭ проводили с помощью периодата и реагента Шиффа (Гааль и др., 1982). Гели после электрофореза фиксировали в течение ночи в 40%-ном этаноле в присутствии 5%-ной уксусной кислоты, переносили на 2 ч в раствор 0.7%-ного периодата и 5%-ной уксусной кислоты, затем на 2 ч в раствор 0.2%-ного метабисульфита натрия и 5%-ной уксусной кислоты. После этого гели инкубировали в течение ночи с реагентом Шиффа. Для его приготовления 1 г основного фуксина (розанилина) растворяли в 120 мл 0.17 М HCl с последующим добавлением 1.7 г метабисульфита натрия. После перемешивания в течение 15 мин смесь осветляли с помощью активированного угля, который удаляли центрифугированием.

**Иммуноблоттинг белков микроспоридии *P. grylli* и жирового тела сверчков с лектином WGA** осуществляли согласно протоколу, описанному в разделе 1.5.2, добавляя вместо антител лектин WGA, конъюгированный с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США), разведенный 1 : 500 в ТТБС, содержащем 0.5 % БСА.

**Обработке N-гликозидазой F** подвергали следующие белки спор микроспоридии *P. grylli*.

(1) Белки оболочки экстрагировали кипячением интактных спор в течение 10 мин в присутствии 0.1 М Трис-HCl (pH 8.0), 2 % ДСН и 5 % 2-МЭ. После осаждения спор центрифугированием супернатант разводили водой в 10 раз

и добавляли дополнительные компоненты с целью получения реакционной смеси, содержащей 0.1 М Трис-Cl (pH 8.0), 0.2 % ДСН, 0.5 % 2-МЭ, 10 мМ ЭДТА-Na<sub>2</sub>, 1 % Тритона X-100 и 5 ед./мл N-гликозидазы F (Roche, Германия).

(2) С целью высвобождения внутренних белков спор осуществлена стимуляция экструзии (выброса) полярных трубок по методике, приведенной в разделе 1.1 (Dolgikh, Semenov, 2003). После экструзии нерастворимый материал (выброшенные полярные трубки и оболочки спор) удаляли центрифугированием. К супернатанту добавляли различные компоненты для получения реакционной смеси того же состава, за исключением присутствия 170 мМ KCl, добавление которого было необходимо для стимуляции процесса экструзии.

(3) Осадок тщательно промывали 3%-ным раствором ДСН и белки полярной трубки избирательно экстрагировали в течение ночи в присутствии 50 % 2-МЭ (Dolgikh et al., 2005). После осаждения нерастворимого материала центрифугированием супернатант разводили водой в 10 раз и добавляли дополнительные компоненты с целью получения реакционной смеси того же состава, что и в случае белков оболочки. Единственным отличием данного раствора являлось более высокое содержание 2-МЭ (5 %).

Экстрагированные белки спор инкубировали в присутствии фермента N-гликозидазы F в течение ночи при 4 °С и реакционную смесь анализировали методом ДСН-ПАГЭ с последующей окраской белков красителем Кумасси R-250 (Reanal, Венгрия). Трансферин человека (Sigma, США) инкубировали при тех же условиях, что и экстрагированные белки оболочки, используя в качестве положительного контроля.

Для изучения возможности связывания основного белка оболочки спор *P. grylli* с GNA-агарозой интактные споры обрабатывали щелочно-солевым раствором, содержащим 10 мМ КОН и 170 мМ NaCl. После специфичной экстракции изучаемого белка (Dolgikh, Semenov, 2003) споры осаждали

центрифугированием и супернатант нейтрализовали добавлением 1/20 объема 1 М Na-фосфатного буфера (pH 6.0). Экстрагированный белок инкубировали в течение 3 ч при 37 °С в присутствии 2 ед./мл  $\alpha$ -маннозидазы (Sigma, США) или 2 ед./мл  $\beta$ -маннозидазы (ICN, США). Инкубацию контрольной пробы осуществляли без добавления фермента. После этого к 50 мкл каждой пробы добавляли от 12.5 до 100.0 мкл 50%-ной суспензии агарозных шариков, конъюгированных с лектином GNA (Sigma, США). Суспензию инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Предварительно GNA-агароза была уравновешена 50 мМ Na-фосфатным буфером (pH 6.0), содержащим 170 мМ NaCl. После инкубации агарозные шарики тщательно отмывали раствором, используемым для уравновешивания GNA-агарозы, и ресуспендировали в 50 мкл буфера, используемого при приготовлении проб для ДСН-ПАГЭ (0.06 М Трис-Cl, pH 8.0, 2 % ДСН, 5 % 2-МЭ и 10 % глицерин). Связавшиеся с лектином белки элюировали кипячением суспензии в течение 10 мин, осаждали агарозу центрифугированием и анализировали супернатант с помощью ДСН-ПАГЭ.

### **1.7. Анализ экспрессии генов в клетках микроспоридий.**

Общая РНК была выделена из стадий внутриклеточного развития и разрушенных стеклянными бусами спор микроспоридий с помощью реагента PureZOL (Bio-Rad, США) и очищена согласно инструкции производителя. К 200 мкл суспензии клеток содержащей  $3 \times 10^8$  клеток паразита добавляли 1 мл реагента, инкубировали 5 мин на льду и 5 мин при комнатной температуре. Очищенные споры микроспоридий разрушали в том же объеме реагента PureZOL встряхиванием со стеклянными бусами диаметром 2.5 мм (BDH, Великобритания). После добавления 0.2 мл хлороформа суспензию держали на льду еще 5 мин и центрифугировали 15 мин при 14000 g. К отобранной верхней фазе добавляли 0.8 мл изопропанола и после 5 мин инкубации на льду РНК осаждали центрифугированием при тех же условиях.

Осадок тщательно отмывали 75 % этанолом и растворяли в 50 мкл буфера содержащего (10 mM Трис-Cl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>). Примесь ДНК разрушали в присутствии 5 ед. ингибитора РНКазы и 5 ед. очищенной от РНКазы фермента ДНКазы I (Fermentas, Литва) в течение часа при 37°C. кДНК была синтезирована в 20 мкл раствора содержащего 2.5 мкг РНК, 10 mM Трис-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM каждого дНТФ, 0.75 опт ед./мл олиго-дТ в качестве затравки, 200 ед. MLV-обратной транскриптазы (ОТ) и 5ед. ингибитора РНКазы в течение часа при 37°C. ОТ инактивировали 5 мин при 95°C и использовали 1.6 мкл смеси для постановки ПЦР в 20 мкл смеси. Таким образом, в каждую пробирку добавляли количество кДНК синтезированное на 200 нг суммарной РНК. Реакционная смесь помимо кДНК содержала 67 mM Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль соответствующих праймеров и 2.5 ед. *Taq* ДНК полимеразы (Силекс, Россия). Матрицу денатурировали 3 мин при 94°C, и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов каждый из которых включал денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг (58°C, 30 сек) и синтез (72°C, 30 сек). В контроле в качестве матрицы использовали 1 мкг геномной ДНК (положительный контроль) или смесь для синтеза кДНК без добавления ОТ.

Праймеры, указанные в таблице 1, использованы для анализа экспрессии Sec31 субъединицы COPII, β' субъединицы COPI, синтаксин-подобного белка SFT семейства и SNARE-белка синаптобревина.

Поскольку эффективность ОТ-ПЦР снижалась с увеличением размера амплифицируемого фрагмента для протяженных генов размером более 2000 п.н. (Sec31, β-COP и β'-COP), были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать 3'-концевые фрагменты генов длиной около 400 пн (Таблица 1). Для анализа уровня экспрессии генов Sec13 субъединицы комплекса COPII и альтернативной оксидазы использованы праймеры, подобранные для гетерологичной экспрессии белков (Таблица 5).

Таблица 1

**Список праймеров, использованных для проведения ОТ-ПЦР.**

Белок	Размер гена (п.н.)	Нуклеотидная последовательность праймера**
Sec31	2622	прямой ggatccGATGATAAACAACGCTGCATCACAGC обратный gaattcAGCTGAGGGCGACCTGCAGAAGGG прямой (фрагмент 400 пн) GAGGTGCACGAAACGCCTC
$\beta$ -СОР	2424	прямой ggatccGATGGCAACGCTTTACATCGACGTG обратный gaattcAGTCCTTGAGACCTCGAAGTGTC прямой (фрагмент 401 пн) AACCGAGATGCACACGAAC
$\beta'$ -СОР	373*	прямой CAGAACACAAACAAGGCAA обратный ATTGTAGAACACCGTTCCTC
Синтаксин-подобный белок	528	прямой ggatccGATGAAATACAACACACTCGAAGAAGC обратный gaattcTATCTTCTAAGCATAAGACTTGC
Синаптобревин	273	прямой ggatccGATGGGAGACATAACGGACGCC обратный gaattcTТАСТТТТTGAAAAGAGTCACG

\* - указан размер амплифицированного фрагмента, полноразмерная копия гена не изучалась;

\*\* - строчными буквами в 5'-области ряда праймеров указаны добавленные сайты для ферментов рестрикции.

## **Глава 2. Особенности энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии.**

### **2.1. Состояние проблемы к началу исследований.**

#### **2.1.1. Зависимость микроспоридий от метаболической системы хозяина.**

Длительное время в научной литературе накапливались косвенные данные о глубокой зависимости микроспоридий, представляющих собой хорошо адаптированных к внутриклеточному развитию облигатных паразитов, от обменных процессов хозяина. Поскольку подавляющее число видов микроспоридий развивается в членистоногих, большинство данных получено при анализе энтомопатогенных видов и паразитов ракообразных.

Во-первых, было замечено медленное проявление воздействия микроспоридий на насекомых. При микроспоридиозах наблюдается не быстрое нарушение жизненных функций хозяина и его гибель, а постепенное истощение организма, снижение плодовитости, продолжительности жизни и т.п. (Мак-Лафлин, 1976). Это позволило предположить, что для развития микроспоридий необходимо активное функционирование метаболического аппарата хозяина. Во-вторых, были получены многочисленные данные о снижении плодовитости или о подавлении развития репродуктивной системы при микроспоридиозе почти у всех изученных видов насекомых (Frye, Olson, 1974; Windels et al., 1976; Алиханов, 1979; Селезнев и др., 1996). Этот результат и данные о снижении содержания резервных белков и липидов в зараженных клетках (Canning, 1962; Darwish et. al., 1989; Селезнев и др., 1996) позволили заключить, что отнятие у хозяина субстратов энергетического и пластического обмена играет важную роль в патогенезе, вызванном микрооспоридиями (Исси, 1986). В-третьих, было показано, что жировое тело и кишечник - органы, через которые проходят основные потоки питательных веществ (Гилмур,

1968; Тыщенко, 1976), относятся к наиболее часто инвазируемым при микроспоририозах. В-четвертых, была отмечена стимуляция ряда физиологических функций хозяина на ранних этапах заболевания или при слабом заражении: увеличение массы тела зараженных насекомых (Четкарева, 1979; Thompson, Sikorowski, 1979; Пушкарь, 1982), усиление газообмена и сердечных сокращений у зараженных диапаузирующих куколок капустной белянки до уровня активных насекомых (Метспалу, Хийесаар, 1984). Все это предполагало глубокую зависимость микроспориридий от метаболической системы хозяина.

### **2.1.2. Влияние микроспориридий на биохимические процессы в организме насекомого-хозяина.**

Несмотря на то, что данные об изменении биохимических показателей у хозяина при микроспоририозах немногочисленны, отрывочны и получены на разрозненном круге объектов, их анализ позволил сделать некоторые общие заключения.

В первую очередь, следует отметить повышение интенсивности окислительных процессов в организме хозяина при развитии паразитов. В ряде случаев было показано, что усиление дыхания сопровождалось увеличением числа и повышением функциональной активности митохондрий (Lewis et al., 1971; Метспалу, Хийесаар, 1984; Ефименко, 1989; Соколова, 1990). Усиление дыхания (выделение углекислоты, поглощение кислорода) наблюдалось при микроспоририозе кукурузного мотылька (Lewis et al., 1971), капустной белянки (Метспалу, Хийесаар, 1984), озимой совки (Ефименко, 1989; Соколова, 1990).

Кроме того, было замечено, что в организме хозяина наблюдается снижение содержания углеводов, жиров и аминокислот. У зараженных микроспориридиями куколок капустной белянки содержание гликогена снижалось в 2 раза, глюкозы в 3,3 раза по сравнению с контролем. На

более низком уровне находилось также содержание жиров и свободных аминокислот (Метспалу, Хийесаар, 1984). Содержание глюкозы в гемолимфе краба *Carcinus mediterraneus* при заражении микроспоридией *Thelohania maenadis* снижалось приблизительно в 3 раза. В мышцах (место развития микроспоридий) наблюдалось снижение в 5 раз содержания гликогена и увеличение в 4-5 раз содержания лактата. В то же время в гемолимфе не выявлено достоверных отличий от контроля в содержании ионов Na, K, Ca, Cl, общих липидов, фосфолипидов, триглицеридов и общих углеводов. Содержание всех форм липидов и общих углеводов было даже чуть выше по сравнению с контролем. Не обнаружено и изменения содержания АТФ в мышцах и гликогена в гепатопанкреасе крабов (Vivares, Cuiq, 1981). Заражение крабов микроспоридией не влияло также на процентное соотношение жирных кислот в мышцах и гемолимфе (Vivares et al., 1980c). Однако заражение раков *Austropotamobis pallipes* микроспоридией *Thelohania contejeani* вызывало увеличение содержания в мышцах и гепатопанкреасе насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот и снижение полиненасыщенных (Kabre, 1992). Снижение содержания липидов отмечено для саранчовых при заражении микроспоридией *N. locustae* (Canning, 1962), для гусениц совки *Trichoplusia ni* при заражении микроспоридией *Vairimorpha necatrix* (Darwish et al., 1989), а также при других мик; Vivares et al., 1980c респориидиозах насекомых. Содержание отдельных аминокислот в организме зараженного хозяина изменялось по-разному. Например, в гемолимфе краба *Carcinus mediterraneus* содержание глутамина и метионина при микроспориридизе снижалось в 2.5-3 раза. Менее значительно снижалось содержание пролина и валина, в то время как содержание цистеина, серина и еще 10 аминокислот возрастало (Vivares et al., 1980c).

Ряд работ был посвящен изменению активностей ферментов в организме хозяина при микроспориридиозах. У гусениц трех последних возрастов

капустной совки *Barathra brassicae* при заражении микроспоридией *Nosema plodiae* в кишечнике и жировом теле возрастала активность аланинаминотрансферазы на 90% по сравнению с контролем. рН -оптимум фермента соответствовал 8.0-8.5. Однако у контрольных насекомых, в отличие от зараженных, было обнаружено небольшое увеличение активности при рН 4.5 (Kucera, Weiser, 1973). В жировом теле и кишечнике гусениц *Barathra brassicae* и *Galleria mellonella* при заражении той же микроспоридией увеличивалась активность фосфатаз (Kucera, Weiser, 1974; Kucera, 1978). Изучение свойств кислой фосфатазы (рН-оптимум, влияние ионов Mg и Zn,  $K_m$ , электрофоретическая подвижность) позволило установить, что при заражении синтезируется (или активируется) новая специфичная форма фермента хозяина (Kucera, 1978). Активность лактатдегидрогеназы также увеличивалась в клетках кишечника и жирового тела гусениц капустной совки при микроспоридиозе в 1.5-2 раза. При этом в кишечнике активность увеличивалась несколько сильнее, чем в жировом теле (Kucera, 1975). Электрофорез изоферментов выявил 2 формы фермента у *Barathra brassicae* и 3 формы у *Galleria mellonella*. При этом установлено за счет какой формы происходит увеличение активности (Kucera, Weiser, 1975). Активность глутаматдегидрогеназы в кишечнике и жировом теле капустной совки, напротив, снижалась в 2 раза при заражении (Kucera, 1975). Исследованные в этих работах ферменты гусениц капустной совки были очищены методом электрофокусирования в градиенте плотности в 10-30 раз с целью определения величин  $K_m$ . При этом  $K_m$  для всех ферментов, за исключением кислой фосфатазы, при заражении не изменялись.  $K_m$  кислой фосфатазы снижалась при заражении вдвое в клетках кишечника, но не жирового тела (Kucera, 1976). Напротив, у личинок двукрылых при заражении микроспоридией *Amblyospora* sp. наблюдалось снижение активности кислой фосфатазы. Наиболее выражено снижалась активность в эпителии слюнных желез и жировом теле (Dvornik,

Ovchinnikov, 1992). Снижение активности кислой фосфатазы отмечено также в кишечнике капустной совки при заражении микроспоридией *Vairimorpha antheraeae* (Соколова, 1990). Электрофорез белков личинок мошек с последующей окраской на пероксидазу показал, что у контрольных личинок на предпоследней стадии выявляются три молекулярных формы фермента, в то время как у личинок последнего возраста - четыре. У зараженных микроспоридиями личинок пероксидаза в геле не выявлялась (Пушкарь, 1982). При заражении краба *Carcinus mediterraneus* микроспоридией *Thelohania maenadis* в мышцах происходило снижение активности лактатДГ приблизительно в полтора раза по сравнению с контролем (Vivares, Cuq, 1981).

Приведенные данные позволили заключить, что микроспоридии оказывают заметное и неоднозначное влияние на метаболические процессы в организме хозяина. Особое внимание следует обратить на то, что одни и те же биохимические показатели могут возрастать в одной паразито-хозяинной системе и снижаться в другой. Это может быть связано, с метаболическими особенностями различных видов паразитов или их хозяев.

### **2.1.3. Воздействие микроспоридий на зараженную клетку.**

В первую очередь следует отметить, что большинство микроспоридий развивается в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки хозяина без образования паразитофорной вакуоли. Это свойство, характерное для немногих внутриклеточных простейших, уже само по себе свидетельствует, что между клеткой паразита и цитоплазмой клетки хозяина устанавливаются тесные метаболические взаимоотношения. При этом для зараженных клеток отмечена большая продолжительность жизни (Vavra, 1976), уменьшение числа лизосом и снижение активности кислой фосфатазы (Соколова, 1990; Dvornik, Ovchinnikov, 1992). Развитие микроспоридий на стадии мерогонии сопровождается усилением целого ряда процессов в зараженной

клетке. В первую очередь следует отметить более активный синтез нуклеиновых кислот. Увеличение в размерах политенных хромосом при микроспориidioзе было отмечено для клеток слюнных желез двукрылых (Diaz, Pavan, 1965; Pavan, Basile, 1966). Например, суммарное количество ДНК в зараженных микроспоридиями клетках слюнных желез личинок *Rhynchosciara angelae* (Diptera) возрастает в геометрической прогрессии от 2 до 32 раз что, по-видимому, связано с прогрессивным удвоением материала хромосом (Roberts et al., 1967). Наряду с усиленной репликацией генома, микроспоридии вызывают также значительное усиление его экспрессии. Усиление транскрипционной активности выражается в возникновении пухов, а иногда и в генерализованном вздутии хромосом. (Roberts et al., 1967; Jurand et al., 1967; Diaz et al., 1969). Этот процесс сопровождается усиленным включением <sup>3</sup>H-уридина в РНК. Гипертрофия ядер и усиление в 3 раза включения предшественников в РНК обнаружено в париетальной мускулатуре двукрылых при заражении микроспоридией *Thelohania* sp. (Martins, Perondini, 1977). При этом в многоядерных мышечных волокнах наибольшее воздействие испытывали ядра, располагавшиеся рядом с микроспоридиями, в то время как в ядрах соседних клеток изменений не наблюдалось.

Глубокие изменения отмечены многими авторами и в цитоплазме зараженной клетки (Jurand et al., 1967; Sprague, Vernick, 1969; Liu, Davies, 1972; Calavati, Narasimhamurti, 1982; Toguebaye, Marchand, 1984; Canning et al., 1985; Соколова, 1990). Цитоплазма становится менее электронно-плотной и однородно гранулированной. Это, вероятно, связано с исчезновением включений, образуемых запасными питательными веществами, вследствие их потребления паразитами. С этим же, по-видимому, связано перераспределение протеиновых гранул в клетках жирового тела насекомых в зону цитоплазмы, окружающую микроспоридий, и снижение их числа на единицу объема. Паразиты часто окружаются

мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР). В дальнейшем содержание цистерн ЭПР и свободных рибосом в клетке хозяина снижается, в то время как цитоплазма самих микроспоридий обогащается ЭПР и рибосомами.

Особо следует остановиться на взаимоотношениях микроспоридий с митохондриями клетки хозяина. В инвазированной клетке наблюдается увеличение количества митохондрий на единицу объема, уменьшение их размера, изменение формы и расположения крист. Часто внутриклеточные стадии развития микроспоридий окружаются митохондриями вплоть до плотного контакта с цитоплазматической мембраной паразита. Это позволило предположить, что энергетический обмен микроспоридий находится в тесной интеграции с митохондриями хозяина (Durfort, Vallinitjana, 1982).

Приведенные в предыдущем разделе данные о воздействии микроспоридий на биохимические процессы хозяина (содержание различных соединений, активность ферментов) также можно рассматривать в качестве примера воздействия паразитов на инвазируемую клетку в том случае, если исследованная ткань служит местом их развития. На основании полученных данных о взаимоотношениях микроспоридий и хозяина на клеточном уровне можно заключить, что инвазированная клетка претерпевает значительные морфо-функциональные изменения, направленные на обеспечение развития паразитов.

На основании литературных данных, накопленных к началу данного исследования, в целом можно было предположить, что развитие микроспоридий во многом зависит от биохимических процессов хозяина. Однако оставалось неясным, насколько эффективно микроспоридии способны эксплуатировать метаболическую систему зараженной клетки и какова глубина этой зависимости. Одним из наиболее интересных и важных представлялся вопрос о том, обладают ли микроспоридии способностью

поглощать непосредственно АТФ из цитоплазмы зараженной клетки, паразитируя тем самым на ее энергетической системе. В пользу такого предположения свидетельствовали (1) данные о том, что добавление АТФ в среду для культивирования спороплазм микроспоридии *N. michaelis* поддерживает сохранение их структуры более длительное время (Weidner, Trager, 1973), (2) упомянутая выше тесная связь микроспоридий с митохондриями зараженной клетки (Durfort, Vallinitjana, 1982).

На первом этапе исследования был 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. Это позволило получить не прямые, но убедительные доказательства использования микроспоридиями АТФ зараженной клетки хозяина.

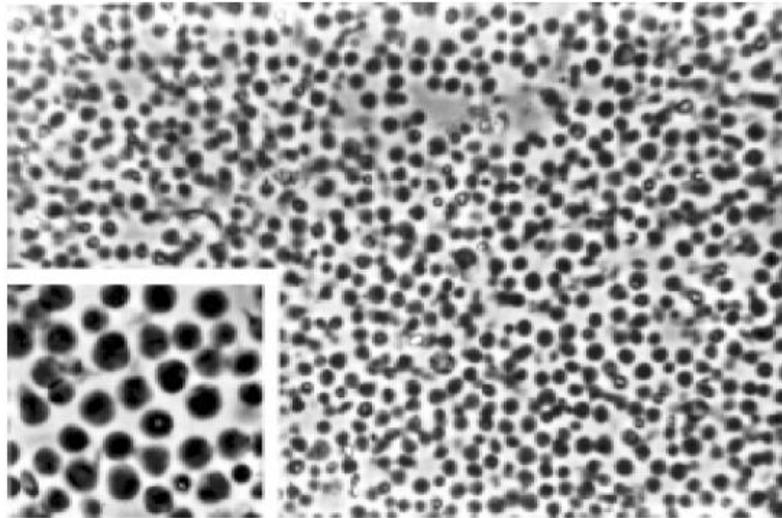
## **2.2. Биохимический анализ особенностей взаимодействия микроспоридий с энергетической системой зараженной клетки хозяина.**

На первом этапе исследования для получения доказательств зависимости микроспоридий от АТФ клетки насекомого-хозяина представляло интерес сравнить роль собственного метаболического аппарата этих паразитов в обеспечении энергией спор и стадий внутриклеточного развития. Ранее, при подготовке кандидатской диссертации, мы обнаружили активность ряда ферментов углеводного и энергетического обмена, включая ферменты гликолиза, в спорах микроспоридии *P. grylli* (Долгих и др., 1996; Dolgikh et al., 1997). Как уже отмечено в главе 1, данный вид паразитирует в жировом теле двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* (Соколова и др. 1994; Sokolova et al., 2003). Разработанная сотрудниками нашей группы схема очистки стадий внутриклеточного развития *P. grylli* с помощью

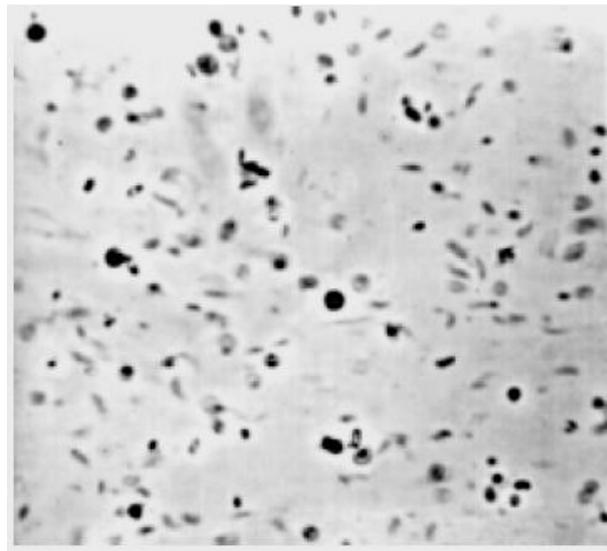
центрифугирования в градиенте плотности Перколла (Селезнев и др., 1994; Sokolova et al., 1994; Seleznev et al., 1995) позволила измерить активность ряда обнаруженных ферментов в меронтах и споронтах микроспоридий и сравнить с активностью, наблюдаемой в зрелых спорах.

### **2.2.1. Сравнительный анализ активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. grylli*.**

Измерение удельных активностей девяти ферментов углеводного и энергетического обмена в меронтах и споронтах микроспоридии *P. grylli* (Рисунок 1) и сравнение полученных результатов с активностью ферментов, наблюдаемой в зрелых спорах *P. grylli*, позволило получить интересный результат - активность большинства ферментов, включая ферменты гликолиза (фосфоглюкоизомеразы, фосфофруктокиназы, фосфоглицераткиназы и пируваткиназы), оказалась более низкой в активно пролиферирующих и развивающихся стадиях внутриклеточного развития паразитов, чем в спорах (Dolgikh, 2000; Weidner et al., 1999, Долгих и др., 2002). Активность гексокиназы - ключевого фермента гликолиза, находилась ниже границы чувствительности использованного метода тестирования, как в стадиях внутриклеточного развития, так и в спорах микроспоридий. Фосфоглюкомутаза и фосфофруктокиназа вообще не выявлялись в стадиях, в то время как в спорах была обнаружена достоверная активность обоих ферментов. Активность фермента фосфоглюкоизомеразы была ниже приблизительно в 50 раз в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий, чем в спорах. Более низкими приблизительно в 2 раза в пробах внутриклеточных стадий оказались и активности глюкозо-6-фосфатДГ, фосфоглицераткиназы и пируваткиназы. Активность глицерол-3-фосфатДГ достоверно не отличалась в спорах и стадиях, а активность АТФ-азы была выше в стадиях, чем в спорах (Таблица 2). Следует отметить, что



А



Б

**Рисунок 1. Очистка и разрушение меронтов и споронтов микроспоридии *P. grylli*.**

А - выделенные методом центрифугирования в градиенте плотности Перколла внутриклеточные стадии в ФСБ (фазовый контраст,  $\times 220$ ,  $\times 600$ );

Б - инкубация выделенных стадий в присутствии 0.1% Тритона X-100 вызывает разрыв цитоплазматической мембраны и высвобождение содержимого клетки (фазовый контраст,  $\times 220$ ).

Таблица 2

**Сравнение удельной активности ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах и клетках внутриклеточных стадий развития микроспоридии *Paranosema grylli*.**

Фермент	Споры	Меронты и споронты
Глюкозо-6-ФДГ	15 ± 1 (7)	7 ± 1 (8) <sup>a</sup>
Фосфоглюкомутаза	7 ± 1 (7)	– (4)
Гексокиназа	– (8)	– (5)
Фосфогюкоизомераза	1549 ± 255 (5)	23 ± 2 (9)
Фосфофруктокиназа	10 ± 1 (4)	– (5)
Фосфолицераткиназа	16 ± 4 (4)	8 ± 1 (9)
Пируваткиназа	6 ± 1 (6)	2 ± 0,3 (5)
Глицерол-3-ФДГ	16 ± 2 (7)	17 ± 3 (5)
АТФ-аза	7 ± 1 (3)	17 ± 4 (4)

<sup>a</sup> - значения в скобках показывают число независимо проведенных процедур очистки;

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

наблюдаемое снижение активности ферментов углеводного и энергетического обмена в меронтах и ранних споронтах по сравнению со спорами не связано с их потерей в ходе очистки, поскольку использованный метод выделения позволяет сохранить целостность стадий (Seleznev et al., 1995). Действие протеаз также не служит причиной столь низких значений активности ферментов в стадиях, поскольку электрофорез белков в полиакриламидном геле с сополимеризованным желатином в качестве субстрата не выявил более высокой активности протеаз в выделенных стадиях по сравнению со спорами (не показано). Кроме того, активность отдельных ферментов снижалась в стадиях внутриклеточного развития в разной степени, в то время как активность глицерол-3-ФДГ не изменялась по сравнению со спорами, а активность АТФ-азы даже возрастала. Поскольку все известные группы эндопаразитических простейших обеспечивают потребности в АТФ за счет реакций гликолиза (Сопрунов, 1987), более низкая активность гликолитических ферментов во внутриклеточных стадиях микроспоридий в сравнении со спорами оказалась неожиданной. В связи с тем, что центрифугирование в градиенте плотности Перколла не позволяет полностью очистить клетки паразита от компонентов зараженной ткани (Seleznev et al., 1995), в пробах внутриклеточных стадий могут присутствовать и примеси высокоактивных ферментов хозяина. Таким образом, истинная активность ферментов гликолиза, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и фосфоглюкомутазы паразитов при внутриклеточном развитии может оказаться еще более низкой.

Очевидно, что интенсивно размножающиеся меронты и споронты, характеризующиеся началом процессов спорогонии, нуждаются в значительно большем количестве АТФ, чем покоящиеся зрелые споры. Все это указывает на существование других, отличных от гликолиза, механизмов обеспечения энергией процессов внутриклеточного развития микроспоридий. Поскольку все паразиты этой группы лишены митохондрий, наиболее

логичным объяснением полученных данных могла быть гипотеза о непосредственном поглощении микроспоридиями готовой АТФ из цитоплазмы зараженной клетки.

### **2.2.2. Влияние микроспоридий *P. grylli* на содержание запасных веществ в зараженном жировом теле сверчков.**

Поскольку микроспоридии лишены митохондрий, они не могут самостоятельно использовать жирные кислоты в качестве энергетических субстратов для синтеза АТФ в ходе реакций окислительного фосфорилирования. Следовательно, сравнение влияния микроспоридий на содержание гликогена и липидов в клетках зараженного жирового тела могло бы дать весьма полезную информацию о физиологических особенностях этих паразитов при внутриклеточном развитии. Если амитохондриальные микроспоридии используют собственные анаэробные процессы гликолиза для синтеза АТФ, в зараженной ткани будет наблюдаться избирательное расходование гликогена. Если же паразиты поглощают экзогенную АТФ и эксплуатируют энергетическую систему хозяина, запасы углеводов и липидов будут расходоваться самим насекомым приблизительно одинаково.

Для изучения этого вопроса мы провели сравнительный анализ содержания гликогена и липидов в зараженной и контрольной (незараженной) ткани хозяина (Долгих и др., 2002). Исследование показало, что в зараженных клетках наблюдается достоверное снижение содержания обоих резервных компонентов (Таблица 3). Концентрация гликогена снижается приблизительно в 2.9 раза. При этом следует учесть, что значительная часть потребляемой паразитами глюкозы не расходуется на производство АТФ, а запасается в больших количествах в спорах микроспоридий в виде трегалозы (Vandermeer, Gochnauer, 1971b; Undeen et al., 1987).

Таблица 3

**Сравнительный анализ содержания гликогена (нм глюкозы/мг сырого веса ткани) и общих липидов (мкг липидного экстракта / мг сырого веса ткани) в жировом теле контрольных и зараженных сверчков.**

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95% уровень достоверности различий
Гликоген	88 ± 17 (17) <sup>a</sup>	30 ± 8 (14)	+
Общие липиды	247 ± 30 (10)	114 ± 10 (5)	+

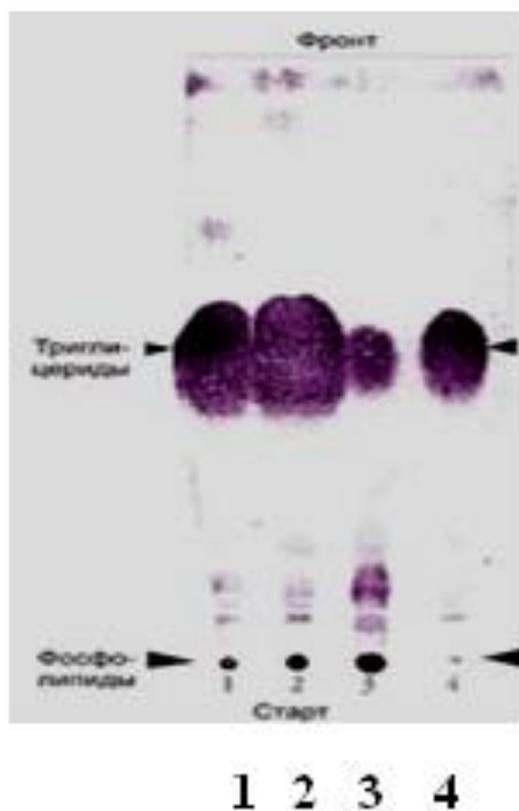
<sup>a</sup> - значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков.

Содержание общих липидов в зараженной жировой ткани снижается по сравнению с контролем в 2.2 раза. Тонкослойная хроматография экстрагированных липидов на силикогелевых пластинах позволила установить, что в контрольном жировом теле основную долю липидов составляют триглицериды, которые и являются главным энергетическим резервом клетки. В инвазированном жировом теле снижение содержания липидов происходит именно за счет этой фракции (Рисунок 2). При этом заражение вызывает увеличение в ткани хозяина доли полярных липидов, что, вероятно, связано с усиленным мембраногенезом в клетках паразитов. Таким образом, содержание резервных триглицеридов снижается в зараженном жировом теле более чем в 2.2 раза. Значительное снижение содержания липидов в жировом теле насекомых при микроспориidioзе отмечалось и другими авторами (Canning, 1962; Darwish et al., 1989).

Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии в зараженной клетке избирательного расходования углеводов, как единственно возможного субстрата для синтеза АТФ самими паразитами в ходе малоэффективного гликолиза. Приблизительно равное снижение содержания гликогена и триглицеридов в зараженной клетке указывало на использование паразитами обменных процессов хозяина, поскольку метаболическая система жирового тела насекомых может использовать в равной мере углеводы, жиры и другие соединения для продукции АТФ в процессе окислительного фосфорилирования.

### **2.2.3. Влияние микроспоридий *P. grylli* на содержание субстратов и интермедиатов энергетического обмена в зараженном жировом теле сверчков.**

Сравнение содержания субстратов и промежуточных продуктов энергетического обмена в жировом теле контрольных и зараженных сверчков показало, что паразиты вызывают достоверное увеличение



**Рисунок 2.** Разделение липидов жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus* методом тонкослойной хроматографии. Крупные пятна соответствуют фракции триацилглицеридов.

1, 2 – незараженное жировое тело; 3 – жировое тело сверчка, зараженное микроспоридией *P. grylli*; 4 – стандарт.

концентрации АТФ в цитоплазме клетки хозяина приблизительно в 4 раза (Таблица 4). При этом концентрация АДФ в зараженной ткани достоверно не отличается от контроля. Таким образом, в инвазированной клетке наблюдается и значительное увеличение соотношения концентраций АТФ/АДФ. Следует отметить, что показатель АТФ/АДФ постоянен для каждой пробы независимо от степени ее разведения. Достоверное увеличение концентрации АТФ и соотношения АТФ/АДФ в пробах зараженного жирового тела по сравнению с контролем позволяют сделать вывод об усилении интенсивности процессов, направленных на синтез АТФ в зараженной клетке (Долгих и др., 2002).

Пируват не был обнаружен с помощью использованного метода ни в зараженном, ни в контрольном жировом теле что, вероятно, связано с его интенсивным использованием митохондриями клеток хозяина. В жировом теле сверчков обнаружено относительно высокое содержание свободной глюкозы. Концентрация глюкозы значительно варьировала у отдельных особей, но различий между контрольными и зараженными насекомыми по этому показателю мы не обнаружили. Средняя концентрация глюкозо-6-Ф при заражении возрастала приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем. Однако достоверность этих отличий находится ниже 95% уровня достоверности.

Следует отметить, что усиление катаболических процессов в зараженном жировом теле сверчков показано нами и при анализе активности ряда ферментов, выполненном при подготовке кандидатской диссертации (Долгих и др., 1995; Долгих и др., 1996; Долгих, 1997).

#### **2.2.4. Влияние микроспоридий *P. grylli* на активность ферментов углеводного и энергетического обмена в жировом теле хозяина.**

Измерение удельных активностей восьми ферментов в зараженном и контрольном жировом теле сверчков показало, что микроспоридии *P. grylli*

Таблица 4

**Сравнение содержания ряда субстратов энергетического обмена в жировом теле контрольных и зараженных сверчков (нмоль/мг белка в гомогенатах жирового тела после осаждения паразитов).**

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95% уровень достоверности Различий
Глюкоза	152 ± 69 (7) <sup>a</sup>	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) <sup>b</sup>	1,2 ± 0,3 (9)	+

<sup>a</sup> - значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков;

<sup>b</sup> - среднее соотношений концентраций АТФ/АДФ, вычисленных для каждой отдельно проанализированной особи.

оказывают различное влияние на активность исследованных ферментов (Таблица 4). При микроспориidioзе наблюдается приблизительно 6-кратное увеличение удельных активностей лактатДГ (как по прямой, так и по обратной реакциям) и глицерол-3-фосфатДГ, а активность пируваткиназы в зараженной ткани возрастает не менее, чем в 10 раз. Значительное увеличение активности указанных ферментов свидетельствует об усилении катаболических процессов в зараженной клетке. В то же время, мы не обнаружили в зараженном жировом теле изменения удельной активности гексокиназы и алкогольДГ. Отсутствие влияния микроспоридий на активность гексокиназы может быть связано с тем, что мобилизация гликогена в жировом теле насекомых осуществляется с помощью фермента гликоген фосфорилаза (Arrese, Soulages, 2010). При этом в ходе отщепления от гликогена одного глюкозного остатка образуется глюкозо-1-фосфат. Для его поступления в гликолиз требуется не гексокиназа, а фермент фосфоглюкомутаза, превращающая глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат. Отсутствие достоверного изменения активности алкогольДГ при заражении можно объяснить тем, что спиртовое брожение не играет важной роли в энергетическом обеспечении насекомых, преимущественно использующих для этой цели окислительный метаболизм липидов и углеводов.

Это же исследование показало, что микроспоридии вызывают в жировом теле сверчков достоверное снижение удельных активностей следующих ферментов: малик-энзима в 2.5-3 раза, НАД-зависимой малатДГ в 1.5 раза (измерение проводилось по обратной реакции) и глюкозо 6-фосфатДГ в 1.3-1.4 раза (Таблица 5). Необходимо отметить, что согласно распределению активности сукцинатДГ в осадке и супернатанте, при использованном режиме центрифугирования гомогенатов жирового тела (6000g, 30 мин) происходит осаждение митохондрий. Таким образом, в работе измерялись активности только цитоплазматических форм малатДГ и малик-энзима. Указанные три фермента выполняют важную роль в синтезе

Таблица 5

**Удельная активность ферментов углеводного и энергетического обмена в гомогенатах жирового тела контрольных и зараженных микроспоридиями *Paranosema grylli* сверчков после осаднения паразитов (нмоль/мин × мг белка).**

Субстрат	Контроль	Микроспоридиоз	95% уровень достоверности Различий
ЛактатДГ			+
лактат-пируват	2 ± 0.4 (4) <sup>a</sup>	10 ± 2 (8)	
пируват-лактат	2 ± 0.4 (14)	14 ± 4 (10)	+
Глицерол-3-ФДГ	4 ± 1 (19)	24 ± 3 (19)	+
Пируваткиназа	14 ± 3 (18)	162 ± 13 (23)	+
АлкогольДГ	12 ± 1 (16)	13 ± 1 (13)	-
Гексокиназа	71 ± 8 (20)	71 ± 8 (19)	-
Малик-энзим	77 ± 6 (45)	29 ± 2 (25)	+
МалатДГ (ЩУК-малат)	1583 ± 66 (34)	1057 ± 50 (17)	+
Глюкозо-6ФДГ	261 ± 24 (34)	194 ± 18 (21)	+

<sup>a</sup> - значения в скобках показывают число независимо изученных сверчков.

жирных кислот. Малик-энзим и глюкозо 6-фосфатДГ катализируют реакции, обеспечивающие образование НАДФН в цитоплазме. Цитоплазматическая форма малатДГ способствует образованию в цитоплазме ацетил-КоА, участвуя во взаимопревращении цитрата и малата после переноса их через митохондриальную мембрану, а также поставляет малат для реакции катализируемой малик-энзимом. МалатДГ и малик-энзим могут также участвовать и в глюконеогенезе, а именно в обходных реакциях при образовании ФЕП из пирувата.

Таким образом, снижение активности трех изученных ферментов при микроспориidioзе может быть связано со снижением интенсивности липогенеза и глюконеогенеза в жировом теле зараженных насекомых. Интересно отметить, что по сравнению с малик-энзимом и малатДГ, активность глюкозо 6-фосфатДГ в зараженном жировом теле сверчков снижается в меньшей степени. Возможно, это связано с интенсивным биосинтезом зараженной клеткой пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов для обеспечения развития микроспоридий. Глюкозо-6-фосфатДГ является ключевым ферментом пентозо-фосфатного пути и участвует в образовании рибозо-5-фосфата, необходимого для биосинтеза нуклеотидов. В литературе описаны многочисленные факты, свидетельствующие о зависимости между активностью ферментов пентозо-фосфатного пути (в частности глюкозо-6-ФДГ) и интенсивностью нуклеинового обмена (Кудрявцева, 1978).

#### **2.2.5. Сопоставление биохимических данных с результатами расшифровки генома микроспоридии *Encerphalitozoon cuniculi*.**

В 1999 году при написании главы “Microsporidian biochemistry and physiology” для коллективной монографии “The Microsporidia and Microsporidiosis”, опубликованной Американским сообществом микробиологов, мы впервые выдвинули гипотезу о присутствии в цитоплазматической мембране микроспоридий уникальных АТФ/АДФ

переносчиков, сходных с таковыми, обнаруженными у внутриклеточных бактерий (Weidner et al., 1999). В качестве основной функции этих трансмембранных транспортеров предполагалось обеспечение импорта паразитом АТФ клетки хозяина по примеру того, как это происходит у ряда внутриклеточных бактерий. Мы полагаем, что данную монографию можно считать завершающим этапом догеномного (биохимического) периода в изучении метаболизма микроспоридий. В 2001 году группой французских коллег были впервые опубликованы результаты расшифровки генома микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi*, паразитирующей в организме человека и других млекопитающих. Анализ списка белок-кодирующих последовательностей, обнаруженных в геноме *E. cuniculi*, позволил сопоставить данные геномного анализа с результатами предыдущего (догеномного) периода в изучении метаболизма микроспоридий и наметить новые направления исследований.

Одним из наиболее интересных результатов расшифровки генома микроспоридии *E. cuniculi* оказалось обнаружение четырех генов, кодирующих белки, сходные с АТФ/АДФ - транспортерами пластидно-бактериального типа и, следовательно, способные импортировать АТФ из цитоплазмы хозяина. Этот результат свидетельствовал в пользу справедливости выдвинутой нами гипотезы о зависимости микроспоридий от АТФ клетки хозяина и присутствии в цитоплазматической мембране паразитов АТФ/АДФ-переносчиков, сходных с таковыми, обнаруженными у внутриклеточных бактерий (Weidner et al., 1999). Транспортеры этого семейства не имеют гомологии с АТФ/АДФ-переносчиками внутренней мембраны митохондрий и ранее были обнаружены только у внутриклеточных бактерий (*Chlamydiales*, *Rickettsiales*) (Plano, Winkler, 1991; Tjaden et al., 1999; Greub, Raoult, 2003), а также в пластидах растений (Kampfenkel et al., 1995). Обнаружение в геноме *E. cuniculi* последовательностей, кодирующих эти белки, позволило предположить, что

у микроспоридий, в отличие от всех других эукариот, пластидно-бактериальный переносчик может быть включен в цитоплазматическую мембрану с целью утилизации готовой АТФ зараженной клетки.

### **2.3. АТФ/АДФ-транслоказы пластидно-бактериального типа как инструмент паразитирования микроспоридий на энергетической системе хозяина.**

#### **2.3.1. Научное значение обнаружения уникальных переносчиков в геноме *E. cuniculi*.**

Как отмечено выше, одним из наиболее значимых результатов расшифровки генома микроспоридии *E. cuniculi* оказалось обнаружение последовательностей, предположительно кодирующих четыре АТФ/АДФ-переносчика пластидно-бактериального типа (Katinka et al., 2001). Способность внутриклеточных паразитов поглощать готовую АТФ зараженной клетки с помощью белков данного семейства впервые обнаружена в 1976 году у облигатной внутриклеточной бактерии *Rickettsia prowazekii* (Winkler, 1976). Как показали дальнейшие исследования, бактериальные АТФ/АДФ-транспортеры не имеют никакого сходства с АТФ/АДФ-переносчиками, обнаруженными во внутренней мембране митохондрий. Митохондриальный транспортер представляет собой димер с размером субъединиц около 30 кДа. В составе каждой субъединицы обнаружены 6 гидрофобных участков, позволяющих димеру формировать 12 трансмембранных доменов во внутренней мембране митохондрий. В отличие от митохондриального белка, переносчик, обнаруженный в геноме паразитических бактерий, представлял собой мономер размером около 60 кДа, способный самостоятельно формировать 12 трансмембранных доменов в мембране паразита (Plano, Winkler, 1991). Позднее гомологичные белки были найдены в пластидах высших растений (Kampfenkel et al., 1995) и во

внутриклеточных бактериях *Chlamydia trachomatis* (Tjaden et al., 1999). Поскольку переносчики этого типа присутствуют у представителей филогенетически удаленных бактериальных клад, а также у высших растений, наиболее вероятным механизмом их распространения среди различных организмов представлялся горизонтальный (латеральный) перенос генов. Например, представители типа Chlamydiae имеют длительную историю взаимоотношений с эукариотическими организмами и, в частности, с растениями (Koonin et al., 2001). Это позволило предположить, что ген, кодирующий один из этих белков, был приобретен предшественником представителей рода *Chlamydia* из растений и далее передан паразитам семейства *Rickettsiaceae*.

Во всех описанных случаях, гены, кодирующие данную группу АТФ/АДФ-переносчиков, обнаружены либо у прокариотических организмов, либо в органеллах эукариотической клетки (пластидах) имеющих прокариотическое происхождение. Обнаружение последовательностей, кодирующих гомологичные белки в геноме лишенных каких-либо пластид микроспоридий оказалось крайне неожиданным. Биологический смысл данного приобретения для микроспоридий достаточно очевиден. АТФ/АДФ-транспортеры и митохондриального и пластидно-бактериального типа функционируют как антипортеры, осуществляющие одновременное перемещение двух веществ (АТФ и АДФ) в разных направлениях через биологическую мембрану. Основной физиологической функцией митохондриального транспортера является экспорт АТФ из “энергетической станции” клетки и импорт АДФ внутрь органеллы. Напротив, переносчики пластидно-бактериального типа отвечают за транспортировку (импорт) АТФ внутрь растительной органеллы или клетки бактерии-паразита. Таким образом, именно приобретение переносчиков пластидно-бактериального типа могло бы позволить микроспоридиям поглощать готовую АТФ из цитоплазмы клетки хозяина и паразитировать на его энергетической системе.

Однако неясным оставался вопрос о том как и, главным образом, когда микроспоридии приобрели этот важный для любого внутриклеточного паразита ген.

Наиболее правдоподобным сценарием приобретения данного переносчика микроспоридией *E. cuniculi* представляется горизонтальный перенос гена от одного из бактериальных паразитов. Два вида паразитических бактерий (*Ch. trachomatis* и *R. prowazekii*), у которых на момент расшифровки генома *E. cuniculi* были обнаружены пластидно-бактериальные переносчики, являются известными патогенами человека и теплокровных животных. Такую же экологическую нишу занимает и микроспоридия *E. cuniculi*. Следовательно, перенос гена, кодирующего пластидно-бактериальный транспортер, мог произойти при одновременном заражении микроспоридией и бактерией клетки какого-нибудь общего теплокровного хозяина. При осуществлении такого сценария, присутствие приобретенных переносчиков должно было бы наблюдаться лишь в геноме определенной группы микроспоридий филогенетически близкой к роду *Encephalitozoon*. В этом случае подавляющее большинство видов группы, не связанных с теплокровными позвоночными, будут вынуждены использовать другие механизмы обеспечения своего развития энергией. В то же время, присутствие в геноме *E. cuniculi* четырех последовательностей, кодирующих пластидно-бактериальные транспортеры, позволяло предположить, что перенос гена между паразитической бактерией и древним предшественником микроспоридий произошел давно. В этом случае все представители группы должны располагать АТФ/АДФ-переносчиками пластидно-бактериального типа.

Для ответа на вопрос, является ли присутствие уникальных АТФ/АДФ-переносчиков универсальным свойством всех представителей типа *Microsporidia*, мы предприняли поиск гомологичных генов у филогенетически удаленного от *E. cuniculi* вида. К началу данного

исследования уже была накоплена значительная информация о нуклеотидных последовательностях гена 16S РНК малой субъединицы рибосом для различных видов микроспоридий. Выполненный филогенетический анализ известных последовательностей позволил достоверно установить, что изучаемый нашей исследовательской группой паразит жирового тела двупятнистого сверчка *P. grylli* расположен на противоположной стороне филогенетического дерева микроспоридий по сравнению с паразитом теплокровных позвоночных *E. cuniculi* (Sokolova et al., 2003). Таким образом, для ответа на вопрос о распространении АТФ/АДФ-переносчиков среди микроспоридий было необходимо обнаружить кодирующие их последовательности в геноме *P. grylli*.

### **2.3.2. Саузерн-гибридизация геномной ДНК *P. grylli* с мечеными генами АТФ/АДФ-переносчиков бактерий (*Chlamydia trachomatis*), пластид растений (*Arabidopsis thaliana*) и микроспоридии *E. cuniculi*.**

На первом этапе исследования нами проведена гибридизация перенесенной на фильтр геномной ДНК *P. grylli* с мечеными копиями генов, кодирующих 2 переносчика бактерии *C. trachomatis* (Npt1 и Npt2), два растительных переносчика обнаруженные в геноме *Arabidopsis thaliana* и четыре предполагаемых переносчика из генома микроспоридии *E. cuniculi*. Фрагменты ДНК, кодирующие перечисленные переносчики, были любезно предоставлены профессором Г. Лакином (Университет Бордо 2, Франция). Несмотря на мягкие условия гибридизации (5xSSPE, 25% формамид, 1% саркозил при 42°C или комнатной температуре) и отмывки (2xSSPE, 0.5% саркозил при тех же температурах), специфичного распознавания каких либо последовательностей в геноме *P. grylli* не наблюдалось. С одной стороны, полученные результаты свидетельствовали в пользу отсутствия АТФ/АДФ-транспортеров пластидно-бактериального типа у широкого круга микроспоридий. С другой стороны, в литературе накапливались данные о

чрезвычайной пластичности генома микроспоридий (Van de Peer et al., 2000; Slamovits et al., 2004). Низкий уровень сходства аминокислотных последовательностей четырех генов, кодирующих переносчики *E. cuniculi* (идентичность менее 35%), также свидетельствовал о высокой эволюционной изменчивости белков микроспоридий. Исходя из выше изложенного, мы решили сменить тактику поиска АТФ/АДФ-переносчиков в геноме *P. grylli* и попытались решить поставленную проблему с помощью вырожденных праймеров, подобранных к наиболее консервативным участкам в молекуле переносчика.

### **2.3.3. ПЦР-амплификация фрагментов двух генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики *P. grylli* с использованием вырожденных праймеров.**

Компьютерный анализ всех известных к началу эксперимента последовательностей, кодирующих переносчики паразитических бактерий, растительных пластид и микроспоридии *E. cuniculi* позволил нам обнаружить два относительно консервативных участка. На основании аминокислотных последовательностей выбранных участков были подобраны прямой праймер F (Рисунок 3, А) и два перекрывающихся обратных праймера R1 и R2 (Рисунок 3, Б). При этом нуклеотидам, кодирующим аминокислотные остатки, присутствующие в ДНК четырех генов *E. cuniculi* уделялось особое внимание.

Метод ПЦР с использованием двух сочетаний праймеров F/R1 и F/R2, а также геномной ДНК микроспоридии *P. grylli* в качестве матрицы позволил амплифицировать в обоих случаях достаточно сложную смесь фрагментов ДНК (Рисунок 4, А). Этот результат оказался вполне ожидаем, поскольку высокая степень вырожденности использованных праймеров обуславливала необходимость проведения их отжига при предельно допустимых мягких

			5' CCN	GAR	HTN	TGG	GG 3'						
			<b>A</b>	<b>E</b>	<b>L/M</b>	<b>W</b>	<b>G</b>						
<i>Encephalitozoon cuniculi</i> TLC-like 1	F <sup>176</sup>	I	S	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	S	L	V	L	S <sup>188</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 2	Y <sup>175</sup>	L	V	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	S	L	I	I	S <sup>187</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 3	F <sup>177</sup>	L	C	S	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	L	V	V	S <sup>189</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 4	Y <sup>178</sup>	V	C	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	S	L	V	V	Q <sup>190</sup>
<i>Rickettsia prowazekii</i> TLC 1	Y <sup>152</sup>	T	I	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	T	M	M	L	S <sup>164</sup>
<i>Chlamidia trachomatis</i> TLC1	Y <sup>153</sup>	V	L	S	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	S	V	M	L	S <sup>165</sup>
<i>C. trachomatis</i> TLC2	Y <sup>152</sup>	V	M	S	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>S</b>	S	V	V	L	S <sup>164</sup>
<i>Arabidopsis thaliana</i> AATP1	Y <sup>242</sup>	V	M	<b>A</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>W</b>	<b>G</b>	S	V	V	V	S <sup>254</sup>

A

			3' CCN	TTY	RAN	CCN	TTY 5'						
			<b>G</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>						
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 1	G <sup>472</sup>	I	F	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	S	I	G	S	I <sup>484</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 2	G <sup>464</sup>	L	G	I	N	I	<b>G</b>	<b>K</b>	T	I	G	S	V <sup>476</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 3	G <sup>473</sup>	L	C	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	S	L	G	S	I <sup>485</sup>
<i>E. cuniculi</i> TLC-like 4	G <sup>477</sup>	L	C	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	S	I	G	S	L <sup>489</sup>
<i>R. prowazekii</i> TLC 1	V <sup>434</sup>	I	G	<b>G</b>	R	L	<b>G</b>	<b>K</b>	S	<b>G</b>	<b>G</b>	A	I <sup>446</sup>
<i>C. trachomatis</i> TLC 1	V <sup>439</sup>	V	A	A	R	F	<b>G</b>	<b>K</b>	S	<b>G</b>	<b>G</b>	S	L <sup>451</sup>
<i>C. trachomatis</i> TLC 2	G <sup>447</sup>	V	I	S	R	V	<b>G</b>	<b>K</b>	S	<b>G</b>	<b>G</b>	S	L <sup>459</sup>
<i>A. thaliana</i> AATP1	V <sup>521</sup>	V	C	N	P	L	<b>G</b>	<b>K</b>	S	<b>G</b>	<b>G</b>	A	L <sup>533</sup>

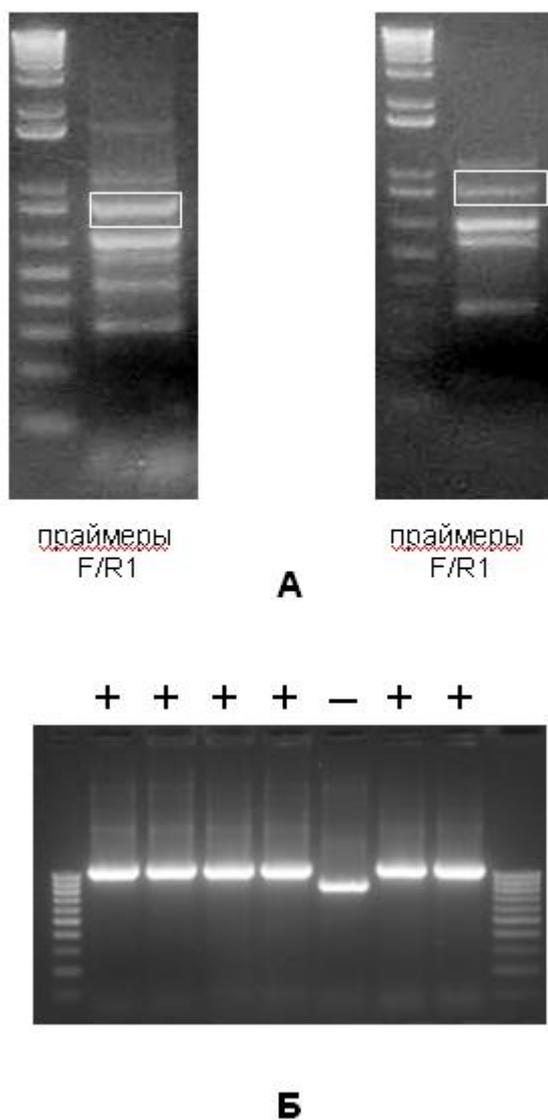
Б

3' CCN TTY WSN DAN CC 5'

**Рисунок 3. Консервативные участки в последовательности известных пластидно-бактериальных переносчиков, использованных для подбора вырожденных праймеров.**

А. Прямой праймер F подобран на основе последовательности аминокислот AE(L/M)WG: 5'GCN GAR HTN TGG GG 3'

Б. Два перекрывающихся обратных праймера: R1 был подобран на основе последовательности GKLGK: 5' YTT NCC NAR YTT NCC 3'; R2 был подобран на основе последовательности GK(S/T)(I/L)G: 5' CC NAD NSW YTT NCC 3'. Вырожденные нуклеотиды отмечены жирным шрифтом: 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.



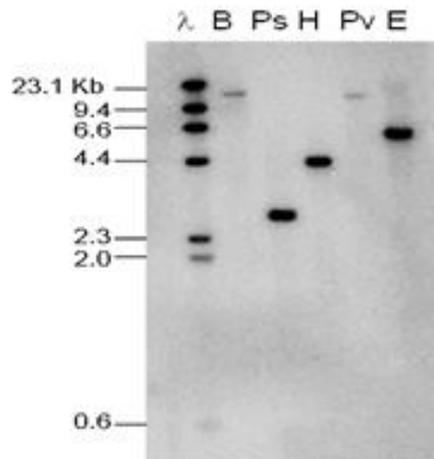
**Рисунок 4. Поиск последовательностей кодирующих АТФ/АДФ-переносчики пластидно-бактериального типа в геноме микроспоридий *P. grylli*.**

А - ПЦР-амплификация нескольких фрагментов геномной ДНК *P. grylli* с использованием вырожденных праймеров F/R1 и F/R2; Б – использование ПЦР для отбора колоний содержащих лазмиду с размером вставки около 900 пн (положительные варианты обозначены знаком плюс. На крайние дорожки нанесены маркеры молекулярного веса.

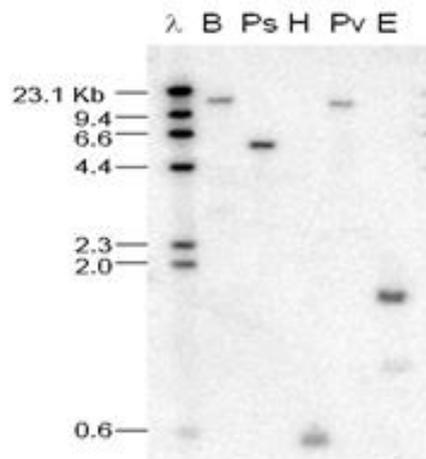
условиях (42°C). Полосы, размер которых соответствовал ожидаемому расстоянию между прямым и обратным праймером (около 900 пн), были вырезаны из агарозного геля и встроены в вектор pTZ57R. После трансформации бактерий *E. coli* около 40 колоний были проанализированы методом ПЦР с использованием универсальных M13 праймеров и трансформанты, несущие плазмиды со вставкой около 900 пн, отобраны для определения нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов (Рисунок 4, Б). В результате этого эксперимента нам удалось обнаружить и клонировать фрагменты двух генов, предположительно кодирующих АТФ/АДФ-переносчики *P. grylli* (Dolgikh et al., 2004; Долгих и др., 2011). При этом фрагмент гена, обозначенного нами как *ANCI*, был амплифицирован при использовании праймеров F/R1, а фрагмент гена, обозначенного как *ANC2*, с помощью комбинации F/R2.

Для анализа изучаемых последовательностей методом Саузерн-гибридизации геномная ДНК *P. grylli*, была фрагментирована с использованием различных ферментов рестрикции, разделена в 1% агарозном геле и перенесена на нейлоновый фильтр. Гибридизация фильтров с радиоактивно мечеными фрагментами генов *ANCI* и *ANC2* размером 900 пн показала, что каждая проба специфично узнавала только одну полосу фрагментированной и разделенной в агарозном геле геномной ДНК *P. grylli*.

Размер распознаваемых фрагментов варьировал от 2 до 20 тысяч пн и зависел от расположения сайтов различных рестриктаз в геноме паразита (Рисунок 5). Таким образом, результаты Саузерн-гибридизации показали, что оба обнаруженных гена присутствуют в геноме *P. grylli* в виде одиночных копий. Следует отметить и отсутствие перекрестного распознавания двух генов, что свидетельствует о низкой гомологии между последовательностями и еще раз подтверждает высокую пластичность геномов микроспоридий.



**A**



**Б**

**Рисунок 5.** Саузерн-гибридизация геномной ДНК *P. grylli* с радиоактивно-мечеными ПЦР-фрагментами генов *ANC1* (А) и *ANC2* (Б). Перед разделением в агарозном геле геномная ДНК была фрагментирована с использованием следующих ферментов рестрикции: *Bgl*II (B), *Pst*I (Ps), *Hind*III (H), *Pvu*II (Pv), *Eco*RI (E). λ - ДНК бактериофага λ расщепленная ферментом *Hind*III.

#### 2.3.4. Выделение полноразмерной копии гена *ANCI*.

Для выделения полноразмерной копии гена, кодирующего один из АТФ/АДФ-переносчиков микроспоридии *P. grylli* геномная ДНК паразита была фрагментирована с использованием фермента рестрикции *Hind*III и встроена в вектор pBluescript II KS+, линейаризованный с использованием того же фермента. Поскольку результаты Саузерн-гибридизации позволили нам приблизительно оценить размер фрагмента ДНК *P. grylli*, содержащего *ANCI* и ограниченного сайтами *Hind*III (около 4.4 тысяч п.н., рисунок 5, А), для поиска полноразмерной копии гена была создана библиотека, обогащенная последовательностями, кодирующими данный переносчик. С этой целью фрагментированная с помощью *Hind*III геномная ДНК была разделена в 1% агарозном геле и область, содержащая фрагменты ДНК размером от 4 до 5 тысяч п.н., была использована для создания такой библиотеки. Это позволило провести скрининг колоний с помощью радиоактивно меченного фрагмента и изолировать плазмиду, несущую последовательность размером 1647 пн, кодирующую полноразмерный АТФ/АДФ-переносчик, состоящий из 548 аминокислотных остатков (Рисунок 6). Расшифрованная последовательность депонирована в банке данных EMBL/GenBank под номером AJ868111. Blast-анализ предсказанной аминокислотной последовательности показал около 36% идентичности с гомологичными генами микроспоридии *E. cuniculi*. Сравнение аминокислотной последовательности *Anc1* с гомологичными последовательностями бактериальных и пластидных переносчиков показали около 26% идентичности. Трансмембранная топология белка была предсказана с помощью автоматических серверов ConPred2, HMMTOP, SMART, TopPred и TMHMM. Как и в случае с пластидно-бактериальными белками и переносчиками *E. cuniculi*, в составе молекулы *Anc1 P. grylli* выявлено 11-12 гидрофобных участков, способных формировать трансмембранные домены. В то же время, мы не обнаружили каких-либо

```

/organism="Paranosema grylli"
/mol_type="genomic DNA"
/isolation_source="host organism fat bodies"
/host="Gryllus bimaculatus"
/db_xref="taxon:235222"
/country="Russia:St. Petersburg"
gene
1..1647
/ gene="anc1"
CDS
1..1647
/ gene="anc1"
/function="putative ATP/ADP exchange"
/note="product similar to plastidic and bacterial ADP/ATP
carrier protein"
/codon_start=1
/product="adenine nucleotide carrier"
/protein_id="CAI30461.1"
/db_xref="GI:68637792"
/db_xref="GOA:Q4LCA6"
/db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:Q4LCA6"
/translation="MTKIENCKSCLPTENEVEEEALSGVTF LGRVFKVARCERPVFYTY
MSIILFLVSYIYSVSRDMKDIIIERLDPASIPYLKVLVLPVNICIVFSIQKILINT
SVSKVFSIMCMVFGDIQLAVGALSIIILLSSFPALIRDKGFLYVAFVPPIFCIFGMAS
ALPVNSWTSSLMYLSAEIWGTWVFQFLFFALSNEIYTQKQSLRFIPLFLVFGNVALIV
SGFSMKFIKYVSEQGSYEFTLFFRKL VFLVMGICSFVIYLIHRYFEDNIAHKPLFVTS
EASYKQKTKSKIGFMEAMQTMASSRLVLAISFVVIAYSVSNMVEASFKTCMSQYALQ
KGAQADFHVMGVQSDIQLAVGALSIIILLSSFPALIRDKGFLYVAFVPPIFCIFGMAS
VFGMAALNNSARGNRTLLGFVSI GENLWLEQLLGAIIVTGFKILKYSAVDVSKEALSM
RINPAYRARFKGIYDGVCGKLGKAIIGSGITNMQNVFYNSSDVRKAAISSLTIVTVITA
CWGFAVRYLAGKYDKSTHSNTDIDIDLINVDPMEKDADDL"

```

ORIGIN

```

1 atgacgaaaa ttgagaactg caaaagttgc ttgccaacag aaaacgaggt cgaagaagag
61 gcaactatctg gagtaacatt tttggggcgt gtattcaaag ttgcgcgatg cgaacgcctt
121 gttttcacat atatgagcat tatattatct cttgtgtcat acatttattc tgtcagcaga
181 gatatgaaag acgctattat tatagagcgc cttgatccag catccattcc atatctcaaa
241 gtacttgttg tgcttctgt aaacatatgt attgttttct ctatacaaaa aattcttatt
301 aacacatctg tttccaaggt tttttcaata atgtgcgtaa tgtttggaat ctatttctgc
361 ctttacggca ctgttcttat gtcattccgg cacatttttg aactaaatga gtttcttata
421 agagattggt ttgcagatga taagatggtg tttatgggcc tgcagtggac aatcgcgta
481 gcaactaccg ttaattcctg gacatcttct ttaatgtatc tctctgcgga aatttgggga
541 actgttgtct ttcagtttct gttcttcgca ctgtcaaacg aaatatatac acagaagcaa
601 tccctacgat ttattccatt gtttctggtc tttggaaatg ttgcactaat tgtgtcgggc
661 tctccatga agtttatcaa atacgtctcg gagcaaggtt cgatgagtt tacgttattt
721 tttcgtaaac tagtttttgt tctaattgga atttgctcct ttgttatata cttatacat
781 agatactttg aagacaacat tgcacataag cctctatttg tcacaagcga agcatcttat
841 aaacaaaaaa caaagagcaa gattggggtc atggaggcta tgcagacaaat ggcctcgta
901 agactagttc tagccatctc ctttgttgtg atagcatatt cagtatctgt aaatatggta
961 gaagcctcgt ttaagacgtg tatgagtcaa tatgcgctac aaaaaggtgc gcaagctgat
1021 tttcatgtaa tgggagttca gtcagacata cagctagctg ttggtgcggt atctattatt
1081 ctgttgttgt catcttttcc tgcactaatt cgcgacaaaag ggtttttata tgttgcaatt
1141 gtgcctccta tattttgtat ctttggaaatg gcatctgttt ttggaatggc agctttaaat
1201 aactctgcta gaggcaacag aactttactt ggatttgtaa gtatcgggga aaacttatgg
1261 ttagaacagc tcttaggggc tataattggt acaggattca agatattgaa atattccgca
1321 gtagatgtgt ctaaggaggc attaagcatg agaataaatc ctgcataccg cgcaagattc
1381 aagggaaat acgacggcgt atgtggaaaa ctaggaaagg caataggttc tggatcact
1441 aacatgcaaa atgtatttta taactcaagt gatgtgagaa aagccgctat tcatcgcta
1501 acaattgta cagttataac tgcatgttgg ggattcgctg taaggattt agccggaaaa
1561 tacgataagt ccacacactc taacacagat atcgacatag acttgataaa cgtggatcct
1621 atggaaaagg atgctgatga tttataa

```

**Рисунок 6. Аминокислотная и нуклотидная последовательности гена *Anc1 P. grylli*, депонированные в банке генетической информации EMBL/GenBank.**

последовательностей, ответственных за формирование N-терминальных сигнальных пептидов.

### **2.3.5. Экспрессия гена *ANCI* в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. grylli*.**

Несмотря на факт присутствия последовательностей, предположительно кодирующих АТФ/АДФ-переносчики пластидно-бактериального типа в геноме двух филогенетически удаленных видов микроспоридий, их активная экспрессия в ходе жизненного цикла паразитов не была подтверждена экспериментально. Для изучения этого вопроса мы осуществили (1) выделение общей РНК из спор и стадий внутриклеточного развития микроспоридии *P. grylli*, (2) удаление примеси геномной ДНК в пробах с помощью обработки ферментом ДНКазы I, (3) синтез кДНК с помощью фермента обратная транскриптаза (ОТ) и праймера олиго-dТ в качестве затравки. Для анализа присутствия транскриптов гена *ANCI* в приготовленных пробах методом ОТ-ПЦР использована пара праймеров, специфично амплифицирующая 3'-концевой фрагмент гена размером 266 пн (Рисунок 7, А). Неоходимость использования таких праймеров связана с тем, что при использовании олиго-dТ праймера для синтеза кДНК, эффективность последующей ПЦР-амплификации снижается для протяженных последовательностей (более 1000 пн) по сравнению с 3'-концевыми небольшими фрагментами. В качестве отрицательного контроля в ПЦР была использована смесь для синтеза кДНК без добавления обратной транскриптазы. Как показали результаты проведенного эксперимента, активная экспрессия гена *ANCI* и присутствие соответствующих мРНК-транскриптов наблюдается как в спорах паразита, так и в стадиях внутриклеточного развития (Рисунок 7, Б). В контрольных пробах, где обратная транскриптаза не была добавлена в смесь для синтеза кДНК, образование ПЦР-продукта не наблюдалось (Рисунок 7, Б, споры) или было

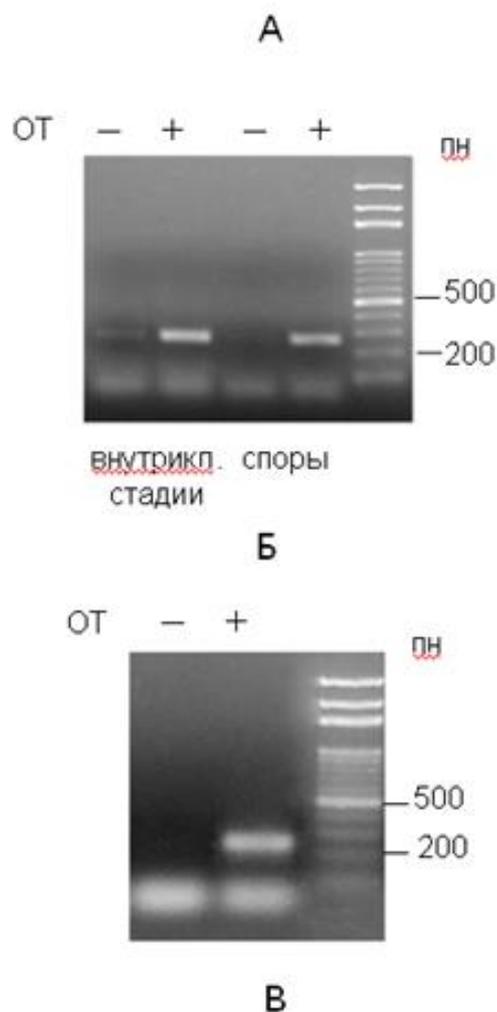
очень незначительным (Рисунок 7, Б, стадии внутриклеточного развития). Присутствие слабой полосы в случае отрицательного контроля для внутриклеточных стадий свидетельствовало о недостаточной эффективности обработки РНК ферментом ДНКазой I и присутствии в пробах незначительной примеси геномной ДНК микроспоридий. Повторная обработка РНК стадий внутриклеточного развития ДНКазой I полностью разрушила остатки геномной ДНК паразита в пробе (Рисунок 7, В).

Поскольку синтез кДНК проведен с использованием приблизительно равного количества суммарной РНК спор и стадий внутриклеточного развития (2.5 мкг на 20 мкл реакционной смеси), можно говорить о приблизительно одинаковом уровне мРНК-транскриптов гена *ANCI* в стадиях внутриклеточного развития и спорах *P. grylli*. Активная экспрессия гена, кодирующего АТФ/АДФ-переносчик, была ожидаема при внутриклеточном развитии микроспоридий. Именно на этой стадии наблюдается наиболее тесное взаимодействие паразита с метаболической системой хозяина. Высокий уровень экспрессии *ANCI* в спорах, сравнимый с уровнем экспрессии гена в стадиях внутриклеточного развития, оказался неожиданным. Возможно, присутствие мРНК-транскриптов в спорах микроспоридий может быть связано с преадаптацией спороплазм к заражению нового хозяина, что в свою очередь подразумевает важную роль переносчика уже на первых этапах заражения нового хозяина.

### **2.3.6. Анализ полученных данных и сопоставление с результатами других исследований.**

Наличие у микроспоридий генов, кодирующих, белки близкие к пластидно-бактериальным АТФ/АДФ-переносчикам, является результатом их горизонтального переноса от одного организма к другому. В пользу данного утверждения свидетельствуют следующие аргументы. Во-первых, филогенетически близкие к грибам микроспоридии никогда не имели

g.azfc(1381)AAGGGAATATACGACGGCGTATGTGGAAAACTAGGAAAGGCAATAGGT  
TCTGGTATCACTAACATGCAAAATGTATTTTATAACTCAAGTGATGTGAGAAAAGCCG  
 CTAATTCATCGCTAACAAATTGTTACAGTTATAACTGCATGTTGGGGATTGCTGTAAG  
 GTATTTAGCCGGAAAATACGATAAGTCCACACACTCTAACACAGATATCGACATAGAC  
 TTGATAAACGTGGATCCTATGGAAAAGGATGCTGATGATTATAA(1647)ctc:gag



**Рисунок 7. ОТ-ПЦР анализ экспрессии гена *ANCI* в спорах и стадиях внутриклеточного развития микроспоридии *P. grylli*.**

А. Праймеры используемые для ОТ-ПЦР анализа амплифицируют 3'-концевой фрагмент гена размером 266 пн.

Б. кДНК синтезировали, используя 2.5 мкг общей РНК в 20 мкл реакционной смеси, разводили в 2.5 раза и 4 мкл пробы анализировали с помощью ПЦР.

В. Повторная обработка пробы РНК внутриклеточных стадий с помощью ДНКазы I позволила полностью удалить остатки геномной ДНК в пробе. ОТ-плюс - синтез кДНК в присутствии обратной транскриптазы; ОТ-минус - обратная транскриптаза не добавлена в смесь для синтеза кДНК.

растительных или бактериальных предков и гены кодирующие данные переносчики никогда не были обнаружены в геномах грибов. Во-вторых, мы уже знаем примеры приобретения прокариотических генов микроспоридиями, например, бактериальной каталазы (Fast et al., 2003). В данном исследовании мы впервые показали, что АТФ/АДФ-переносчики пластидно-бактериального типа присутствуют в геномах филогенетически удаленных друг от друга микроспоридий *P. grylli* и *E. cuniculi*. Опубликованная в 2005 году филогенетическая система, основанная на молекулярном анализе последовательностей малой субъединицы рДНК 125 видов микроспоридий (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005), полностью подтвердила удаленность микроспоридий родов *Paranosema* и *Encephalitozoon*. В частности, вид *E. cuniculi* оказался принадлежащим к IV филогенетической кладе (класс Terresporidia), паразитирующей преимущественно у наземных хозяев. В то время как *P. grylli* находится в филогенетической кладе II (класс Aquasporidia), представители которой преимущественно паразитируют в пресноводных беспозвоночных. Таким образом, присутствие генов, кодирующих АТФ/АДФ-переносчики пластидно-бактериального типа в филогенетически удаленных кладах микроспоридий, доказывает их широкое распространение среди представителей группы. Кроме того, мы впервые показали транскрипционную активность одного из генов, кодирующих переносчик *P. grylli*.

Можно полагать, что достаточно давно клетка-предок микроспоридий приобрела последовательность, кодирующую важный белок-переносчик, позволяющий паразиту поглощать готовую АТФ из цитоплазмы зараженной клетки. Несомненно, это событие оказалось очень важным, если не критичным, на пути адаптации этих паразитов к внутриклеточному развитию и, во многом, обусловило уникальный характер взаимоотношений микроспоридий с хозяином, а также их широкое распространение.

Впоследствии наши данные были полностью подтверждены зарубежными исследователями, осуществившими полную или частичную расшифровку геномов нескольких видов микроспоридий, относящихся к филогенетической кладе II (*P. locustae*, *Nematocida* sp.) и кладе IV (представители родов *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*). У всех изученных видов микроспоридий обнаружены гены, кодирующие АТФ/АДФ-переносчики плазмидно-бактериального типа. В 2008 году группа британских исследователей опубликовала в журнале *Nature* данные изучения АТФ/АДФ-переносчиков микроспоридии *E. cuniculi* (Tsaousis et al. , 2008). В исследовании показано, что все четыре транслоказы способны транспортировать АТФ через мембрану паразита и три белка локализуются на поверхности (в плазматической мембране) клетки. Таким образом, полностью подтверждено участие уникальной группы переносчиков в паразитировании микроспоридий на энергетической системе зараженной клетки хозяина.

#### **2.4. Выключение метаболического аппарата клетки микроспоридий при внутриклеточном развитии.**

Данные об эффективном использовании микроспоридиями метаболической системы зараженной клетки с использованием специфичных транспортеров поставили перед исследователями вопрос о том, какова роль собственной метаболической системы в физиологии паразитов. Анализ результатов догеномного изучения ферментов микроспоридии *P. grylli* (Dolgikh et al., 1997; Dolgikh, 2000; Долгих и др., 2002) позволил предположить, что паразиты могут выключать свой собственный метаболизм при внутриклеточном развитии и полностью полагаться на обменные процессы зараженной клетки. С целью проверки этой гипотезы мы решили использовать 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*.

#### **2.4.1. ПЦР-амплификация генов и создание генетических конструкций для экспрессии изучаемых белков в *E. coli*.**

ПЦР-амплификация последовательностей, кодирующих изучаемые белки, осуществлена с помощью высокоточной *Pfu*-полимеразы с использованием геномной ДНК *P. locustae* в качестве матрицы. Список праймеров, использованных для амплификации генов микроспоридий и их фрагментов приведен в Таблице 6. Амплифицированные фрагменты ДНК были встроены в вектор pRSET (Invitrogen, США), созданный для экспрессии чужеродных белков в бактериях *E. coli*. В случае  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц ПДГ, митохондриальной глицерол-3ФДГ (митГ-3-ФДГ), Sec13 субъединицы СОPII полноразмерные копии генов были встроены в вектор pRSETb по сайтам, распознаваемым ферментами рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI. С целью удалить N-концевой гидрофобный регион митГ3ФДГ, кодирующая последовательность была обработана ферментом *Hind*III и фрагмент, ограниченный *Hind*III сайтами, присутствующими в гене (позиция 385) и полилинкере вектора, был переклонирован в плазмиду pRSETc, линеаризованную с помощью того же фермента. Конструкции с правильной ориентацией вставки были отобраны с использованием сайтов *Sac*II, присутствующего в гене (позиция 1436), и *Eco*RI. Фрагмент гена, кодирующего альтернативную оксидазу (АО) (621 bp) был амплифицирован и встроен в вектор pRSETb по сайтам *Bam*HI и *Hind*III. Амплифицированная копия гена фосфофруктокиназы была использована для выделения внутреннего фрагмента (1139 пн) ограниченного сайтами *Sac*I (позиция 520 пн) и *Eco*RI (позиция 1649 пн) и последующего встраивания в вектор pRSETa по тем же сайтам.

Таблица 6

**Список праймеров использованных для ПЦР-амплификации последовательностей кодирующих белки микроспоридии *Paranosema locustae*.**

Кодируемый Белок	Размер гена (п.н.)	Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров (5'-3')
$\alpha$ субъединица фермента E1 ПДГ	1029	<u>GGATCCGATGGACTTTTACGAGGAGAAGGTTG</u> <u>GAATTCAGTTTTTAACGACGTCTCTAAAAAGC</u>
$\beta$ субъединица фермента E1 ПДГ	1002	<u>GGATCCGATGGAAAGTGAATGGATAACCGTG</u> <u>GAATTCCTTAATTCCTGCTGTACTCGGCAG</u>
Альтернативная оксидаза	622 (фрагмент)	<u>GGATCCGATCACACTCTTGGACCTGAGTAGA</u> <u>AAGCTTAGTCTGCCATGCTGTGGTTTGTAT</u>
митохондриальная глицерол-3ФДГ	1770	<u>GGATCCGATGATAAACAACGTACATACACC</u> <u>GAATTCCTTAAAGCATTCCAAGACCCAGGG</u>
фосфофруктокиназа	2484	<u>GGATCCATGGATAGATTGGTAAGCGAGTT</u> <u>CTCGAGTCATTCTATCGACGTGCAGATATT</u>
митHsp70 (митохондриальный)	1747 (фрагмент)	<u>AGGAATAGATCTAGGAACAACAACCT</u> <u>GGTACCTCAAAGCCGGGCCCTGACCTCCT</u>
ЭР-Hsp70 (содержащий сигнальный пептид)	2040	<u>CCATGGATCCATGCTGTTCTGGTFACTAGCTCTC</u> <u>GTCACCTGCAGTCAAAGCTCTTCTCTCATTTTCT</u>
цитHsp70 (без сигнального пептида)	1948 (фрагмент)	<u>ATGCCTCGAGACCAGCAAGGAGATAGATGCA</u> <u>GCATGGTACCTTAAAGCTCCTCCAGCATCTTGATA</u>
Sec13 субъединица СОП	810	<u>ATGCGGATCCGATGGAGGTGCAGAGGGAGATCATACA</u> <u>GCATGAATTCCTTATTCAGACTTCTTCAGCGG</u>
Синтаксин	978	<u>GACTGGATCCGATGACAGAACTGGTCTCTACT</u> <u>ATGCGAATTCCTTATCTGTCTCGTCAGCGTCACGA</u>

\* - подчеркиванием в 5'-области ряда праймеров указаны добавленные сайты для ферментов рестрикции.

ПЦР-амплифицированный фрагмент гена **митохондриальной формы шаперона Hsp70 (митHsp70)** размером 1747 bp был разрезан по внутреннему *Bam*HI сайту (позиция position 1209 полноразмерной копии), сайту *Kpn*I, встроенного в обратный праймер и очищенный фрагмент размером 665 пн был встроен в вектор pRSETb по тем же сайтам. В случае **немитохондриального Hsp70, несущего сигнальный пептид (ЭР-Hsp70)**, ответственный за транслокацию белка в просвет ЭР, в вектор была встроена часть амплифицированной полноразмерной копии гена, кодирующая N-концевую часть белка размером 39.3 кДа (354 аминокислотных остатка). Клонирование осуществляли по сайтам рестрикции *Bam*HI (встроен в состав прямого вектора) и *Eco*RI (внутренний сайт в составе белок-кодирующей последовательности). Для экспрессии **немитохондриального шаперона Hsp70, не имеющего сигнального пептида (цит Hsp70)**, что подразумевает его цитоплазматическую локализацию, в экспрессирующий вектор была встроена полноразмерная копия гена по сайтам *Xho*I и *Kpn*I, включенным в состав прямого и обратного праймеров. Полноразмерная копия гена, кодирующего SNARE- белок **синтаксин**, была встроена в вектор pRSETa по сайтам *Bam*HI и *Eco*RI. Полученные конструкции были проверены с помощью секвенирования около 600 нуклеотидов ниже промотора T7, встроенного в вектор pRSET.

#### **2.4.2. Гетерологичная экспрессия белков в бактериях *E. coli*, выделение рекомбинантных продуктов и получение специфичных антител.**

Сравнительный анализ экспрессии изучаемых генов показал более эффективное накопление всех рекомбинантных продуктов в штамме C41 *E. coli* (Bezoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011; Долгих и др., 2012), за исключением фрагмента АОХ. Последний более эффективно экспрессировался в штамме C43 (Dolgikh et al., 2011).

При экспрессии рекомбинантных белков наблюдалось токсичное воздействие чужеродного белка на рост бактерий. Несмотря на то, что на чашках с твердой средой LB и ампицилином вырастали колонии нормального размера, при добавлении в среду индуктора экспрессии ИПТГ развития колоний не наблюдалось. Наиболее эффективная экспрессия изучаемых рекомбинантных белков наблюдалась при инокуляции свежих колоний в жидкую среду LB и культивировании в течение ночи при 37° С после добавления в среду индуктора экспрессии ИПТГ. При этом все рекомбинантные продукты, за исключением С-концевого фрагмента митохондриальной формы молекулярного шаперона Hsp70 и цитHsp70 накапливались в бактериях в виде нерастворимых белковых включений, что в значительной степени упростило процедуру их очистки. Для выделения белков требовалось лишь разрушить бактериальные клетки ультразвуком, осадить и отмыть белковые включения с помощью низкоскоростного центрифугирования, а затем экстрагировать рекомбинантные белки в присутствии 8 М мочевины. Исключение составил SNARE-белок синтаксин, специфично экстрагируемый из нерастворимой фракции разрушенных бактерий с помощью неионного детергента Triton X-100. Этот результат, а также наличие С-концевого трансмембранного домена в составе данного и других SNARE - белков предполагают специфичное накопление рекомбинантного продукта в мембранах *E. coli*.

В случае молекулярных шаперонов Hsp70, накапливающихся в растворимой форме в цитоплазме бактерий, эффективная очистка рекомбинантных продуктов была достигнута с помощью металло-хелатной аффинной хроматографии на Ni-содержащих колонках. Рекомбинантные белки, содержащие N-концевую последовательность, состоящую из 6 гистидиновых остатков (6xHis) в составе вектора, избирательно связывались с аффинной смолой и специфично элюировались повышенной концентрацией имидазола (0.25 М), конкурирующего с остатками гистидина

за связывание с ионами никеля. Анализ выделенных белков с помощью ДСН-ПААГЭ показал высокую степень очистки рекомбинантных белков достаточную для получения специфичных антител.

Молекулярный вес всех рекомбинантных продуктов соответствовал размеру, предсказанному согласно аминокислотной последовательности с дополнительным N-концевым пептидом (4кДа), входящим в состав вектора.

Для получения иммунных сывороток кроликов иммунизировали выделенными рекомбинантными белками и поликлональные антитела дополнительно очищали иммуноаффинным методом, как описано в Главе 1. Полученные специфичные антитела использованы для анализа содержания белков в спорах и стадиях внутриклеточного развития микроспоридий с помощью иммуноблоттинга.

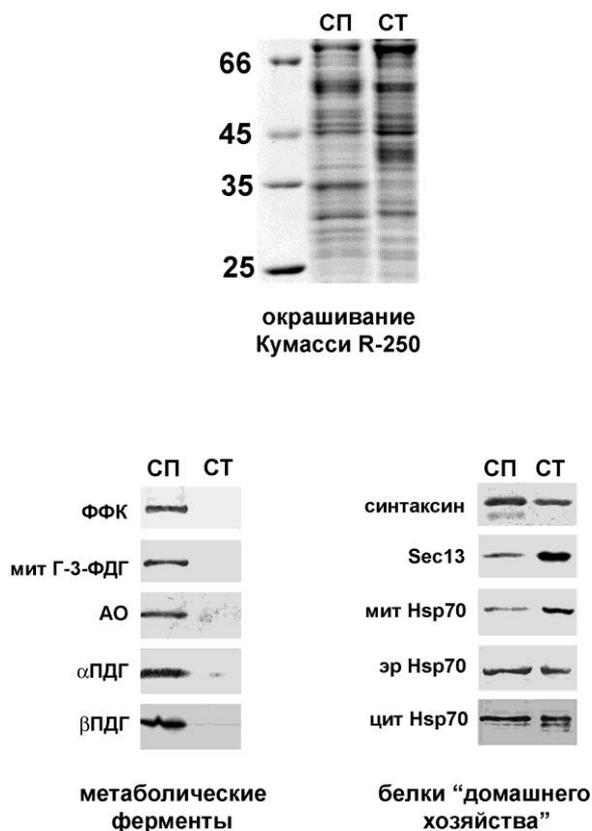
#### **2.4.3. Сравнительный анализ содержания метаболических ферментов и белков «домашнего хозяйства» в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*.**

Для проведения данного эксперимента стадии внутриклеточного развития *P. locustae* выделяли из жирового тела зараженной саранчи в градиенте плотности Перколла с помощью использованного нами ранее метода (Seleznev et al., 1995). Выделенные стадии разрушали в буфере ТС (50 mM Трис-Cl (pH 8.0), 0.3M сахараза) с помощью ультразвука и в полученных пробах определяли содержание белка. Споры, очищенные с помощью низкоскоростного центрифугирования, разрушали механически (встряхиванием в присутствии стеклянных бус) в том же буфере. Дебрис осаждали с помощью низкоскоростного центрифугирования и в осветленном гомогенате определяли концентрацию белка. Это позволило нанести на гель для иммуноблоттинга одинаковое количество белка (приблизительно 20 мкг) спор и стадий внутриклеточного развития (Рисунок 8).

Вестерн-гибридизация перенесенных на нитроцеллюлозную мембрану белков с антителами, полученными к соответствующим рекомбинантным продуктам, показала специфичное накопление всех пяти изученных ферментов углеводного и энергетического метаболизма в зрелых спорах, но не мерогональных и спорогональных стадиях внутриклеточного развития микроспоридий (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al., 2011; Williams et al., 2014).

При этом в тех же самых пробах спор и стадий паразитов наблюдалось приблизительно одинаковое содержание таких компонентов «домашнего хозяйства», как молекулярные шапероны семейства Hsp70 и белки, вовлеченные в процессы внутриклеточного транспорта и секреции (SNARE-белок синтаксин и Sec13 субъединица комплекса COPII). Последний результат неоспоримо доказывает, что наблюдаемое отсутствие ферментов метаболизма в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae* не является следствием потери или деградации белков в ходе выделения клеток паразита. В данном случае мы действительно имеем дело с различным уровнем экспрессии метаболических ферментов и белков, вовлеченных в другие физиологические процессы, в ходе жизненного цикла микроспоридий.

Наиболее вероятным объяснением полученного результата является глубокая метаболическая зависимость микроспоридий от обменных процессов клетки хозяина. Полученные данные свидетельствуют о том, что при внутриклеточном развитии микроспоридии выключают свой метаболизм и поглощают субстраты пластического и энергетического обмена (включая АТФ) из цитоплазмы клетки хозяина. При этом паразит вынужден сохранять собственный метаболический аппарат, пусть и в сильно редуцированной форме, для энергетического обеспечения спор - стадии жизненного цикла, предназначенной для пребывания паразита вне клетки хозяина. Споры нуждаются в собственных эндогенных источниках энергии для обеспечения



**Рисунок 8. Вестерн-блот анализ белков *P. locustae* с антителами к рекомбинантным белкам, экспрессированным в *E. coli*.**

Гомогенат спор микроспоридий, осветленный при 100 g в течение 10 мин (сп) и стадии внутриклеточного развития, выделенные в градиенте плотности Перколла (ст) выровнены по концентрации общего белка и равные аликвоты обеих проб нанесены на гель. Иммуноблотинг белков паразита с помощью антител к метаболическим ферментам и антител к «белкам домашнего хозяйства» ясно показал, что микроспоридии выключают собственную метаболическую систему при внутриклеточном развитии. 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 СОPII, Hsp70 - молекулярные шапероны семейства Hsp70 различной внутриклеточной локализации.

длительного (до нескольких лет) переживания и сохранения своей инвазионности во внешней среде (Vávra and Larsson, 1999).

Полученные данные позволяют заключить, что удивительная минимизация функционального аппарата клетки микроспоридий, выявленная при расшифровке их геномов (Akiyoshi et al., 2009; Cornman et al., 2009; Corradi et al., 2009; Corradi et al., 2010; Keeling et al., 2010; Cuomo et al., 2012; Heinz et al., 2012; Katinka et al., 2001), оказалась еще более выраженной в стадиях внутриклеточного развития. Наши данные убедительно показали, что меронты и споронты микроспоридий не только в значительной степени полагаются на метаболическую систему зараженной клетки, но и выключают свой энергетический обмен при внутриклеточном развитии.

#### **2.4.4. Сопоставление полученных результатов с данными других исследований.**

Первые данные о метаболической инертности мерогональных и спорогональных стадий внутриклеточного развития микроспоридий по сравнению со спорами опубликованы нами в коллективной монографии «The Microsporidia and Microsporidiosis» (Weidner et al., 1999). Однако, только использование новых методологических подходов, связанных с гетерологичной экспрессией белков паразита в *E. coli* и выработкой специфичных антител к рекомбинантным продуктам, позволило получить неопровержимые доказательства того, что микроспоридии не используют собственный метаболический аппарат для обеспечения процессов мерогонии и спорогонии. В 2009 году мы впервые показали, что альфа и бета субъединицы E1 компонента пируватдегидрогеназного комплекса специфично накапливаются в спорах микроспоридии *P. locustae*, но не в стадиях внутриклеточного развития (Dolgikh et al., 2009). В 2011 году опубликованы данные о специфичном накоплении в спорах других ферментов углеводного и энергетического обмена, но не молекулярных

шаперонов семейства Hsp70 и белков, вовлеченных во внутриклеточный транспорт и секрецию (Долгих и др., 2011; Dolgikh et al., 2011). Поскольку аналогичные данные о накоплении гликолитического фермента фосфоглицерат киназы в спорах, но не в вегетативных стадиях внутриклеточного развития микроспоридии *Trachipleistophora hominis* были опубликованы позднее (Heinz et al., 2012), приоритет нашей группы в изучении этого вопроса очевиден. В этой же работе (Heinz et al., 2012) с помощью протеомного анализа обнаружено накопление в спорах *T. hominis* таких метаболических ферментов как трегалаза, ферменты гликолиза, альтернативная оксидаза и глицерол-3-фосфатДГ, что еще раз подтвердило правильность сделанных нами ранее выводов. Окончательный вывод о специфичном использовании микроспоридиями собственного метаболизма на стадии споры опубликован нами в международной коллективной монографии «Microsporidia: Pathogens of Opportunity», изданной в 2014 году в США (Williams et al., 2014).

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.**

### **3.1. Состояние проблемы к началу исследований.**

#### **3.1.1. Данные о метаболических особенностях спор микроспоридий, накопленные к середине 90-х годов прошлого столетия.**

Прежде всего, следует отметить, что на первом этапе изучения биохимии микроспоридий все исследования выполнялись именно на спорах. Основной причиной внимания исследователей к спорам микроспоридий являлось отсутствие методик выделения и очистки внутриклеточных стадий развития этих паразитов (Селезнев и др., 1994; Seleznjov et al., 1995). При этом предполагалось, что уровень обменных процессов, протекающих в спорах, должен быть достаточно низок, так как их жизнеспособность у некоторых видов сохраняется после нескольких лет хранения (Weidner, 1976a). Однако в свете результатов исследований, описанных в главе 2, следует подчеркнуть, что изучение биохимии микроспоридий при внутриклеточном развитии сильно затруднено и по другой причине - эти паразиты выключают и практически не используют собственный метаболический аппарат при эксплуатации обменных процессов хозяина.

Как уже отмечено во введении, главная особенность физиологии микроспоридий, выявленная при помощи электронной микроскопии - отсутствие на всех стадиях жизненного цикла митохондрий, лизосом и каких либо включений, образуемых запасными питательными веществами. С одной стороны, отсутствие митохондрий позволяло предположить, что микроспоридии обеспечивают свои энергетические потребности за счет анаэробных процессов углеводного катаболизма, как это имеет место у других амитохондриальных простейших (Muller, 1988). С другой стороны, в филогенетических построениях первой половины 90-х годов

микроспоридии были перенесены в отдельное царство Archezoa (Corliss, 1994) и могли обладать уникальными особенностями, отличающими их от других простейших. Существовало даже предположение, что цитоплазматическая мембрана микроспоридий содержит компоненты дыхательной цепи (Liu, Davies, 1973).

**Липиды.** Экстракция этилацетатом и последующая тонкослойная хроматография выявили в спорах *Nosema apis* фракцию жирных кислот с такой же, как у олеиновой кислоты подвижностью, фракцию холестерина и зону с подвижностью немного меньшей, чем у триолеина и холестерилолеата (Vandermeer, Gochnauer, 1971a). Состав жирных кислот впервые детально изучен в спорах трех видов микроспоридий: *Thelohania maenadis*, *Ameson (Nosema) pulvis* и *Ormieresia carcini*, паразитирующих в мускулатуре одного хозяина - краба *Carcinus mediterraneus* (Vivares et al., 1980b). Исследование выявило отличия между видами паразитов в содержании различных жирных кислот. При этом наиболее интересно очень высокое содержание линолевой кислоты (43% от общего количества) в спорах микроспоридии *T. maenadis*, в то время как у двух других видов ее содержание не превышало 1%. В спорах *T. maenadis* преобладали линолевая (43%) и олеиновая (23.8%) кислоты. В спорах же *A. pulvis* и *O. carcini* преобладали пальмитиновая (15.7 и 26.6% соответственно) и олеиновая (16 и 16.7%) кислоты. К сожалению, в литературе отсутствовали какие-либо данные об особенностях липидного метаболизма у микроспоридий.

**Аминокислоты.** Бумажная хроматография (Ватман No1) супернатанта спор *Nosema apis*, инкубированных при 55°C в течение 10 мин, выявила выделение в окружающую воду следующих аминокислот: аспартат, глутамат, серин, глицин, аланин, валин и лейцин. Гидролиз того же супернатанта спор 6N HCl в течение 22 часов при 110°C позволил определить содержание 14 аминокислот и аммония с помощью автоматического аминокислотного анализатора (Vandermeer, Gochnauer,

1969). Аминокислотный состав белка полярной трубки микроспоридии *Nosema michaelis* изучен Вайднером (Weidner, 1976b). В состав белка входят 17 аминокислот, из которых преобладают глицин и глутамат (30 и 25 остатков на молекулу белка соответственно). Лизин, аспартат, треонин, серин, глутамат, пролин, глицин, аланин и валин определены как свободные аминокислоты в спорах трех видов микроспоридий, принадлежащих к родам *Glugea* и *Inodosporus* (Weidner, 1976b). Однако наиболее детальное изучение качественного и количественного содержания свободных и белковых аминокислот выполнено на спорах четырех видов микроспоридий, паразитирующих в морских ракообразных (Vivares et al., 1980a). Виды *T. taenadis*, *O. carcini* и *A. pulvis* паразитируют в *C. mediterraneus*, в то время как *Inodosporus* sp. в *Palaemon serratus*. В их белках выявлены 17 аминокислот. При этом содержание аспартата, глутамата и лизина для всех четырех видов было наиболее высоким. Исключение составляет лишь преобладание фенилаланина в белках спор *O. carcini*. Изучение содержания свободных аминокислот выявило некоторые количественные, но не качественные отличия между видами. Следует отметить, что в спорах *O. carcini* наблюдалась высокая концентрация орнитина (4 мкмоль / г сырого веса), в то время как в спорах трех других видов орнитин не обнаружен.

Имеющиеся немногочисленные данные позволяют заметить, что между разными видами микроспоридий существуют различия в содержании аминокислот. Это вероятно связано с метаболическими особенностями паразитов.

**Углеводы.** Как отмечалось выше, запасные полисахариды (гликоген, амилопектин, крахмал) не обнаружены у микроспоридий в форме каких либо включений. В то же время инкубация спор *Nosema apis* при температуре 55°C приводила к выделению в окружающую среду больших количеств дисахарида трегалозы (Wood et al., 1970). В разрушенных спорах того же вида была выявлена активность трегалазы - фермента, гидролизующего

трегалозу с образованием двух молекул глюкозы (Vandermeer, Gochnauer, 1971b). рН оптимум действия фермента равен 7.0, а температурный оптимум составляет 40-45°C. Обнаружение трегалозы и трегалазы позволило авторам предположить, что именно трегалоза служит запасным углеводом для микроспоридий.

В спорах микроспоридии *Nosema algerae* концентрация трегалозы составила приблизительно 0.4 М (Undeen et al., 1987). Трегалазная активность также была обнаружена в спорах этого вида. Фермент выявлялся как в растворимой, так и нерастворимой фракциях гомогената спор. рН оптимум действия фермента оказался равным 5.5 для супернатанта и 5.25 для осадка. Температурный оптимум для этих форм составил 43.7°C и 43.9°C, а Км соответственно 26 и 25 мМ. Экструзия спор *N. algerae* приводила к снижению в 3 раза содержания трегалозы и резкому возрастанию содержания глюкозы. В то же время в спорах после экструзии часть трегалазы, ассоциированная с растворимой фракцией, была больше, чем в интактных спорах. Все это позволило авторам предположить еще одну возможную функциональную роль для трегалозы и трегалазы: создание осмотического давления в результате расщепления одной молекулы трегалозы на две молекулы глюкозы (Undeen et al., 1987; Undeen, 1990). Наряду с трегалозой и глюкозой в спорах *N. apis* обнаружены сорбитол (Vandermeer, Gochnauer, 1969; Wood et al., 1970) и очень низкая концентрация фруктозы (Wood et al., 1970).

**Ферменты.** К середине девяностых годов прошлого столетия трегалаза являлась единственным относительно полно изученным ферментом микроспоридий. Кроме неё, следует отметить гистохимическое выявление после электрофоретического разделения в крахмальном геле фосфоглюкоизомеразы, фосфоглюкомутазы и малатдегидрогеназы в спорах *Nosema heterosporum*, а также фосфоглюкомутазы в спорах *Vairimorpha necatrix* и малатдегидрогеназы в спорах *Amblyospora* sp. (Hazard et al., 1981).

Однако, к сожалению, авторы не описали методики приготовления проб для электрофореза и эта работа не имела продолжения. В обсуждении результатов изучения активности лактатДГ в клетках кишечника и жирового тела гусениц капустной совки при микроспориidioзе сообщается, что в спорах паразитов активность фермента составляла 10% наблюдаемой у хозяина (Kucera, 1975). Однако полностью эти данные нигде не опубликованы.

**Метаболизм полиаминов.** Отдельно следует остановиться на данных о метаболизме полиаминов у паразита человека - микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi* (Coyle et al., 1996). Этот метаболический путь привлек внимание исследователей как перспективный для химиотерапии микроспориidioзов человека при иммунодефиците. В работе показано, что развитие микроспоридий в клетках RK13 подавляется N',N''-бис(этил)норспермином (BE-3-3-3) - антагонистом в реакции, катализируемой спермидин/спермин N'ацетилтрансферазой. В то же время, ингибитор S-аденозилметионин декарбоксилазы MDL73811 не оказывал влияния на рост микроспоридий *in vitro*. D,L-а-дифлуорометил орнитин (DFMO) - ингибитор орнитин декарбоксилазы, эффективный агент против трипаносом, напротив положительно влиял на развитие *E. cuniculli* (30% зараженных клеток по сравнению с 21% в контроле). В спорах микроспоридий хроматографическим методом обнаружено высокое содержание спермидина и спермина (1626 и 925 пмоль/мг, соответственно), в то время как содержание путресцина составило только 9.1 пмоль/мг. Активность орнитин декарбоксилазы в спорах составила 45.5 пмоль/час/мг белка при pH 6.5 и 46.7 пмоль/час/мг белка при pH 7.5. Кроме того, в спорах выявлялась активность спермидин/спермин N'ацетилтрансферазы (2.4 нмоль/30 мин/мг белка) если в качестве субстрата использовался спермин, но не спермидин. В то же время, активность S-аденозилметионин декарбоксилазы, участвующей в синтезе спермидина из

путресцина и S-аденозилметионина, не была обнаружена. Полученные данные позволили авторам предположить, что микроспоридии способны взаимопревращать некоторые полиамины.

На основании рассмотренных выше данных можно заключить, что биохимические особенности микроспоридий к середине 90-х годов прошлого столетия оставались почти неизученными. Имеющиеся крайне немногочисленные данные были получены для различных видов и не позволяли описать целостную картину метаболизма этих паразитов. Это послужило причиной начала исследований, выполненных нами в рамках кандидатской диссертации и посвященных поиску ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах микроспоридии *P. grylli*. Прежде чем приступить к рассмотрению результатов этой работы, представляется полезным кратко рассмотреть особенности обеспечения энергией у других видов эндопаразитических простейших. Это позволит сравнить данные, полученные для микроспоридий, с метаболическими особенностями других паразитов.

### **3.1.2. Особенности энергетического обмена эндопаразитических простейших.**

Отсутствие митохондрий у микроспоридий в некоторой степени сближает их с такими амитохондриальными эндопаразитическими простейшими как трихомонады (*Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis*), *Giardia*, *Entamoeba*. Однако в отличие от других амитохондриальных простейших микроспоридии развиваются только внутри клетки хозяина и в этом отношении они ближе к внутриклеточным и развивающимся в кровеносном русле позвоночных формам жгутиконосцев (трипаносомы, лейшмании) и споровиков, у которых митохондрии имеются. В связи с этим мы кратко рассмотрим энергетический метаболизм наиболее хорошо изученных видов, относящихся как к той, так и к другой группе.

Энергетический обмен изученных к настоящему времени видов эндопаразитических простейших имеет следующие общие особенности:

1. Основные соединения, используемые эндопаразитами для обеспечения энергией, а также запасаемые в виде гликогена или амилопектина, представлены углеводами (Сопрунов, 1987).

2. Глюкоза катаболизируется в сходных реакциях гликолиза до фосфо(енол)пирувата и далее до пирувата. Этапы гликолиза для всех видов протекают одинаково. Однако существует одно интересное исключение. У представителей рода *Entamoeba* в некоторых реакциях гликолиза вместо АТФ используется пирофосфат. ФФН-зависимый фермент у этих организмов катализирует фосфорилирование фруктозо 6-фосфата с образованием фруктозо 1,6-дифосфата (Reeves et al., 1974). Превращение ФЕП в пируват осуществляется также ФФН-зависимой пируватфосфатдикиназой (Reeves, 1968).

3. Конечные этапы углеводного катаболизма значительно отличаются у различных видов. Это связано с тем, что разные виды по-разному реокисляют НАДН, образующийся в ходе гликолиза в реакции, катализируемой глицеральдегид 3-фосфатДГ. Мы кратко рассмотрим конечные этапы энергетического обмена наиболее хорошо изученных к настоящему времени видов паразитических простейших.

**Представители типа Apicomplexa.** Исследования, проведенные на внутриэритроцитарных стадиях представителей рода *Plasmodium*, показали, что малярийные паразиты реокисляют НАДН при помощи лактатДГ, превращая пируват в лактат. В этом отношении паразиты оказываются метаболически сходными с клеткой хозяина (Sherman, 1979). Этот достаточно неэкономичный путь катаболизма глюкозы с выделением молочной кислоты играет главную роль в энергетическом обмене малярийных плазмодиев, что вероятно и объясняет выявленную у них в 10-

30 раз более высокую скорость поглощения глюкозы по сравнению с эритроцитом (Bowman et al., 1960).

Среди эймериевых кокцидий наиболее хорошо изучены представители родов *Eimeria* и *Toxoplasma*. Цитохимическими методами у различных стадий жизненного цикла *Toxoplasma gondii* и у различных видов рода *Eimeria* обнаружены ферменты цикла Кребса (сукцинатДГ, изоцитратДГ, малатДГ), пентозо-фосфатного пути (глюкозо 6-фосфатДГ, 6-фосфоглюконатДГ), а также лактатДГ и глицерол 3-фосфатДГ (Frandsen, 1968; Акао, 1971; Бейер и др., 1977, 1978; Хованских, 1984). Биохимические исследования, выполненные на ооцистах кокцидий, подтвердили полученные цитохимическими методами данные (Shirley, 1975; Wang, 1976). В целом можно сказать, что на определенных этапах жизненного цикла кокцидии используют аэробные процессы для своего обеспечения энергией. При этом  $\alpha$ -глицерофосфатный челнок играет важную роль при переносе в митохондрии восстановленных эквивалентов и окислении с помощью глицерол 3-фосфатДГ НАДН, образующегося в гликолизе. При анаэробном типе обмена у споровиков главную роль, по всей видимости, играет образование молочной кислоты при участии лактатДГ, как это имеет место у возбудителей малярии.

**Аэробные эндопаразитические жгутиконосцы.** Представители семейства *Trypanosomatidae* характеризуются разнообразием морфологических форм и сложным жизненным циклом со сменой хозяев. Разные экологически и морфологически формы отличаются и особенностями энергетического метаболизма. Обитающие в кровеносном русле формы не имеют функционирующих митохондрий и свои энергетические потребности обеспечивают за счет процессов гликолиза. Для них, как и для малярийных паразитов, характерен очень высокий уровень гликолиза. Одна клетка *Trypanosoma brucei* за час поглощает количество глюкозы, равное ее массе без воды (Fairlamb, Opperdoes, 1986). При аэробных условиях

пируват представляет собой единственный конечный продукт гликолиза, а генерируемый в ходе гликолиза НАДН реокисляется цитоплазматической глицерол 3-фосфатДГ. Поступающий в митохондрии глицерол 3-фосфат вновь превращается в диоксиацетонфосфат под действием цианид-нечувствительной митохондриальной глицерол 3-фосфатоксидазы. Электроны в конечном итоге переносятся на кислород (Oppenheimer, 1987). При анаэробных условиях или ингибировании активности глицерол-3-фосфатоксидазы глицерол 3-фосфат не переносится в митохондрии, а превращается в глицерол при помощи глицеролкиназы. В результате этой реакции образуется молекула АТФ. У трипаносом обнаружены особые органеллы - гликосомы, в которых осуществляется большинство реакций гликолиза. Так, при анаэробном типе энергетического обмена в гликосоме 1 молекула глюкозы превращается в 1 молекулу глицерина и 1 молекулу 3-Ф-глицерата. Таким образом, в гликосомах соблюдается строгий баланс образуемых и расходуемых молекул АТФ и НАДН. Образование дополнительной молекулы АТФ происходит в цитоплазме в результате реакции, катализируемой пируваткиназой (Oppenheimer, 1987).

При попадании в среднюю кишку кровососущих насекомых у формирующихся проциклических форм *T. brucei* образуются хорошо развитые, чувствительные к цианидам митохондрии с развитыми кристами и цитохромами (Vickerman, 1965). Это позволяет паразитам использовать в качестве источника энергии аминокислоты и жирные кислоты, тогда как активность ферментов гликолиза снижается (Hart et al., 1984; Oppenheimer et al., 1981). К отличительным особенностям проциклических форм относятся также высокая активность ФЕП-карбоксикиназы и МДГ в гликосомах наряду с отсутствием в цитоплазме пируваткиназы. В этом случае НАДН, образуемый глицеральдегид 3-фосфатДГ, реокисляется малатДГ, использующей оксалоацетат, образующийся из ФЕП при помощи ФЕП-карбоксикиназы. Малат, образующийся в результате реакции,

катализируемой малатДГ, переносится в митохондрии и превращается в сукцинат за счет обращенных реакций ЦТК (Oppendoes, 1987). Для многих видов кинетопластид уже давно выявлены все компоненты дыхательной цепи и ферменты цикла Кребса (Gutteridge, Rogerson, 1979; Marr, 1980).

**Амитохондриальные эндопаразитические простейшие.** Как и другие эндопаразиты, изученные анаэробные протисты *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* и трихомонады (*Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis*) метаболизируют глюкозу гликолитическим путем. При этом у *G. lamblia* и *E. histolytica* пируват превращается в ацетат, этанол и CO<sub>2</sub> (Weinbach, Diamond, 1974; Jarroll et al., 1989). Состав конечных продуктов зависит от содержания кислорода в окружающей среде. При аэробных условиях *E. histolytica* образует в качестве конечных продуктов ацетат, этанол и CO<sub>2</sub>, а при анаэробных условиях только этанол и CO<sub>2</sub> (McLaughlin, Aley, 1985; Lo, Reeves, 1978). У *G. lamblia* при аэробных условиях продуцируется в 6 раз больше ацетата, чем этанола, а при анаэробных по крайней мере в 2 раза больше этанола, чем ацетата.

Трихомонады характеризуются наибольшим разнообразием конечных продуктов анаэробного катаболизма. *T. vaginalis* восстанавливает пируват при помощи лактатДГ. Наряду с этим, *T. vaginalis* и *T. foetus* образуют глицерол из диоксиацетонфосфата под действием ферментов НАДФ-зависимой глицерол 3-фосфатДГ и глицерол 3-фосфатазы (Lindmark et al., 1989). *T. foetus* продуцирует также сукцинат в качестве основного конечного продукта. Сукцинат образуется из ФЕП при помощи ФЕП-карбоксикиназы, малатДГ, фумаратгидратазы и фумаратредуктазы (Lindmark et al., 1989). Значительные количества пирувата метаболизируются также в специальных органеллах - гидрогеносомах, не найденных у других простейших (Muller, 1988). Под действием пируват/ферредоксин оксидоредуктазы (пируватсинтазы) пируват превращается в ацетил-СоА и далее в ацетат. При анаэробных условиях электроны переносятся на протоны

водорода под действием  $H_2$ /ферредоксин оксидоредуктазы и в качестве конечных продуктов образуются ацетат,  $H_2$  и  $CO_2$  (Steinbuchel, Muller, 1986). Гидрогеносомы могут также продуцировать малат из пирувата под действием НАД-зависимой декарбоксилирующей малатДГ и НАД/ферредоксин оксидоредуктазы. Однако малат не представляет собой конечный продукт метаболизма трихомонад. При аэробных условиях *T. vaginalis* переносит электроны от НАДН и НАДФН на кислород при помощи растворимых оксидаз (Linstead, Bradley, 1988).

### **3.1.3. Активность ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах микроспоридии *P. grylli*.**

Обзор литературы показал, что все изученные виды эндопаразитических простейших используют катаболизм углеводов (глюкозы) в процессе гликолиза для обеспечения энергетических потребностей. Поскольку для микроспоридий гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса) не был описан, в первую очередь, было необходимо доказать его наличие у этой группы паразитов. Данное исследование было выполнено в рамках кандидатской диссертации Долгих В. В. В очищенных зрелых спорах микроспоридии *P. grylli* были измерены удельные активности шести ключевых гликолитических ферментов. Использованный в работе спектрофотометрический метод позволил выявить в гомогенате спор активности фосфоглюкоизомеразы, фосфофруктокиназы, альдолазы, фосфоглицераткиназы и пируваткиназы. При этом удельная активность гексокиназы - ключевого фермента гликолиза, катализирующего АТФ-зависимое фосфорилирование глюкозы, была ниже предела чувствительности использованной методики ( $<0.1-0.2$  нмоль/мин  $\times$  мг белка). Низкую активность гексокиназы в спорах микроспоридий наблюдали наряду с чрезвычайно высокой активностью следующего фермента гликолиза - фосфоглюкоизомеразы. Столь высокое соотношение

активностей фосфоглюкоизомеразы и гексокиназы - уникальное свойство спор микроспоридий по сравнению с другими организмами (Долгих и др., 1996; Dolgikh et al., 1997).

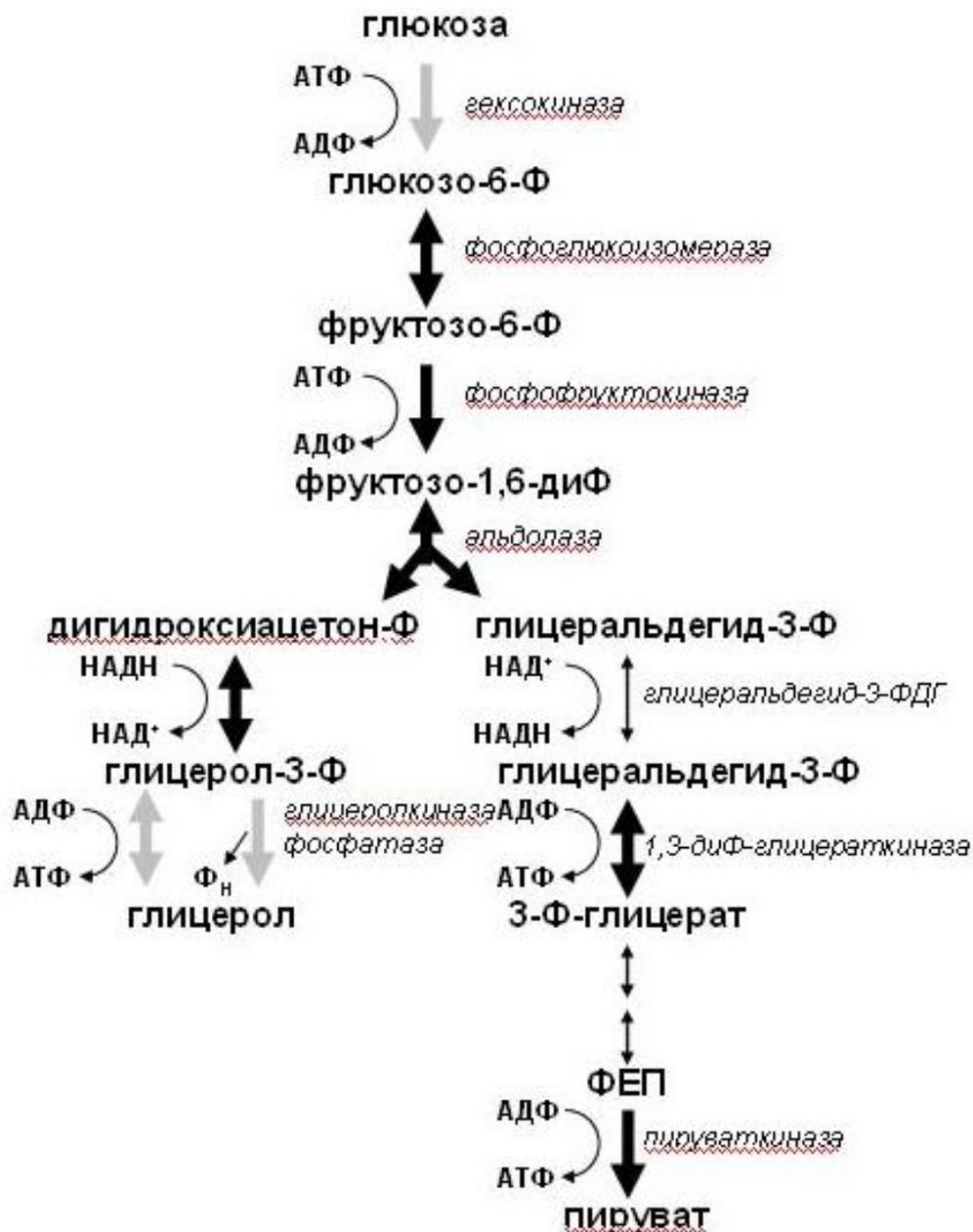
Для изучения заключительных этапов углеводного катаболизма у микроспоридий в спорах *P. grylli* были тестированы активности 9 ферментов, потенциально вовлеченных в эти процессы. В ходе исследования мы не смогли тестировать в гомогенате спор активности лактатДГ (молочнокислородное брожение), НАД- и НАДФ-зависимых алкогольДГ (спиртовое брожение), НАД-зависимой малатДГ и сукцинатДГ (янтарнокислородное брожение), а также малик-энзима (НАДФ-зависимая декарбоксилирующая малатДГ, превращающая пируват в малат). Единственным ферментом, выявленным в спорах *P. grylli*, оказалась НАД-зависимая глицерол 3-фосфатДГ (Долгих и др., 1996; Dolgikh et al., 1997).

У других эндопаразитических простейших глицерол-3-фосфат, образуемый глицерол-3-фосфатДГ, либо переносится в митохондрии с помощью  $\alpha$ -глицерофосфатного челнока (кокцидии и кинетопласты при аэробных условиях), либо превращается в глицерол (трихомонады и кинетопласты при анаэробных условиях). У трипаносом превращение глицерол 3-фосфата в глицерол осуществляется с помощью фермента глицеролкиназы и сопровождается синтезом АТФ. У трихомонад данная реакция катализируется глицерол 3-фосфатазой и синтезом АТФ не сопровождается. С целью изучения дальнейшей судьбы глицерол 3-фосфата мы предприняли тестирование активности глицеролкиназы в спорах *P. grylli*. Кроме того, мы проверили способность гомогената спор дефосфорилировать глицерол 3-фосфат с образованием фосфата (специфичная или неспецифичная фосфатазы). Проведенные исследования не выявили в спорах микроспоридий какой-либо активности, отвечающей за образование глицерола из глицерол 3-фосфата.

На основании полученных данных можно было предположить, что конечными продуктами гликолиза в спорах микроспоридий являются глицерол 3-фосфат и пируват, поскольку кроме глицерол 3-фосфатДГ какие-либо ферменты, участвующие в образовании конечных продуктов, нами не обнаружены. Основанная на наших данных схема энергетического обмена спор не обеспечивала положительный выход АТФ (Рисунок 9). В ходе превращения каждой молекулы глюкозы во фруктозо-1,6-дифосфат расходуется 2 молекулы АТФ. Далее фруктозо-1,6-дифосфат превращается в две триозы и каждая из них может быть использована для биосинтеза 2 молекул АТФ в ходе превращения в пируват. Если допустить, что одна из триоз принимает электроны от НАДН с образованием глицерол-3-фосфата в качестве конечного продукта обмена, превращение второй триозы в пируват позволит лишь компенсировать затраты на фосфорилирование глюкозы с сохранением баланса, но без положительного выхода АТФ.

Таким образом, на данном этапе исследования мы не смогли полностью расшифровать энергетический обмен микроспоридий. Однако нам удалось показать наличие гликолиза в спорах паразитов и установить, что единственным ферментом, способным реокислять НАДН, является глицерол-3-фосфатДГ.

Среди других ферментов углеводного метаболизма мы обнаружили в спорах микроспоридий активность глюкозо-6-фосфатДГ - ключевого фермента пентозо-фосфатного пути (Долгих, 1997). Это позволило предположить, что микроспоридии способны превращать глюкозо-6-фосфат в пентозо-фосфатном пути, например, для синтеза рибозо-5-фосфата и далее пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. В спорах *P. grylli* также выявлена достоверная активность фосфоглюкомутаза (Долгих, 1997). С одной стороны, наличие фосфоглюкомутаза, по всей видимости, позволяет микроспоридиям использовать глюкозо-1-фосфат в гликолизе и пентозо-фосфатном пути, превращая его в глюкозо-6-фосфат. С другой стороны,



**Рисунок 9. Участие ферментов, обнаруженных в спорах *P. grylli*, в энергетическом обмене микроспоридий.**

Толстые черные стрелки - обнаружена активность в спорах микроспоридий; толстые серые стрелки - активность в спорах не выявлена; тонкие стрелки – активность не изучалась.

фосфоглюкомутаза - фермент, необходимый для вовлечения глюкозо 6-фосфата в биосинтез трегалозы. Молекула трегалозы синтезируется из глюкозо 6-фосфата и УДФ-глюкозы, а последняя, в свою очередь, формируется из УТФ и глюкозо 1-фосфата, образуемого фосфоглюкомутазой. Таким образом, нами были получены первые данные о способности спор микроспоридий к синтезу трегалозы, что согласуется с высоким содержанием этого дисахарида в спорах.

### **3.1.4. Новые направления исследования метаболического аппарата микроспоридий.**

Осуществленная в 2001 году французскими коллегами расшифровка генома микроспоридии *E. cuniculi* подтвердила правильность выводов, сделанных нами на основании анализа биохимических данных. Во-первых, в геноме микроспоридии *E. cuniculi* обнаружен полный набор генов, кодирующий все ферменты гликолиза, пентозо-фосфатного пути, биосинтеза трегалозы, а также  $\alpha,\alpha$ -трегалазу (Katinka et al., 2001). Это полностью подтвердило наш вывод о способности микроспоридий использовать путь Эмбдена - Мейерхофа для самостоятельного биосинтеза АТФ. Во-вторых, данные геномного анализа полностью подтвердили сделанный нами вывод о важной роли глицерол-3-фосфатДГ как единственного фермента, способного реокислять образуемый в ходе гликолиза НАДН. В геноме *E. cuniculi* и других изученных к настоящему времени видов микроспоридий не обнаружены какие-либо компоненты цитохрома Кребса, электрон-транспортной цепи, а также ферменты, участвующие в процессах спиртового, молочнокислого или янтарнокислого брожения. При этом у паразитов выявлены гены, кодирующие глицерол-3-фосфатДГ. Удивительным открытием оказалось одновременное присутствие в геноме амитохондриальных микроспоридий двух форм фермента - цитоплазматической и митохондриальной.

У всех эукариотических организмов, располагающих митохондриями, эти два белка участвуют в работе так называемого глицерофосфатного челнока. Работа глицерофосфатного челнока предполагает, что цитоплазматическая форма фермента переносит электроны от НАДН на диоксиацетонфосфат с образованием глицерол-3-фосфата. Последний поступает в митохондрии и, в свою очередь, отдает электроны ФАД-зависимой форме фермента. Расположенная на внутренней митохондриальной мембране (Janssen et al., 2002) митохондриальная глицерол-3-фосфатДГ осуществляет последующую передачу электронов на мембранные убихиноны и далее в электрон-транспортную цепь. Наличие обоих компонентов глицерофосфатного челнока у микроспоридий при отсутствии митохондрий обусловило необходимость поиска уникального компартмента, куда бы электроны могли транспортироваться.

О наличии такого компартмента в клетках микроспоридий косвенно свидетельствовало и присутствие в геноме *E. cuniculi* более десятка генов, кодирующих другие митохондриальные белки при отсутствии самих митохондрий (Katinka et al., 2001). Здесь следует отметить обнаружение в геноме микроспоридий последовательностей, кодирующих  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы фермента E1 пируватдегидрогеназного комплекса при отсутствии всех других компонентов этого мультимерного фермента. Так как какие-либо другие ферменты, потенциально вовлеченные в метаболизм пирувата, в геноме *E. cuniculi* отсутствуют, сохранение в ходе эволюции микроспоридий двух субъединиц пируватДГ позволило предположить их важную роль в физиологии паразитов.

Дальнейшие исследования, выполненные нашей группой и зарубежными коллегами, позволили понять как функционирует метаболическая система в спорах микроспоридий и подчеркнуть ее уникальность. В первую очередь, требовалось доказать, что именно трегалоза - дисахарид, состоящий из двух

остатков D-глюкозы, соединенных  $\alpha,\alpha$ -гликозидной связью, выполняет функцию энергетического резерва в спорах паразитов.

### 3.2. Роль трегалозы в физиологии спор микроспоридий *P. grylli*.

Высокое содержание трегалозы можно отнести к одной из интересных физиологических особенностей спор микроспоридий. Наиболее детально содержание трегалозы и активность фермента трегалазы, гидролизующего дисахарид на две молекулы глюкозы, были изучены в спорах микроспоридии *Anncaliia (Nosema, Brachiola) algerae*. Было установлено, что концентрация трегалозы в спорах этого вида превышает 0.4 М (Undeen et al., 1987). Поскольку какие-либо резервные полисахариды в виде включений гликогена, амилопектина и крахмала у микроспоридий отсутствуют, именно трегалоза могла бы служить основным энергетическим резервом спор. Однако авторы обнаружили другую физиологическую функцию трегалозы и фермента трегалазы. В частности, показано, что экструзия полярных трубок *A. algerae* сопровождается резким снижением содержания трегалозы примерно в три раза и значительным повышением концентрации глюкозы внутри споры. Это позволило предположить, что основное назначение накопления трегалозы в спорах и ее быстрого гидролиза с помощью высокоактивной трегалазы может быть связано с необходимостью быстрого повышения осмотического давления внутри споры, служащего движущей силой процесса экструзии (Undeen et al., 1987; Undeen, 1990).

В то же время, анализ фермента трегалазы другой микроспоридии *Nosema apis* показал ряд существенных отличий от свойств фермента *A. algerae*. В случае микроспоридии *N. apis* фермент имел рН оптимум в нейтральной области (рН 7.0) (Vandermeer, Gochnauer, 1971b), а у *N. algerae* в кислой (рН 5.5) (Undeen et al., 1987). Более того, удельная активность трегалазы в спорах *N. apis* была значительно ниже, чем в спорах *N. algerae*,

так как в первом случае авторы инкубировали реакционную смесь для тестирования активности трегалазы в течение 22 часов при 38°С (Vandermeer, Gochbauer, 1971b), в то время как во втором случае (фермент *A. algerae*) для определения достоверной активности фермента *N. algerae* было достаточно проведения реакции в течение 30 мин при 37°С (Undeen et al., 1987).

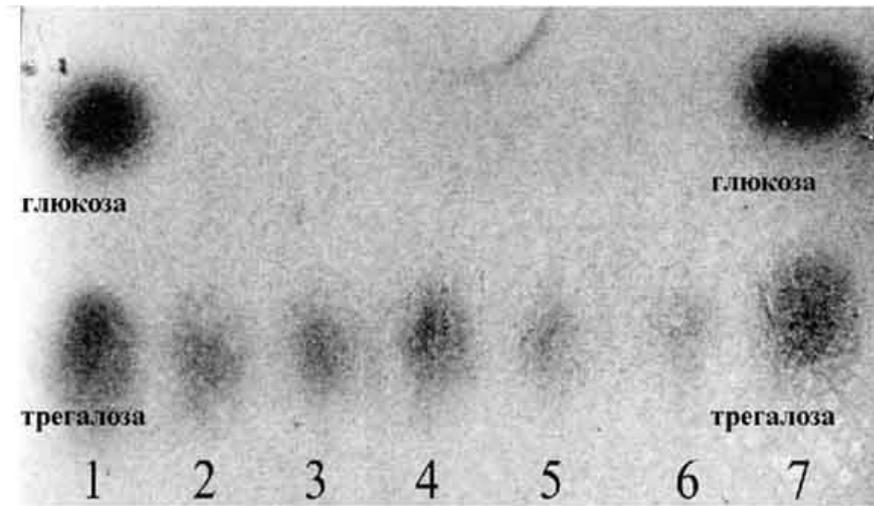
Нейтральный рН-оптимум и более низкая активность фермента в спорах *N. apis*, а также использование в вышеуказанных экспериментах по тестированию трегалазы фосфатного буфера в качестве реакционной среды позволили нам предположить, что у ряда видов микроспоридий первым ферментом катаболизма трегалозы может служить не трегалаза, а фосфорилаза (синтаза) трегалозы (КФ 2.4.1.64), превращающая при участии фосфат-иона молекулу трегалозы в молекулу глюкозы и молекулу глюкозо-1-фосфата. Этот фермент широко распространен у родственных микроспоридиям грибов и имеет рН оптимум около 6.6 для прямой и около 6.2 для обратной реакции (Eis, Nidetzky, 1999). Кроме того, использование данного фермента более выгодно для лишенных митохондрий микроспоридий, так как позволяет вовлекать в гликолиз глюкозо-1-фосфат без расходования АТФ в ходе реакции, катализируемой гексокиназой. Таким образом, использование фосфорилазы трегалозы могло бы объяснить каким образом микроспоридии достигают положительного баланса при синтезе АТФ в ходе превращения молекулы глюкозы в пируват и глицерол-3-фосфат. Проведенное нами изучение особенностей катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *P. grylli* позволило получить ряд оригинальных результатов.

### **3.2.1. Влияние выброса полярных трубок на содержание трегалозы и глюкозы в спорах *P. grylli*.**

Использование энзиматического метода определения содержания свободной глюкозы с помощью вспомогательных ферментов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатДГ позволило доказать, что выброс полярных трубок не

сопровождается образованием этого соединения в спорах микроспоридии *P. grylli*. Наши расчеты показали, что содержание глюкозы в спорах после экструзии не превышает 50 мкмоль (Долгих, Семенов, 2003). В то же время, при экструзии полярных трубок микроспоридии *A. algerae* концентрация глюкозы внутри споры возрастает до 0.15 М (Undeen et al., 1987). Позднее эти данные были уточнены и приблизительное содержание глюкозы в спорах после экструзии составило 37.6 мкг на  $3.75 \cdot 10^7$  спор (Undeen, Vander Meer, 1994). Если принять объем одной споры *N. algerae* равным  $10.9 \text{ мкм}^3$  (Undeen, Frixione, 1990), то в 1 литре объема спор содержится 91.8 г глюкозы, что соответствует концентрации 0.46 М. Таким образом, концентрация свободной глюкозы в спорах *P. grylli* после экструзии оказалась на 4 порядка ниже чем в спорах микроспоридии *A. algerae*. Полученный результат ясно показал, что процесс «выстреливания» полярных трубок микроспоридии *P. grylli* не сопровождается гидролизом внутриспоровой трегалозы.

Отсутствие влияния экструзии на содержание трегалозы в спорах *P. grylli* также подтверждено с помощью метода бумажной хроматографии (Долгих, Семенов, 2003). Как показано на рисунке 10, использованный метод разделения и специфичной окраски сахаров позволяет четко идентифицировать пятна, соответствующие трегалозе и свободной глюкозе. В качестве стандартов на крайние дорожки (Рисунок 10, дорожки 1 и 7) нанесено 0.8 мкмоль трегалозы и 0.4 мкмоль глюкозы. Более яркая окраска глюкозы, несмотря на более низкое содержание в пробе, объясняется тем, что этот моносахарид, в отличие от трегалозы, является восстанавливающим. Если принять, что интенсивность окраски пятна, соответствующего трегалозе в свежевыделенных интактных спорах (дорожка 3), приблизительно в 2-4 раза ниже по сравнению со стандартом, содержание трегалозы в спорах при эффективности разрушения около 80 % будет составлять около 0.08-0.16 М. При этом процесс экструзии в тех же самых спорах не вызывает



**Рисунок 10. Разделение сахаров спор микроспоридии *P. grylli* методом бумажной хроматографии.**

1,7- стандарт (0.8 мкмоль трегалозы и 0.4 мкмоль глюкозы);

2 - свежесыделенные споры после экструзии;

3 - свежесыделенные интактные (не подвергнутые экструзии) споры;

4 - споры хранившиеся в воде в течение 1 года при 4°C;

5 - споры хранившиеся в воде в течение 4 лет при 4°C;

6 - споры хранившиеся в течение 2.5 лет в водном растворе 0.01% азиды натрия.

достоверного изменения концентрации трегалозы и появления какого либо количества глюкозы (дорожка 2). Последний результат согласуется с приведенными выше данными о низкой концентрации свободной глюкозы в спорах после экструзии.

### **3.2.2. Влияние длительного хранения на содержание трегалозы и глюкозы в спорах *P. grylli*.**

Результаты бумажной хроматографии растворимых сахаров *P. grylli* также показали, что при хранении спор в течение 4 лет при 4 °С содержание трегалозы в них заметно снижается (Рисунок 10, дорожка 5), что может быть связано с постепенным использованием дисахарида в качестве источника энергии. Вероятно, интенсивность расходования трегалозы в спорах зависит от температуры их хранения, поскольку интенсивность окраски в пробах спор хранившихся в течение 2.5 лет при комнатной температуре в водном растворе 0.01% азида Na, была еще ниже (Рисунок 10, дорожка 6). Содержание трегалозы в спорах, хранившихся год при 4 °С, не снижалось по сравнению со свежесыведенным материалом. Окраска пятна в этом случае была даже несколько более интенсивной (Рисунок 10, дорожка 4). Последний результат может быть связан с более эффективным разрушением старых спор при приготовлении проб по сравнению со свежесыведенными. В целом, эти данные позволяют предположить, что интенсивность катаболизма трегалозы в спорах *P. grylli* относительно невысока.

### **3.2.3. Анализ активности трегалазы и фосфорилазы трегалозы в спорах *P. grylli*.**

С целью обнаружения активности трегалазы в спорах *P. grylli* суспензия разрушенных спор была инкубирована в присутствии неионного детергента Тритон X-100, солюбилизующего мембраны. Это связано с тем, что в спорах микроспоридии *A. algerae* выявлены как растворимая, так и

нерастворимая формы фермента (Undeen et al., 1987). Исходя из данных об отсутствии катаболизма трегалозы в спорах *P. grylli* в момент экструзии и о его низкой интенсивности в покоящихся спорах, мы предположили, что удельная активность трегалазы в спорах также может быть достаточно низкой. С целью увеличения удельной активности фермента была предпринята его частичная очистка, включающая удаление нуклеиновых кислот и нуклеопротеиновых комплексов сульфатом марганца и последующее фракционирование белков с помощью сульфата аммония (СА). Кроме того, осаждение белков СА позволило удалить из проб эндогенную трегалозу, присутствующую в достаточно высоких количествах в спорах. С целью повышения чувствительности метода тестирования активности трегалазы мы значительно увеличили (до 20 часов) время проведения реакции, как это имело место в случае микроспоридии *N. apis* (Vandermeer, Gochnauer, 1971b).

В результате исследования в спорах *P. grylli* обнаружена достоверная активность  $\alpha,\alpha$ -трегалазы (Таблица 7). Основная активность фермента обнаружена во фракции белков, осаждаемых при насыщении СА от 35 до 75%. В этой фракции также наблюдалась и максимальная удельная активность трегалазы. Обнаруженный фермент имеет рН оптимум в кислой области, поскольку активность при рН 5.0 во всех фракциях была в 1.8 раз выше, чем при рН 7.0. Исходя из приведенных в таблице значений, можно подсчитать, что фермент имеет относительно низкую удельную активность в супернатанте гомогената спор *P. grylli*, составляющую около 73.8 и 40.7 нмоль/ч/мг белка соответственно при значениях рН 5.0 и 7.0 (Долгих, Семенов, 2003).

Напротив, активность фосфорилазы трегалозы не обнаружена в спорах *P. grylli*. Тестирование фосфорилазы трегалозы в гомогенатах спор *P. grylli* первоначально было проведено с использованием метода измерения активности по обратной реакции синтеза трегалозы из глюкозы и глюкозо-1-

Таблица 7

**Активность трегалазы (нм глюкозы/час) во фракциях после осаждения сульфатом аммония растворимых белков гомогената спор микроспоридии *Paranosema grylli*.**

Фракция при насыщении СА	Объем фракции Мл	Концентрация белка мг/мл	Активность при рН 5.0		Активность при рН 7.0	
			общая	удельная	общая	удельная
0-35%	0.26	1.9	13.4	27.1	7.5	15.2
35-75%	0.33	3.52	163.2	140.5	90.1	77.5
75-100%	0.24	1.4	6.8	20.1	3.5	10.5
Супернатант после 100%	2.9	0.17			активность не обнаружена	

фосфата с образованием неорганического фосфата. Несмотря на то, что среда для разрушения спор и реакционная смесь для тестирования активности были аналогичны используемым при изучении фосфорилазы трегалозы гриба *Schizophyllum commune* (Eis, Nidetzky, 1999), достоверная активность фермента нами не обнаружена. Поскольку активность фермента в данном методе определяется по образованию неорганического фосфата, в некоторых экспериментах было проведено удаление эндогенного фосфата путем диализа супернатанта после центрифугирования гомогената спор. Это позволило увеличить чувствительность метода, но также не позволило обнаружить активность фосфорилазы трегалозы. Еще одна попытка обнаружить активность этого фермента была предпринята при проведении вышеописанных экспериментов по тестированию трегалазы в осадках после фракционирования белков спор сульфатом аммония. При этом как для трегалозы, так и для фосфорилазы трегалозы использована одна и та же реакционная смесь, содержащая 100 мМ трегалозу и 50 мМ Na-фосфатный буфер. Если активность трегалазы оценивали измерением количества образовавшейся глюкозы с помощью вспомогательных ферментов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатДГ, то активность фосфорилазы трегалозы оценивали измерением образовавшегося глюкозо-1-фосфата с помощью фосфоглюкомутазы и глюкозо-6-фосфатДГ. При этом активность фосфорилазы трегалозы, в отличие от активности трегалазы, была ниже предела чувствительности использованного метода ее тестирования (1-2 нмоль глюкозы/час/мг белка). На основании приведенных данных мы сделали вывод об отсутствии данного фермента в спорах микроспоридии *P. grylli* (Долгих, Семенов, 2003).

#### **3.2.4. Научное значение полученных данных.**

Приведенные нами результаты изучения особенностей метаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *P. grylli* хорошо согласовались с

данными, полученными зарубежными коллегами (Undeen, Van der Meer, 1999). Авторы данной работы показали, что гидролиз трегалозы в ходе экструзии полярных трубок, сопровождающийся резким повышением содержания глюкозы, действительно наблюдается в спорах микроспоридий *Edhazardia aedis*, *Vavraia culicis* и *A. algerae*, развивающихся в водных хозяевах. В то же время, в спорах четырех видов паразитов наземных животных, включая *Vairimorpha necatrix*, *Vairimorpha lymantriae*, *Nosema disstriae* и *N. apis*, выброс полярных трубок не сопровождался каким-либо изменением состава сахаров. При этом в спорах *P. grylli* обнаруженный нами фермент трегалаза имеет рН - оптимум в кислой области, что отличает его от аналогичного фермента другой наземной микроспоридии *N. apis*, имеющего рН оптимум около 7.0. В этом отношении трегалаза *P. grylli* ближе к ферменту микроспоридии *A. algerae*, для которой характерно развитие в водных хозяевах и быстрое превращение трегалозы в восстанавливающие сахара в ходе экструзии.

Отсутствие гидролиза трегалозы в ходе экструзии у части изученных видов микроспоридий не означает, что ее высокая концентрация внутри спор не играет важной роли в создании осмотического давления. Однако наличие в этих спорах активной трегалазы позволяет заключить, что главной физиологической функцией фермента у таких видов является не быстрый гидролиз трегалозы для создания осмотического давления, а медленное расходование внутриспоровых энергетических запасов в ходе длительного переживания спор во внешней среде. Это подтверждается полученными в нашей работе и опубликованными в литературе (Undeen, Solter, 1996) данными о снижении содержания сахаров в ходе хранения спор микроспоридий. Невысокая интенсивность процесса катаболизма запасенной в виде резерва трегалозы объясняет и более низкую активность фермента в спорах *P. grylli* и *N. apis* по сравнению со спорами *A. algerae*.

В заключение следует отметить, что приведенные в нашей работе данные об отсутствии активности фосфоорилазы трегалозы и наличии трегалазы в спорах *P. grylli* позволили заключить, что именно трегалаза служит первым ключевым ферментом энергетического катаболизма в спорах микроспоридий. При этом вопрос об обеспечении чистого выхода АТФ при катаболизме трегалозы и состав конечных продуктов энергетического обмена в спорах микроспоридий на данном этапе исследования оставался открытым. Данные, проливающие свет на эту проблему, появились в 2002 году после обнаружения в клетках микроспоридий митосом - сильно редуцированных производных митохондрий. Исследования, выполненные нашей группой и зарубежными коллегами, позволили оценить вклад этих уникальных органелл в метаболизм микроспоридий.

### **3.3. Участие митосом микроспоридий в энергетическом обмене спор.**

#### **3.3.1. Научное значение обнаружения митосом у микроспоридий.**

В 2002 году в журнале *Nature* была опубликована статья, посвященная обнаружению в клетках микроспоридии *Trachipleistophora hominis* митосом - рудиментов митохондрий (Williams et al., 2002). Для обнаружения митосом были использованы антитела, полученные против митохондриальной формы молекулярного шаперона Hsp70 и специфично распознающие органеллы при иммунофлюоресцентном анализе стадий внутриклеточного развития паразита. Обнаруженные органеллы представляли собой небольшие по размеру (от 50 до 200 нм) структуры, окруженные двойной мембраной и присутствующие в количестве 10-30 штук на клетку. Позднее, митосомы были обнаружены в клетках филогенетически удаленного вида микроспоридий *E. cuniculi* (Williams et al., 2008, Tsaousis et al., 2008), что позволило предположить их важную роль в физиологии всех паразитов этой группы.

В более широком смысле, обнаружение митосом у микроспоридий окончательно подтвердило, что все изученные к настоящему времени амитохондриальные одноклеточные микроорганизмы сохранили эволюционные рудименты митохондрий. Эволюционная сохранность редуцированных органелл у микроаэрофильных простейших и облигатных внутриклеточных паразитов, относящихся к типам Heterokontophyta, Metamonada, Amoebozoa, Apicomplexa и Microsporidia (Hjort et al., 2010), свидетельствует о выполняемой ими важной универсальной функции. По-видимому, такой функцией является участие редуцированных митохондрий, включая митосомы микроспоридий, в биосинтезе FeS-кластеров (Dellibovi-Ragheb et al., 2013). Ключевые компоненты этого пути обнаружены во всех расшифрованных геномах микроспоридий (Akiyoshi et al., 2009, Cornman et al., 2009, Corradi et al., 2009, Corradi et al., 2010, Cuomo et al., 2012, Heinz et al., 2012a, Katinka et al., 2001, Pan et al., 2013) и они были локализованы в митосомах паразитов *in situ* (Goldberg et al., 2008).

Эволюционные рудименты митохондрий у многих эукариотических микроорганизмов могут также быть вовлеченными в энергетический обмен. Например, гидрогеносомы *Trichomonas vaginalis* (Metamonada) (Steinbuchel, Muller. 1986), подобные митохондриям органеллы паразита человека *Blastocystis* spp. (Heterokontophyta) (Stechmann et al. 2008.) и одиночные органеллы *Cryptosporidium* (Apicomplexa) (Abrahamsen et al., 2004; Xu, et al., 2004; Mogi, Kita, 2010;) могут непосредственно участвовать в синтезе АТФ. В то же время, сильно редуцированные небольшие митосомы, обнаруженные у микроспоридий *T. hominis* и *E. cuniculi*, а также в клетках *Entamoeba histolytica* (Amoebozoa) (Tovar et al., 1999) и *Giardia lamblia* (Metamonada) (Regoes et al., 2005), лишены каких-либо АТФ-синтезирующих ферментов митохондриального происхождения.

Обнаружение генов, кодирующих фермент альтернативную оксидазу в четырех видах микроспоридий из двух филогенетических клад (Willams et al.,

2010) позволило предположить, что митосомы микроспоридий все же могут участвовать в этих процессах. Для подтверждения этого предположения необходимо было доказать, что обнаруженный в геномах микроспоридий митохондриальный компонент глицеро-фосфатного челнока (мит Г-3-ФДГ) и АО локализируются вместе на внутренней мембране митосом. В этом случае ферменты могут образовывать альтернативную дыхательную цепь, осуществляющую перенос электронов от глицерол-3-фосфата на кислород через ФАД и пул убихинонов, присутствующих в мембране. Таким образом, реокисляя НАДН, генерируемый в ходе гликолиза, митосомы могут быть напрямую вовлечены в процессы углеводного и энергетического обмена микроспоридий.

Поскольку в ходе проведенных ранее исследований были получены антитела, специфично распознающие митГ-3-ФДГ и АО микроспоридии *P. locustae*, большой интерес представляла попытка иммунолокализовать альтернативную дыхательную цепь в спорах паразита. Следует еще раз подчеркнуть, что запланированное исследование могло быть проведено только с использованием спор микроспоридий, поскольку именно они, а не стадии внутриклеточного развития специфично накапливают ферменты углеводного и энергетического обмена. Кроме того, далеко не все виды микроспоридий являются подходящими для такого исследования, поскольку гены, кодирующие АО, отсутствуют в геноме всех микроспоридий, принадлежащих к филогенетической кладе IV (Terresporidia) (Williams et al., 2010). Интересно отметить, что большая часть микроспоридий, чьи геномы расшифрованы к настоящему времени (*E. cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Nosema bombycis*, *Nosema ceranae*) как раз и принадлежит к этой группе (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Таким образом, наш выбор микроспоридии *P. locustae* в качестве объекта для иммунолокализации альтернативной дыхательной цепи оказался вполне

правомерным. Этот вид принадлежит к филогенетической кладе II (Aquasporidia) и располагает геном альтернативной оксидазы.

### 3.3.2. Обнаружение митосом в спорах *P. locustae*.

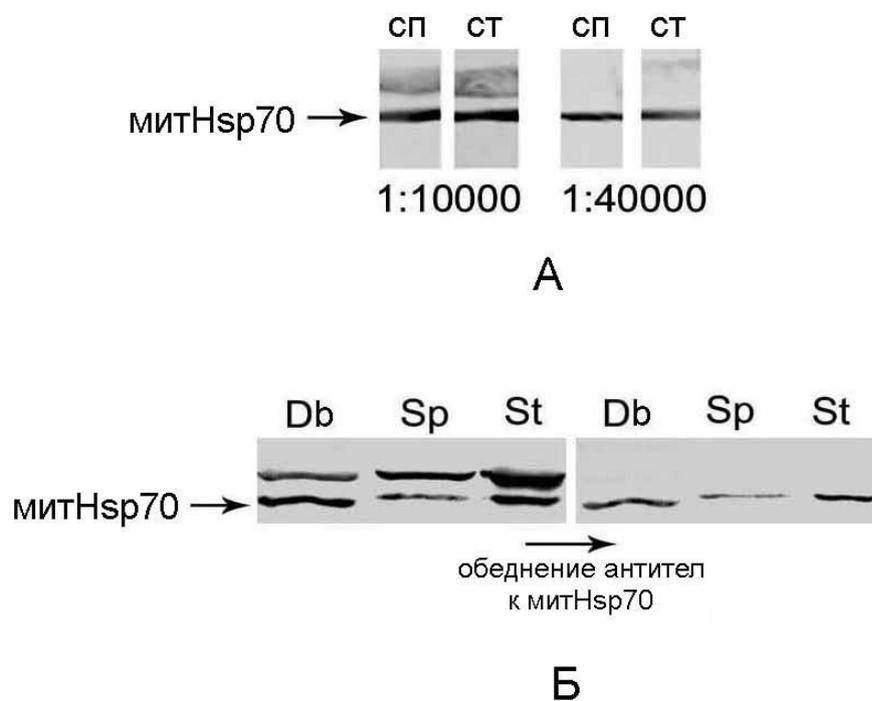
Поскольку к началу проведения данного эксперимента митосомы были найдены только в стадиях внутриклеточного развития *T. hominis* (Williams, 2002) и *E. cuniculi* (Williams et al., 2008), в первую очередь было необходимо обнаружить и описать эти органеллы в спорах микроспоридий. Как и в случае митосом *T. hominis* и *E. cuniculi* мы решили использовать антитела к митохондриальной форме шаперона Hsp70 - универсальному маркеру митосом микроспоридий. Исходя из высокой степени изменчивости последовательностей в геномах микроспоридий (Slamovits et al., 2004), для идентификации митосом в спорах *P. locustae* было целесообразно использовать антитела к шаперону этого же вида паразитов. Однако, как показано на Рисунке 11, полученные нами поликлональные антитела против митохондриальной формы шаперона Hsp70 *P. locustae* распознавали в пробах спор и стадий внутриклеточного развития паразитов две полосы размером около 66 и 75 кДа, что может быть связано с перекрестной реакцией антител с разными представителями этого консервативного семейства. С целью выяснить, какая из обнаруженных полос (или обе из них) соответствует митохондриальному Hsp70, был предпринят иммуноблоттинг белка с иммунной сывороткой в разведении 1:10000 и 1:40000 (Рисунок 11, А).

Поскольку разведение сыворотки сопровождалось значительным ослаблением окраски верхней полосы, можно было заключить, что именно нижняя полоса размером 66 кДа, специфично распознаваемая антителами, представляет митохондриальную форму белка. Для удаления антител, распознающих верхнюю полосу, растворимые белки гомогената спор *P. locustae* были разделены методом ДСН-ПААГЭ, перенесены на нитроцеллюлозную мембрану, окрашены Понсо и мажорная полоса размером

75 кДа была аккуратно вырезана и использована для обеднения антител. Специфичное окрашивание полосы 66 кДа полученным препаратом подтвердило присутствие уникальных эпитопов в молекуле митохондриальной формы шаперона (Рисунок 11, Б), а также возможность его использования для поиска митосом в спорах микроспоридий.

В связи с неспособностью антител проникать внутрь спор, покрытых сложноустроенной толстой оболочкой (Vavra, Larsson, 1999), для данного эксперимента мы выбрали метод изготовления и иммуноцитохимического окрашивания ультратонких криосрезов спор микроспоридий. Данный метод имеет неоспоримые преимущества по сравнению со стандартными методами иммуноэлектронной микроскопии, основанными на заключении образцов в смолу, поскольку позволяет лучше сохранить антигенную и морфологическую структуру образцов и значительно повысить чувствительность метода (Beesley, Campbell, 1984). Инкубация ультратонких криосрезов зрелых спор микроспоридий в присутствии аффинно-очищенных антител против митHsp70 *P. locustae*, дополнительно обедненных против 75 кДа белка спор, позволила обнаружить митосомы паразита (Dolgikh et al., 2011). На криосрезах антитела специфично метили небольшие (50-200 нм в диаметре) округлые структуры (Рисунок 12). Поскольку обнаруженные органеллы *P. locustae* имели двойную мембрану, морфологически были схожи с митосомами других видов и специфично распознавались антителами к митохондриальному шаперону, был сделан вывод о первом обнаружении митосом в спорах микроспоридий. На срезе каждой споры насчитывалось 3-4 митосомы и многие из них формировали пары. Как и ожидалось, большинство частиц коллоидного золота метили внутреннюю зону, представляющую матрикс митосом.

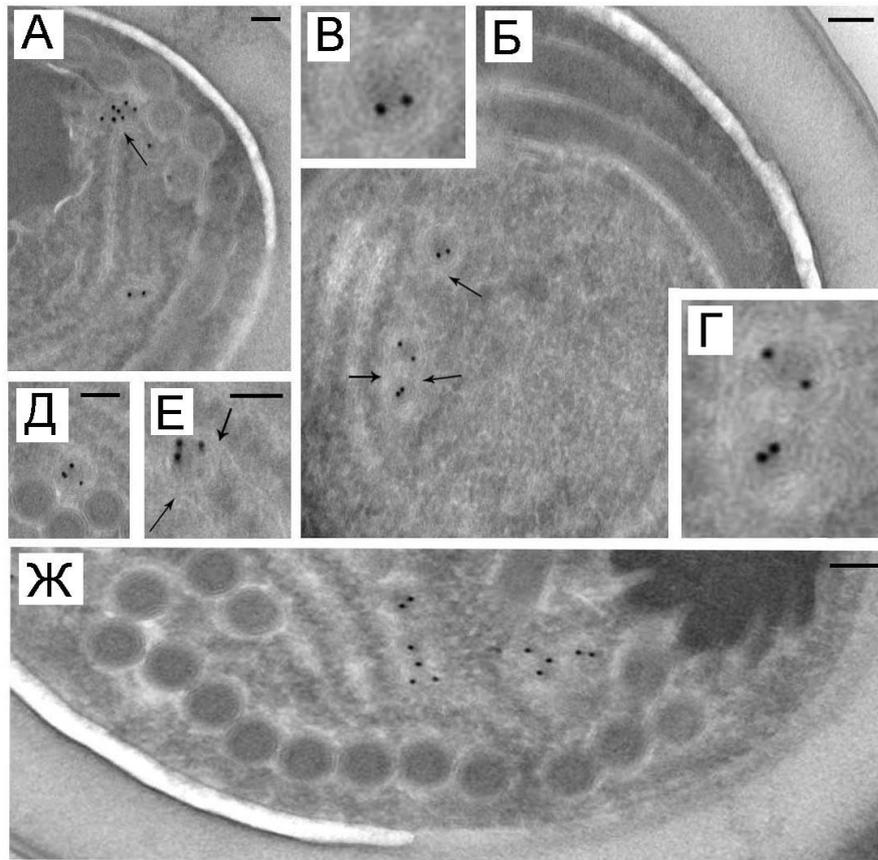
### **3.3.3. Иммунолокализация компонентов альтернативной дыхательной цепи в митосомах спор *P. locustae*.**



**Рисунок 11. Идентификация митохондриальной формы Hsp70 *P. locustae*, распознаваемой специфичными антителами.**

А. Двойная полоса, распознаваемая антителами к митHsp70 в ходе иммуноблоттинга, представляет собой два различных белка, поскольку серийное разведение иммунной сыворотки до 1:40000 приводит к значительному ослаблению окраски верхней мажорной полосы. В то же время, нижний белок размером около 66 кДа по-прежнему специфично распознается антителами даже при сильном разведении.

Б. Специфичное распознавание белка размером 66 кДа антителами против митHsp70, дополнительно истощенных против верхней мажорной полосы размером 75 кДа, подтвердили присутствие уникальных эпитопов в составе молекулы митHsp70.



**Рисунок 12. Обнаружение митосом в спорах микроспоридии *P. locustae*.**

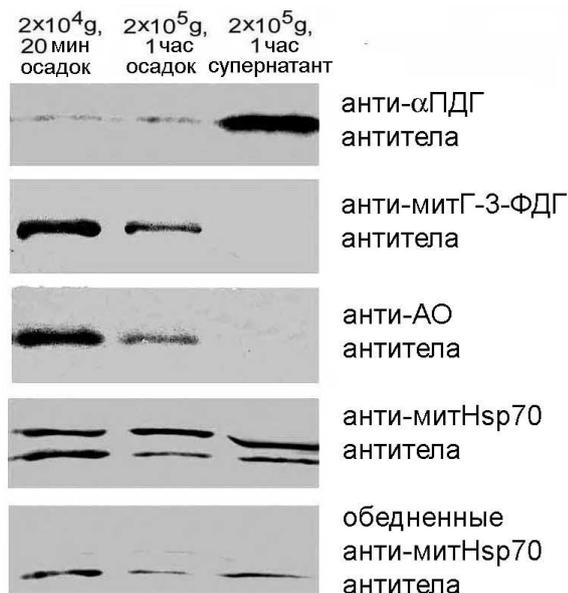
Ультратонкие криосрезы зрелых спор окрашивали аффинно-очищенными и обедненными анти-митHsp70 антителами. Иммуноэлектронная микроскопия показала мечение небольших (от 50 до 200 нм) округлых структур, ограниченных двойной мембраной. В и Г представляют увеличенные части изображения Б. Стрелки указывают на тесный пространственный контакт митосом с цистернами ЭР. Размер частиц коллоидного золота составляет 10 нм, размер шкалы - 100 нм.

На следующем этапе исследования предстояло ответить на вопрос: ко-локализуются ли митГ-3-ФДГ и АО на внутренней мембране митосом в спорах *P. locustae*, образуя альтернативную дыхательную цепь.

Разрушение спор в присутствии 0.3 М сахарозы, последующее дифференциальное центрифугирование гомогената и иммуноблоттинг полученных проб с антителами к рекомбинантным белкам показали ассоциацию митГ-3-ФДГ и АО с мембранными структурами спор паразита (Рисунок 13). Основная часть обоих ферментов осаждалась из осветленного гомогената спор в ходе центрифугирования при 20000 g в течение 20 мин и полностью удалялась из растворимой фракции в результате ультрацентрифугирования (200000 g, 1 час). Основная часть митHsp70 также осаждалась из гомогената в ходе высокоскоростного центрифугирования. Однако существенные количества этого растворимого белка все же оставались в конечном супернатанте вследствие его выхода из митосом, частично разрушенных при гомогенизации спор.

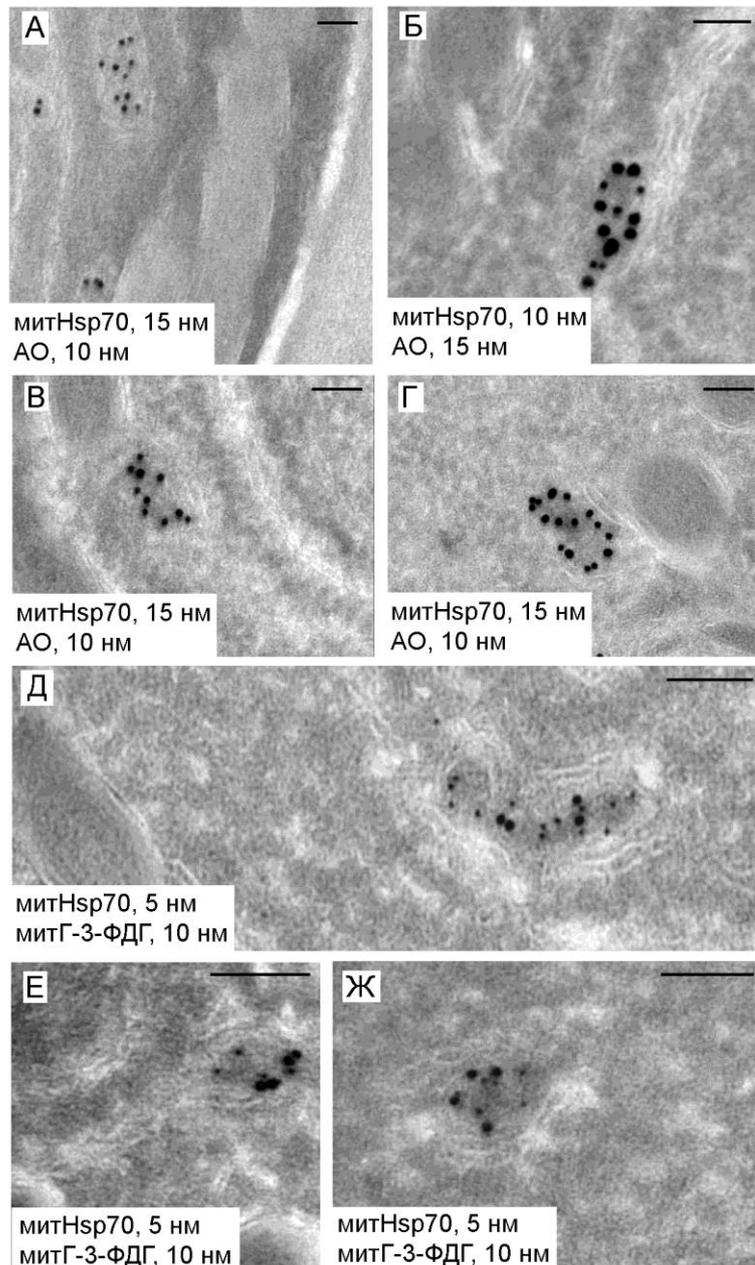
Двойное мечение криосрезов спор микроспоридий с помощью антител к АО и митHsp70 или к митГ-3-ФДГ и митHsp70 показало ко-локализацию обоих компонентов альтернативной дыхательной цепи с митосомальным маркером (Рисунок 14). Как и предполагалось, АО и митГ-3-ФДГ локализовались, преимущественно, на внутренней мембране митосом вокруг несколько более электронно-плотного матрикса. Несмотря на то, что внутренняя мембрана митосом микроспоридий может формировать складки (Vavra, 2005), мечение антителами против АО и митГ-3-ФДГ точно повторяла контуры некоторых органелл (Рисунок 14, В и Ж).

Полученный результат впервые продемонстрировал что, несмотря на чрезвычайную минимизацию митохондрий в ходе эволюции микроспоридий, митосомы паразитов сохраняют альтернативную электрон-транспортную цепь на своей внутренней мембране. Таким образом, рудименты митохондрий микроспоридий сохранили свою важную роль в



**Рисунок 13. Иммуноблоттинг показал ассоциацию митГ-3-ФДГ и АО *P. locustae* с мембранными структурами спор паразита.**

Основная часть обоих ферментов осаждалась из осветленного гомогената спор в ходе центрифугирования при 20000 g в течение 20 мин и полностью удалялась из растворимой фракции в результате ультрацентрифугирования при 200000 g в течение часа. Основная часть митHsp70 также осаждалась из гомогената в результате высокоскоростного центрифугирования, однако, существенные количества белка все же оставались в конечном супернатанте вследствие частичного разрушения митосом при гомогенизации спор.



**Рисунок 14. 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.

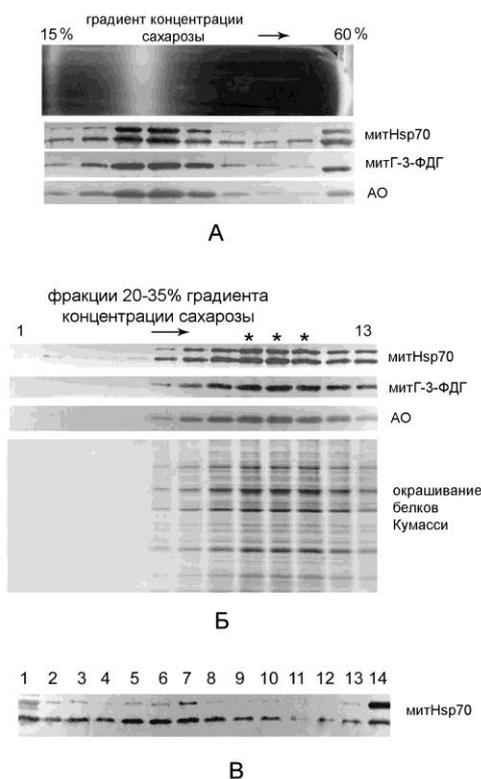
Д-Ж. Иммуноэлектронная микроскопия криосрезов спор с анти-митГ-3-ФДГ и анти-митHsp70 антителами показала сходную колокализацию обоих белков в митосомах *P. locustae*. Размер шкалы, 0,1 мкм.

энергетическом обмене в ходе эволюции паразитов (Dolgikh et al., 2011).

#### **3.3.4. Связь митосом микроспоридий с мембранами спор.**

На заключительном этапе исследования митосом *P. locustae* мы попытались выделить органеллы из гомогената спор паразита в градиенте плотности сахарозы, а также с помощью дифференциального центрифугирования. С этой целью мембраны осаждали из осветленного гомогената спор, разрушенных в присутствии 0.3 М сахарозы, тщательно ресуспендировали, наносили на 15-60 % градиент плотности сахарозы и центрифугировали при 150000g в течение 1 часа в бакет-роторе. Иммуноблоттинг показал идентичное распределение митHsp70, АО и митГ-3-ФДГ в полученных после центрифугирования фракциях. При этом распределение трех белков совпадало с распределением внутренних мембран спор, формирующих видимую одиночную полосу в области с концентрацией сахарозы 25-30 % (Рисунок 15, А). Разделение мембран спор в более пологом 20-35% градиенте сахарозы показало сходный результат. Основное количество митHsp70, митГ-3-ФДГ и АО обнаружено во фракциях с наибольшим содержанием суммарного белка (Рисунок 15, Б). Полученные результаты свидетельствовали о связи митосом в спорах микроспоридий с другими мембранными структурами.

С целью установить при какой скорости наблюдается осаждение митосом, споры микроспоридии *P. locustae* механически разрушали в буфере ТС (50 mM Трис-Cl (pH 8.0), 0.3M сахароза) и гомогенат осветляли центрифугированием при 100 g в течение 10 мин. Полученный гомогенат последовательно центрифугировали при 200, 400, 600, 900, 1500, 2500, 3500, 4500, 6000, 8000, 10000, 14000, 19000 g в течение 5 мин, осадки ресуспендировали до 1/5 объема итогового супернатанта и анализировали с помощью иммуноблоттинга с антителами против митHsp70. Данный эксперимент показал что, несмотря на незначительный размер митосом (50-



**Рисунок. 15. Связь митосом микроспоридий с мембранами спор *P. locustae*.**

А. Центрифугирование мембран спор в 15-60 % градиенте концентрации сахарозы и последующий анализ фракций с помощью иммуноблоттинга показали одинаковое распределение митHsp70, АО, митГ-3-ФДГ во фракциях соответствующих видимой полосе мембран в зоне с концентрацией сахарозы около 25-30 %.

Б. Разделение мембран спор в 20-35% градиенте концентрации сахарозы также показало сходное распределение митHsp70, АО и митГ-3-ФДГ во фракциях с максимальным содержанием белка (указаны звездочками).

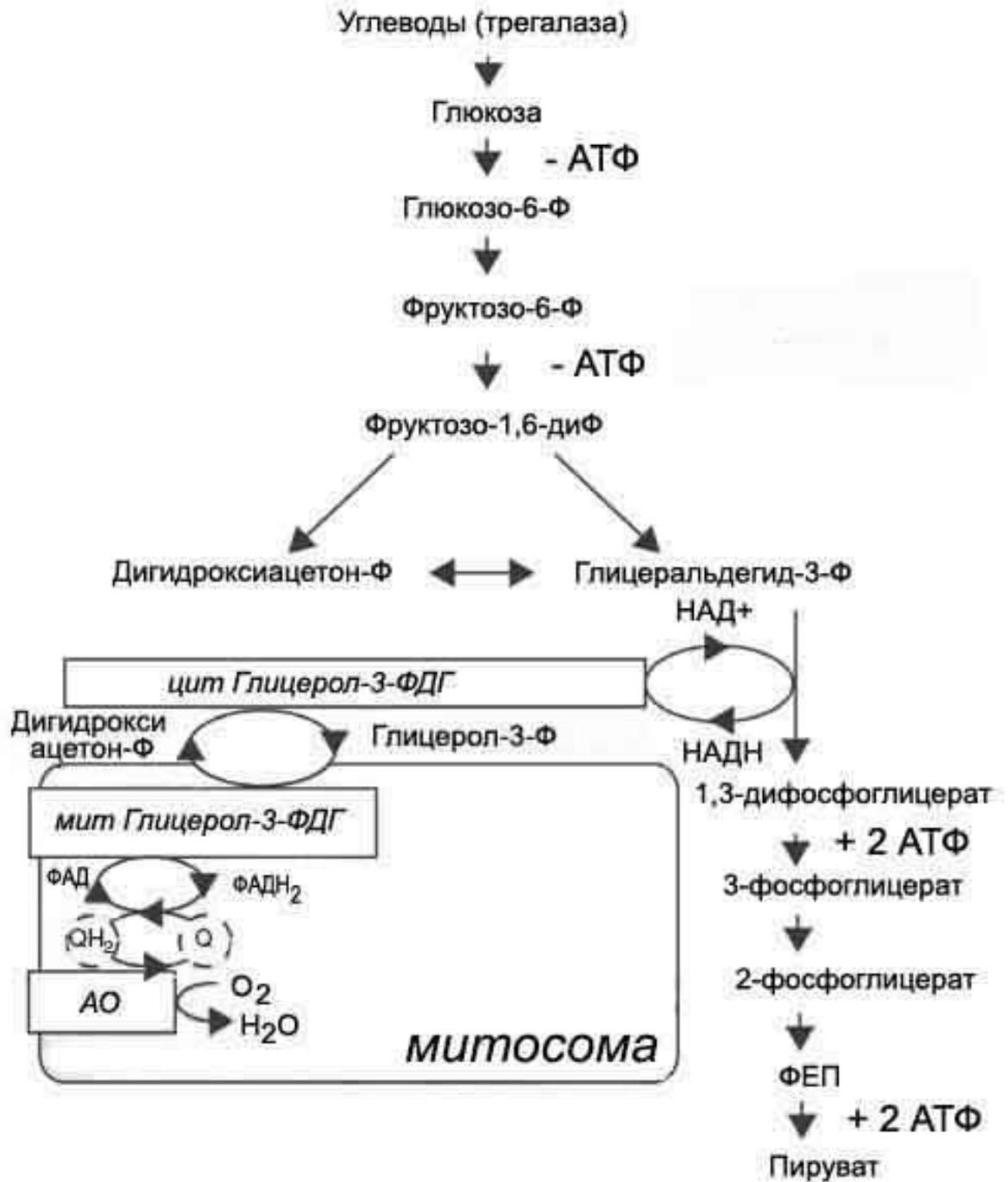
В. Осветленный гомогенат спор последовательно центрифугировали при 200 (дорожка 1) , 400 (дорожка 2) , 600 (дорожка 3), 900 (дорожка 4), 1500 (дорожка 5), 2500 (дорожка 6), 3500 (дорожка 7), 4500 (дорожка 8), 6000 (дорожка 9), 8000 (дорожка 10), 10000 (дорожка 11), 14000 (дорожка 12), 19000 г (дорожка 13) в течение 5 мин, осадки ресуспендировали до 1/5 объема итогового супернатанта (дорожка 14) и анализировали с помощью иммуноблоттинга с антителами против митHsp70.

200 нм в диаметре), большая часть органелл осаждалась уже при относительно низкой скорости центрифугирования (до 6000 g в течение 5 мин) (Рисунок 15, В). Таким образом, накопленные нами к настоящему времени данные свидетельствуют о высокой вероятности того, что митосомы в спорах микроспоридий каким-то образом пространственно связаны с другими мембранами.

### 3.3.5. Научное значение полученных данных.

Накопление двух компонентов альтернативной дыхательной цепи и митосомального маркера митHsp70 в спорах микроспоридии *P. locustae* позволило нам впервые обнаружить митосомы в филогенетической кладе II микроспоридий (класс Aquasporidia) (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Кроме того, мы впервые описали эти органеллы не в стадиях внутриклеточного развития паразитов, а в зрелых спорах. Иммунолокализация двух компонентов альтернативной дыхательной цепи «митГ-3-ФДГ - мембранный пул убихинонов Q – АО» в мембране митосом подтвердила, что эволюционные рудименты митохондрий микроспоридий сохранили важную роль в энергетическом обмене паразитов. При этом в отличие от митHsp70, оба фермента не обнаружены в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*. Последний результат свидетельствует о значительных перестройках в составе белков и функции митосом в ходе жизненного цикла паразитов. Поскольку циклические перестройки метаболизма и структуры митохондрий широко распространены в жизненных циклах самых разных эндопаразитических простейших и гельминтов, являясь при этом перспективными мишенями для химиотерапии протозоозов и гельминтозов (Kita et al. 2001), дальнейшее изучение этого вопроса представляет несомненный интерес.

Приведенные результаты позволяют составить окончательную схему энергетического метаболизма в спорах микроспоридий (Рисунок 16),



**Рисунок 16. Схема энергетического метаболизма в спорах *P. locustae*.**

Перенос электронов от НАДН на кислород обеспечивает положительный выход 2 молекул АТФ на каждую катаболизируемую молекулу глюкозы.

обеспечивающую положительный выход АТФ в ходе катаболизма глюкозы. Исходя из этой схемы, молекула глюкозы, образуемая в ходе гидролиза трегалозы, превращается в молекулу фруктозо-1,6-бифосфата с использованием двух молекул АТФ. Далее из каждой молекулы фруктозо-1,6-бифосфата образуется две фосфотриозы (диоксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат), способные взаимопревращаться друг в друга под действием фермента триозо-фосфат изомеразы. Последующее превращение каждой молекулы глицеральдегид-3-фосфата в пируват в ходе последовательных ферментативных реакций приводит к синтезу 2 молекул АТФ. При этом НАДН, образуемый глицеральдегид-3-фосфатДГ, реокисляется в результате действия глицерофосфатного челнока, состоящего из цитоплазматической и митохондриальной форм глицерол-3-фосфатДГ. Выполненные нами эксперименты показали, что в конечном итоге электроны переносятся на альтернативную дыхательную цепь, локализованную на внутренней мембране митосом в спорах микроспоридий, и далее на кислород под действием альтернативной оксидазы. Поскольку данная схема подразумевает возможность превращения в пируват обеих фосфотриоз, образующихся в гликолизе, чистый выход АТФ в спорах микроспоридий составляет две молекулы на каждую использованную молекулу глюкозы.

Отдельно следует отметить данные о связи митосом микроспоридий с другими мембранными структурами спор. С одной стороны, этот результат согласуется с полученными ранее данными о контакте митосом с ядерной оболочкой микроспоридий, что может объясняться необходимостью их правильной сегрегации при делении клеток паразита (Vavra, 2005). С другой стороны, мы показали ассоциацию митосом паразита с ЭР и другими мембранами на криосрезах спор. Поскольку набор митохондриальных генов у микроспоридий очень ограничен (Katinka et al. 2001, Akiyoshi et al., 2009, Cornman et al., 2009) митосомы паразита могут нуждаться в пространственном и функциональном взаимодействии с другими

мембранными структурами. Например, белковые комплексы, обеспечивающие пространственную связь между ЭР и митохондриями, сравнительно недавно были обнаружены в дрожжевых клетках (Kornmann et al., 2009). При этом предполагается, что обнаруженная связь играет важную роль в таких процессах как регуляция биосинтеза митохондриальных мембран,  $Ca^{2+}$ -зависимый сигналинг и импорт белков (Kornmann, Walter, 2010).

### **3. 4. Уникальный пируват-метаболизирующий фермент микроспоридий и роль пирувата в физиологии паразитов.**

#### **3.4.1. Состояние проблемы к началу исследований.**

Представленная выше схема энергетического и углеводного обмена в спорах микроспоридии *P. locustae* (Рисунок 16) предполагает, что все триозы, образуемые в ходе гликолиза, превращаются в пируват (пировиноградную кислоту). С одной стороны, в пользу накопления пирувата в качестве конечного продукта обмена паразитов свидетельствовало отсутствие в геномах всех изученных видов микроспоридий каких-либо классических ферментов, способных метаболизировать пируват. С другой стороны, в геномах микроспоридий всегда обнаруживались последовательности, кодирующие две субъединицы (альфа и бета) компонента E1 пируватдегидрогеназного комплекса (Katinka et al., 2001; Fast, Keeling, 2001). При этом накапливались данные о том, что крайне редуцированная пируватдегидрогеназа (ПДГ) микроспоридий все же может быть функционально активной и участвовать в дальнейшем превращении пирувата. В частности, было продемонстрировано наличие мРНК-транскриптов обеих субъединиц в спорах *P. locustae* (Williams, Keeling, 2005). Позднее мы показали относительно высокое содержание обоих белков в спорах *P. locustae*, но не в стадиях внутриклеточного развития паразитов

(раздел 2.4.3. настоящей диссертации). Дальнейшее изучение ПДГ микроспоридий представляло несомненный интерес в силу ряда причин.

Во-первых, в эукариотических клетках пируватдегидрогеназный комплекс локализован в митохондриях. Поскольку у микроспоридий производные митохондрий представлены лишь крайне редуцированными митосомами, эволюционная релокализация фермента в какой-либо другой компартмент клетки (споры) паразита была весьма вероятна.

Во-вторых, изучение ПДГ микроспоридий помогло бы ответить на вопрос о механизмах, обеспечивающих биосинтез ацетил-КоА в клетках и спорах паразита. В классической эукариотической клетке ацетил-КоА образуется в митохондриях из пирувата под действием упомянутого выше сложного пируватдегидрогеназного комплекса. Дальнейшее поступление ацетил-КоА в цикл Кребса сопровождается образованием трикарбоновой лимонной кислоты (цитрата). Именно цитрат переносится из митохондрий в цитозоль и участвует в образовании немитохондриального (ядерно-цитоплазматического) пула ацетил-КоА. Под действием фермента АТФ цитратлиазы цитрат взаимодействует с КоА с образованием дикарбоновой кислоты оксалоацетата (ЩУК) и ацетил-КоА. Далее ЩУК переносится в митохондрии и вновь участвует в образовании цитрата, а ацетил-КоА используется в различных метаболических процессах. Микроспоридии лишены классических митохондрий, цикла трикарбоновых кислот и АТФ цитратлиазы, но сохраняют потребность в ядерно-цитозольном пуле ацетил-КоА.

В частности, эти паразиты сохранили достаточно широкий репертуар генов, вовлеченных в мевалонатный путь, направленный на синтез диметилаллил пирофосфата и изопентенил пирофосфата - соединений, играющих важную роль в пренилировании (присоединении остатков изопреноидов) белков, биосинтезе стероидов и поддержании структуры клеточных мембран. Кроме того, ацетил-КоА необходим для

ацетилирования гистонов. Важная роль ацетил-КоА в ацетилировании гистонов обнаружена у дрожжей (Takahashi et al., 2006). Более того, доказано, что ацетилирование остатков лизина в составе гистонов нейтрализует положительный заряд белка и ослабляет взаимодействие в комплексе гистон-ДНК, а также связи между нуклеосомами, что облегчает доступ транскрипционного комплекса к активируемому гену (Sterner, Berger, 2000). Поскольку у микроспоридий обнаружены гены ферментов, ответственных за регуляцию транскрипционной активности хроматина с помощью этого механизма, важная роль ацетил-КоА в физиологии этих паразитов не вызывала сомнений. Проанализировав состав генов, обнаруженных в геноме паразита, мы пришли к выводу что, при соблюдении двух условий, микроспоридии могли бы обеспечить биосинтез ацетил-КоА в ядерно-цитоплазматическом компартменте. Во-первых, редуцированная форма ПДГ микроспоридий должна сохранить способность декарбоксилировать пируват с образованием углекислоты ( $\text{CO}_2$ ) и молекулы ацетата. Во-вторых, митохондриальный фермент должен изменить свою внутриклеточную локализацию и накапливаться в цитоплазме клетки (споры) паразита. Образующийся в ходе гликолиза пируват мог бы в этом случае превращаться в ацетат с помощью ПДГ и далее в ацетил-КоА под действием фермента ацетилКоА синтетазы, также обнаруженной в геноме микроспоридий.

Для подтверждения данной рабочей гипотезы в первую очередь было необходимо показать наличие пируват-метаболизирующей активности в спорах микроспоридий.

### **3.4.2. Пируват-конвертирующая активность в спорах микроспоридий.**

На первом этапе исследования была осуществлена инкубация гомогената свежесыведенных спор микроспоридий *P. grylli* и *P. locustae* в присутствии 0.2 мМ пирувата в течение 16 часов при комнатной температуре.

Последующее определение содержания этого соединения в реакционной смеси с использованием лактатДГ в качестве вспомогательного фермента показало, что фермент, присутствующий в гомогенате  $1.5 \times 10^9$  спор микроспоридий метаболизирует около 0.4 мМ пирувата.

На следующем этапе очищенные споры *P. grylli* разрушали в изотоническом растворе ТС и гомогенат центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин. Часть супернатанта и ресуспендированного в ТС осадка кипятили при 100°C в течение 10 мин перед определением активности. Данный эксперимент показал полную инактивацию пируват-конвертирующей активности в ходе высокотемпературной обработки. В необработанных пробах общая и удельная (мкмоль/мин на мг белка) активность фермента была соизмерима в супернатанте и ресуспендированном в ТС осадке (Таблица 8).

С целью изучения особенностей локализации пируват-конвертирующей активности в спорах микроспоридий споры *P. grylli* разрушали в ТС и последовательно центрифугировали при 100 g 10 мин, при 3000 g 20 мин и при 300 000 g 20 мин. Анализ полученных фракций (супернатанта и ресуспендированных до объема супернатанта осадков) подтвердил, что как и в предыдущем эксперименте, около половины общей активности осаждалось уже при 3000 g в течение 20 мин (Таблица 9). Однако остальная часть фермента оставалась в растворимой фракции даже после высокоскоростного ультрацентрифугирования. Полученный результат показал, что изучаемый фермент локализуется в растворимой фракции гомогената спор. Сходный результат получен при аналогичном центрифугировании гомогената очищенных спор микроспоридии *P. locustae* (Таблица 10). Около половины фермента *P. locustae* также локализовалось в растворимой фракции гомогената спор. Поскольку все мембранные структуры, включая рудименты митохондрий - митосомы микроспоридий, полностью осаждаются при высокоскоростном ультрацентрифугировании, данный результат косвенно

Таблица 8

**Пируват-метаболизирующая активность в гомогенате спор микроспоридии *Paranosema grylli* после центрифугирования при 3000 g в течение 20 мин.**

Фракция	Активность <sup>a</sup> (нмоль/мл)	Белок (мг/мл)	Удельная активность (нмоль/мг белка)	% общей активности <sup>b</sup>	Активность после инактивации при 100°C
Осадок	194	1.4	140	41	0
Супернатант	283	2.8	100	59	0

<sup>a</sup> - инкубация в течение 16 h при комнатной температуре;

<sup>b</sup> - объем супернатанта и ресуспендированного осадка был равен 1.2 мл.

Таблица 9

**Распределение пируват-конвертирующей активности в результате центрифугирования гомогената спор микроспоридии *Paranosema grylli*.**

	Активность (нмоль/10 <sup>9</sup> спор)		% общей активности <sup>a</sup>		Удельная активность (нмоль/мг белка)	
	1 час	16 часов	1 час	16 часов	1 час	16 часов
	30°C	22°C	30 °C	22°C	30°C	22°C
100g 10 мин, грубый дебрис	27	83	34	29	н/о <sup>б</sup>	н/о
3000g 20 мин, осадок	9	65	12	23	23	163
300000g 20 мин, осадок	3	20	4	7	4	30
300000g 20 мин, супернатант	39	115	50	41	32	96

<sup>a</sup> - объем супернатанта и ресуспендированных в ТС осадков равен 1 мл;

<sup>б</sup> - концентрация белков не определялась в грубом дебрисе (осадке после первого центрифугирования).

Таблица 10

**Распределение пируват-конвертирующей активности в результате центрифугирования гомогената спор микроспоридии *Paranosema locustae*.**

	Активность <sup>а</sup> (нмоль/10 <sup>9</sup> спор)	% общей активности <sup>б</sup>
100g 10 мин, грубый дебрис	81	27
3000g 10 мин, осадок	31	11
15000g 10 мин, осадок	7	2
300000g 30 мин, осадок	43	14
300000g 30 мин, супернатант	137	46

<sup>а</sup> - инкубация в течение 16 часов при комнатной температуре;

<sup>б</sup> - объем супернатанта и ресуспендированных в ТС осадков равен 1 мл.

свидетельствовал о релокации митохондриального белка в цитоплазматический компартмент спор паразита.

С целью исключить влияние эндогенных соединений, накапливающихся в спорах микроспоридий, на активность изучаемого фермента на следующем этапе исследования было предпринято обессоливание белков спор *P. grylli* с помощью гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-25. Для этого споры, гомогенизированные в ТС, центрифугировали при 13 000 g 20 мин и супернатант пропускали через колонку, уравновешенную тем же буфером. Как показано в Таблице 11, удельная активность в исходном супернатанте и после обессоливания была одинаковой. Таким образом, компоненты, присутствующие в реакционной смеси (0.2 mM пируват, 25 mM К-фосфатный буфер (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>) оказались достаточными для обеспечения активности изучаемого фермента. Полученный результат оставляет открытым вопрос об участии дополнительных белковых компонентов в превращении пирувата.

Наиболее вероятный состав пируват-конвертирующего фермента микроспоридий включает в себя две альфа и две бета субъединицы компонента E1 пируват-дегидрогеназного комплекса. Есть все основания полагать, что такой фермент мог бы осуществлять окислительное декарбоксилирование пирувата, превращая его в пируват. Экспрессия в различных клетках *E. coli* E1 альфа и E1 бета субъединиц пируватдегидрогеназного комплекса бактерии *Bacillus stearothermophilus* с последующим их смешиванием приводила к формированию активного гетеротетрамерного комплекса  $\alpha_2\beta_2$  (Lessard, Perham, 1994). Реакция, катализируемая таким ферментом может быть описана двумя уравнениями:

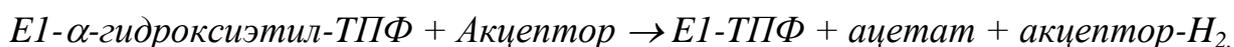


Таблица 11

**Пируват-конвертирующая активность в спорах *Paranosema grylli* после гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-25.**

	Активность <sup>a</sup> (нмоль/мл)	Белок (мг/мл)	Удельная активность (нмоль/мг белка)	Объем (мл)	Общая активность (нмоль)	Выход активности (%)
Исходный супернатант	201	1.88	107	1.2	240	100
Фракция после гель-фильтрации	123	1.1	112	1.5	185	77

<sup>a</sup> - инкубация 16 часов при комнатной температуре.

где ТПФ - кофермент тиаминпирофосфат, а Акцептор - какой нибудь акцептор электронов (атомов водорода). В составе сложного пируват-дегидрогеназного комплекса компонент E1 ассоциирован с компонентами E2 и E3. При этом липоевая кислота компонента E2 является акцептором  $\alpha$ -гидроксиэтила и электронов. Поскольку компоненты E2 и E3 утрачены микроспоридиями в ходе эволюции, пируватдегидрогеназа микроспоридий должна использовать какой-то другой пока не установленный акцептор электронов. Например, пируват:хинон оксидоредуктаза способна использовать как физиологические (хиноны), так и искусственные (2,6-дихлориндофенол (DCPIP)) акцепторы электронов.

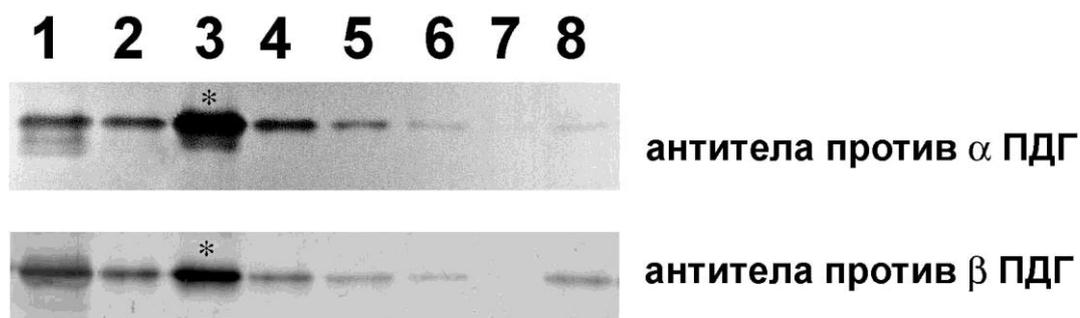
Какие именно соединения фермент микроспоридий использует в качестве акцептора электронов, еще предстоит выяснить. Однако уже сейчас можно сказать, что пируват не является конечным продуктом углеводного обмена микроспоридий. Вероятно, редуцированная ПДГ микроспоридий вместе с ферментом ацетил-КоА синтетаза участвует в формировании ядерно-цитоплазматического пула ацетил-КоА. Для подтверждения эволюционной релокализации ПДГ паразита мы осуществили иммунолокализацию фермента в спорах микроспоридии *P. locustae* с помощью полученных ранее антител.

### **3.4.3. Иммунолокализация ПДГ в спорах микроспоридий: эволюционная релокализация митохондриального белка в цитоплазму спор паразита.**

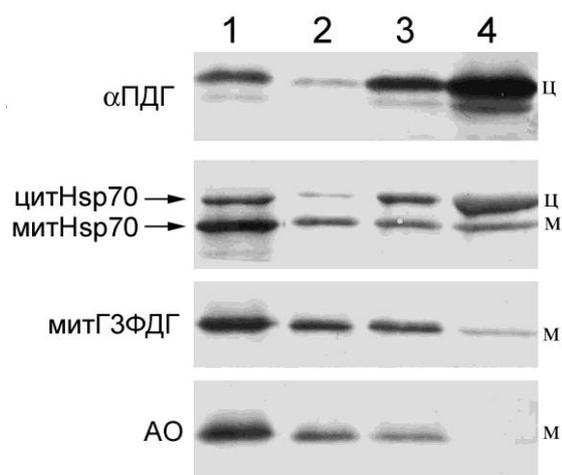
Ранее мы показали, что антитела, полученные к альфа и бета субъединицам ПДГ *P. locustae*, практически не распознают соответствующий белок в мерогональных и спорогональных стадиях внутриклеточного развития паразита. Поэтому для экспериментов по изучению локализации ПДГ микроспоридий были использованы зрелые споры *A. locustae*. С целью получения проб для иммуноблоттинга, зрелые очищенные споры микроспоридий были механически разрушены в присутствии 0.3 М сахарозы

(раствора ТС) и полученный гомогенат был последовательно центрифугирован при разных скоростях. Последующий анализ конечного супернатанта и ресуспендированных до его объема осадков показал, что даже в результате высокоскоростного ультрацентрифугирования в течение часа значительная часть ПДГ остается в растворимой фракции (Рисунок 17). Полученный результат соответствовал приведенным ранее данным по измерению пируват-конвертирующей активности во фракциях после центрифугирования гомогенатов спор *P. grylli* и *P. locustae* и свидетельствовал о возможной цитоплазматической локализации митохондриального фермента в спорах микроспоридий.

Поскольку мы располагали антителами к белкам, для которых уже показана локализация в митосомах микроспоридий (митHsp70, АО, митГ-3-ФДГ), интерес представлял сравнительный анализ распределения митосомальных белков и субъединиц ПДГ во фракциях после центрифугирования гомогената спор. На Рисунке 18 представлены результаты такого эксперимента. Сравнительный анализ распределения альфа ПДГ во фракциях после центрифугирования подтвердил накопление белка в итоговом супернатанте после ультрацентрифугирования (Рисунок 18, дорожка 4). Аналогичный результат наблюдался в случае цитоплазматической формы Hsp70, неспецифично окрашиваемой антителами к митохондриальной форме шаперона. Напротив, митосомальные белки АО и митГ-3-ФДГ практически отсутствовали в конечном супернатанте и полностью осаждались в ходе центрифугирования (Рисунок 18, дорожки 1-3). Митосомальный шаперон митHsp70 в небольшом количестве присутствовал в супернатанте после ультрацентрифугирования, что может объясняться высвобождением этого растворимого белка митосом, частично разрушенных при гомогенизации спор. Присутствие следовых количеств митГ-3-ФДГ в том же супернатанте объясняется тем, что данный фермент не имеет трансмембранного домена и связан с митосомальной мембраной с



**Рисунок 17. Анализ локализации ПДГ в спорах *P. locustae* с помощью иммуноблоттинга.** Гомогенат спор микроспоридии *P. locustae* последовательно центрифугировали при 100 g 10 мин (дорожка 1), при 20 000 g 10 мин (дорожка 2), при 436 000 g 30 мин (дорожка 8), ресуспендировали в растворе ТС, добавленного до объема конечного супернатана (дорожка 3), и анализировали с помощью иммуноблоттинга. Осадок после ультрацентрифугирования дополнительно отмыт 4 раза с помощью ресуспендирования в том же объеме ТС и супернатанты после центрифугирования при 436 000 g 30 мин нанесены на тот же гель (дорожки 4-7). Звездочкой указан итоговый супернатант с наибольшим содержанием ПДГ.



**Рисунок 18. Различное распределение пируват дегидрогеназы и митосомальных белков после центрифугирования гомогената спор микроспоридии *P. locustae*.**

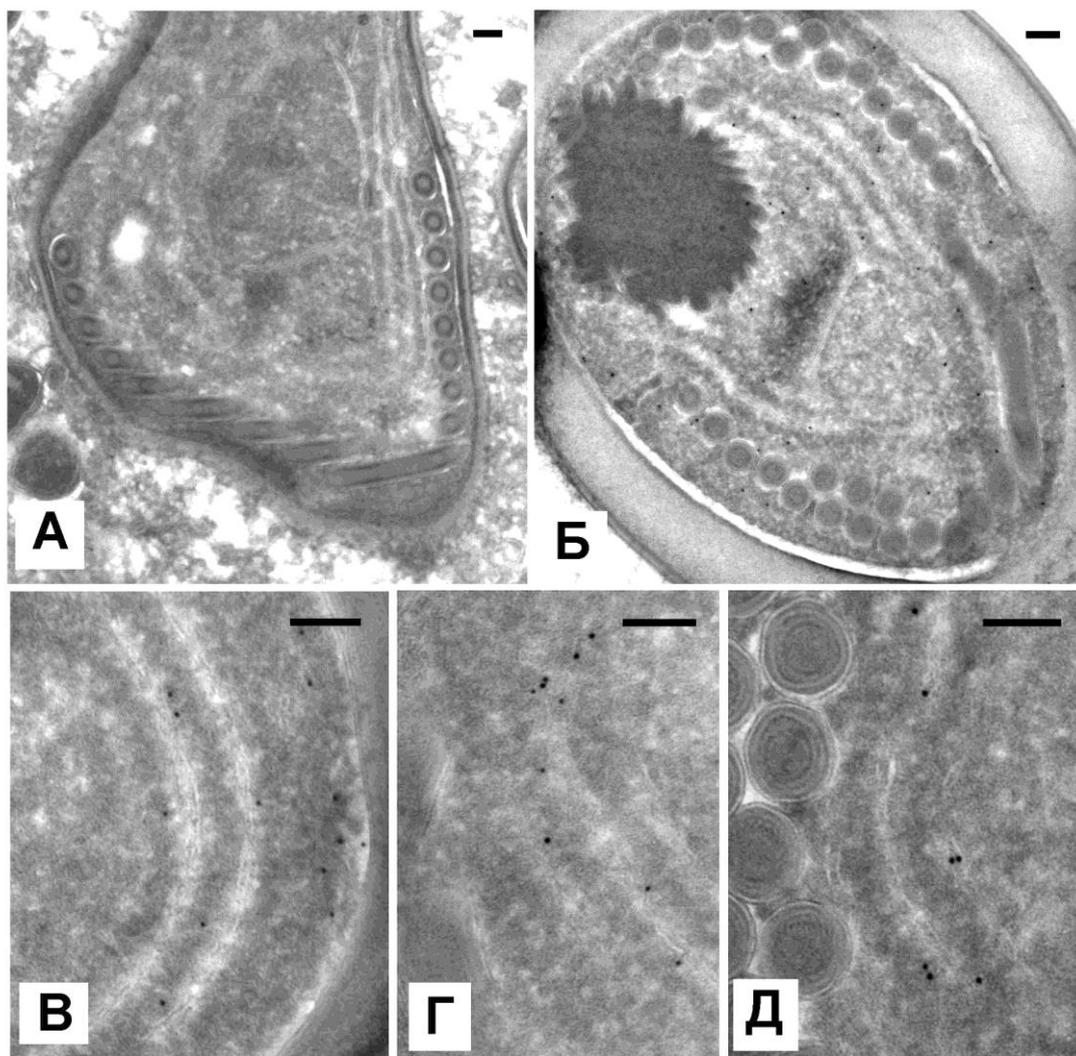
Осветленный в ходе центрифугирования при 100 g в течение 10 мин гомогенат спор последовательно центрифугировали и осадки ресуспендировали в ТС до объема конечного супернатанта. Полученные пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга с соответствующими специфичными антителами. Дорожка 1, осадок после центрифугирования при 14000 g 20 мин; дорожки 2-3, тяжелый (нижний) легкий (верхний) слой осадка после ультрацентрифугирования при 200 000 g в течение часа; дорожка 4, итоговый супернатант после ультра центрифугирования. Ц и М обозначают белки локализованные соответственно в цитоплазме и митосомах спор паразита.

помощью гидрофобных взаимодействий (Janssen et al. 2002). Полученный результат еще раз подтвердил предположение о релокализации субъединиц митохондриальной ПДГ в цитоплазматический компартмент в ходе эволюции микроспоридий.

Для того чтобы окончательно подтвердить этот интересный факт, мы использовали антитела, полученные против альфа-субъединицы ПДГ *P. locustae*, для иммуномечения ультратонких (50-60 нм) криосрезов жирового тела саранчи. Электронная микроскопия иммуномеченных криосрезов показала очень низкое содержание или отсутствие фермента в стадиях внутриклеточного развития (Рисунок 19, А). В зрелых спорах антитела не распознавали каких либо органелл, будучи равномерно распределенными в цитоплазме (Рисунок 19, Б-Д).

#### **3.4.4. Иммунопреципитация ПДГ *P. locustae*.**

Для того чтобы показать, что обе субъединицы (альфа и бета) ПДГ микроспоридий вместе формируют олигомерный ферментный комплекс, антитела против каждой из субъединиц были иммобилизованы на шариках агарозы с пришитым белком А. Агароза с иммобилизованными антителами была проинкубирована с гомогенатом спор, осветленным при 20000 g в течение 20 мин, тщательно отмыта ТСБ и связавшиеся иммунные комплексы элюированы в 0.2 М буферном растворе глицин-Cl (рН 2.5). Анализ фракций после элюции с помощью иммуноблоттинга показал, что оба типа иммобилизованных антител (против альфа и бета субъединиц ПДГ) специфично распознавали и сосаждали обе субъединицы ПДГ (Рисунок 20). Антитела, полученные против Sec13 субъединицы комплекса COP II (см. Раздел 2.4.3.) и иммобилизованные на частицах агарозы в качестве контроля не связывали компоненты ПДГ микроспоридий. Полученный результат подтвердил, что обе субъединицы ПДГ *P. locustae* входят в состав вместе формируют фермент в виде олигомера.



**Рисунок 19.** Иммулокализация ПДГ *P. locustae* на криосрезках зараженного жирового тела саранчи с помощью антител к альфа субъединице фермента. Электронная микроскопия окрашенных срезов показала низкое содержание фермента в стадиях внутриклеточного развития (А). В зрелых спорах антитела не распознавали каких либо органелл, будучи равномерно распределены в цитоплазме (Б-Д). Размер масштабной линейки составляет 0.2 мкм.



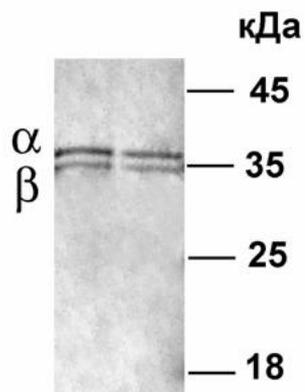
**Рисунок 20. Иммунопреципитация ПДГ *P. locustae*.**

Антитела против альфа ПДГ (дорожка 1), бета ПДГ (дорожка 2) и белка Sec13 (дорожка 3, отрицательный контроль) иммобилизованы на частицах агарозы с пришитым белком А. Нативные комплексы были преципитированы из осветленного гомогената спор и проанализированы с помощью иммуноблоттинга с соответствующими антителами.

С целью установить, не входят ли какие-либо дополнительные субъединицы в состав молекулы ПДГ микроспоридий, нами была предпринята попытка выделить нативный фермент из гомогената спор *P. locustae* с помощью иммуно-аффинной хроматографии. С этой целью полученные ранее антитела к альфа субъединице ПДГ иммобилизовали на BrCN-активированной сефарозе и колонку с полученным сорбентом использовали для связывания ПДГ из осветленного гомогената спор, как это было описано в предыдущем эксперименте по иммунопреципитации. Связавшиеся с колонкой белки элюировали в присутствии 0.2 М глицин- HCl (pH 2.5), разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ и окрашивали красителем Кумасси (Рисунок 21). Данный эксперимент ясно показал, что в состав молекулы ПДГ микроспоридий входят только две субъединицы (альфа и бета) ПДГ в примерно равном соотношении.

#### **3.4.5. Научное значение полученных результатов.**

До начала нашего исследования локализация ПДГ микроспоридий не была известна. В изученных эукариотических организмах белки, формирующие пируватдегидрогеназный комплекс, транспортировались клеткой в один из компартментов, выполнявших метаболическую функцию – митохондрии или пластиды растений. Поскольку микроспоридии лишены пластид и канонических митохондрий, единственными органеллами, куда могла бы транспортироваться редуцированная ПДГ являются митосомы паразитов. Однако у всех известных субъединиц ПДГ микроспоридий не обнаружены какие-либо последовательности, ответственные за транспорт фермента в митохондрии (митосомы). Кроме того, обе субъединицы ПДГ *P. locustae*, экспрессированные в клетках дрожжей, не распознавались как митохондриальные белки и не накапливались в этих органеллах (Burri et al., 2006). В нашем исследовании мы получили прямые доказательства эволюционной релокации уникального фермента микроспоридий из



**Рисунок 21. Анализ нативной ПДГ микроспоридии *P. locustae*, выделенной из осветленного гомогената спор с помощью иммуноаффинной хроматографии на колонке с иммобилизованными антителами.**

Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ и окрашивали Кумасси R-250.

митохондрий в цитоплазматический компартмент клетки. Присутствие двух субъединиц ПДГ в геномах всех изученных видов микроспоридий предполагает важную роль фермента в физиологии паразитов. Как отмечалось ранее, функция ПДГ микроспоридий должна быть сходной с функцией тиамин-пирофосфат - зависимых ферментов, катализирующих окислительное декарбоксилирование пирувата. Образующаяся при этом уксусная кислота может участвовать в образовании ацетил-КоА с помощью фермента ацетил-КоА синтетаза, обнаруженного у микроспоридий. Поскольку микроспоридии лишены других ферментов, способных синтезировать ацетил-КоА, локализация ПДГ в цитоплазматическом компартменте клетки паразита может быть связана с необходимостью биосинтеза этого важного соединения.

Интересным результатом данного исследования является и специфичное накопление ПДГ в зрелых спорах. При этом фермент практически отсутствовал в клетках микроспоридий на этапе активной мерогонии и спорогонии, когда паразиту требуются активные биосинтетические процессы. Это позволяет предположить, что микроспоридии нуждаются в собственном ацетил-КоА именно на стадии споры. Поскольку, как отмечалось выше, ацетил-КоА играет важную роль в активации транскрипции хроматина посредством ацетилирования гистонов, одна из основных функций собственного метаболического аппарата микроспоридий может быть связана с активацией споры при заражении нового хозяина.

Одним из самых интересных вопросов, связанных с изучением ПДГ микроспоридий, остается идентификация возможных акцепторов электронов, высвобождаемых в ходе окислительного декарбоксилирования пирувата. В классическом пируватдегидрогеназном комплексе электроны переносятся на липоевую кислоту. Бактериальный фермент пируват:хинон оксидоредуктаза является периферическим мембранным белком и использует хиноны для передачи электронов на дыхательную цепь (Mather et al., 1982).

Пируват синтаза (пируват:ферредоксин оксидоредуктаза) использует в качестве акцептора электронов белок ферредоксин. Поскольку в данном исследовании мы не обнаружили каких-либо дополнительных белков в составе нативной молекулы ПДГ, а также связь фермента с мембранными структурами спор, для дальнейшего изучения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований в будущем.

## **Глава 4. Морфофункциональные особенности секреторного аппарата микроспоридий.**

### **4.1. Уникальная структура комплекса Гольджи микроспоридий: непрерывность тубулярной сети и отсутствие транспортных везикул.**

#### **4.1.1. Состояние изученности проблемы к началу исследований.**

Доказательством важной роли секреторного аппарата в физиологии микроспоридий можно считать присутствие цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭР), покрытых рибосомами, на всех стадиях жизненного цикла паразитов (Vavra, Larsson, 1999). Одиночные цистерны ЭР присутствуют уже в спороплазме - амeboидном зародыше, попадающем через полярную трубку во вновь заражаемую клетку хозяина. На стадии мерогонии ЭР в клетках микроспоридий остается слабо развитым и основная часть рибосом находится в цитоплазме паразита в свободном состоянии. По мере того как клетка паразита приближается к процессу спорообразования, цистерн ЭР становится больше и они формируют несколько слоев вокруг ядра клетки (Vavra, Larsson, 1999). Сходную тенденцию развития в ходе жизненного цикла паразитов демонстрирует и аппарат Гольджи микроспоридий.

Гольджи-подобные мембранные структуры впервые обнаружены в клетках микроспоридий чешским исследователем И. Ваврой (Vavra, 1965). Данная структура сразу была охарактеризована, как «везикулярная» или «примитивная» зона Гольджи (“primitive Golgi zone”), поскольку морфологически значительно отличалась от классического аппарата Гольджи, состоящего из параллельно уложенных в стопку цистерн. В отличие от последнего, аппарат Гольджи на срезах клетки микроспоридий выглядел, как лишенное рибосом скопление везикул. При этом везикулы в центре данного образования имели меньший размер по сравнению с везикулами на его периферии (Vavra, 1976). В начале семидесятых подобные

везикулярные структуры описаны у целого ряда видов микроспоридий (Walker, Hirsch, 1972; Youssef, Hammond, 1971). Как и в случае с цистернами ЭР, анализ изменения структуры аппарата Гольджи микроспоридий в ходе жизненного цикла показал, что «везикулярные» структуры становятся более многочисленными и крупными по мере приближения стадии внутриклеточного развития к этапу спорогонии. В поздних споронтах и в споробластах Гольджи-подобные структуры занимают уже значительную часть клетки, что подразумевает их активное участие в формировании структурных элементов споры (Vavra, 1976). Позднее получены первые гистохимические данные, подтверждающие, что выявленные мембранные структуры действительно представлены Гольджи комплексом микроспоридий. В частности, в Гольджи-подобных везикулярных структурах, ассоциированных с формирующейся полярной трубкой споробластов микроспоридии *Glugea stephani*, гистохимическими методами выявлена активность тиамин пирофосфатазы (нуклеозид дифосфатазы) - фермента, специфично локализующегося в транс-компарменте Гольджи (Cali, Takvorian, 1999). При этом активность фермента увеличивается в везикулах по мере созревания споробластов, а также в структурах, непосредственно связанных с формирующимся полярным филаментом. Перечисленные выше данные позволили исследователям прийти к однозначному выводу об активной роли секреторного аппарата микроспоридий в построении споры и формировании ее разнообразных структурных компонентов.

Следующий этап в изучении секреторного аппарата микроспоридий связан с анализом данных, полученных при секвенировании отдельных генов микроспоридий. В частности, расшифровка нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки полярной трубки (Delbac et al., 1998; Keohane, Weiss, 1999) и оболочки споры (Bohne et al., 2000; Nayman et al., 2001) микроспоридий, показала присутствие N-концевых сигнальных

пептидов, ответственных за транслокацию белков в просвет цистерн ЭР и их дальнейшую секрецию. Таким образом, были получены первые данные о том, что структурные компоненты оболочки споры и полярной трубки микроспоридий должны поступать в просвет ЭР, транспортироваться через аппарат Гольджи и доставляться к формирующимся структурам.

Расшифровка генома микроспоридий *E. cuniculi* впервые показала что как и другие эукариоты, паразиты этой группы действительно располагают основным набором белков, вовлеченных в процессы ко-трансляционной транслокации полипептидов в просвет ЭР (Katinka et al., 2001). В геноме *E. cuniculi* были также найдены компоненты, вовлеченные в процессы формирования COPI- и COPII- зависимых везикул, и SNARE-, Rab- и ARF- белки, участвующие в процессах внутриклеточного транспорта.

Приведенные выше данные позволили предположить, что, несмотря на значительные морфологические отличия в структурах «примитивной везикулярной зоны» микроспоридий и классического комплекса Гольджи, обнаруженного в клетках млекопитающих, основные (базовые) механизмы внутриклеточного транспорта у эукариот должны быть сходными. Это привело двух исследователей Ю. Я. Соколову и А. А. Миронова к идее о возможности использования микроспоридий как минимальной модели эукариотической клетки для изучения общих вопросов внутриклеточного транспорта и секреции. Впервые эта мысль была высказана при написании проекта по изучению секреторного пути микроспоридий, поддержанного фондом ИНТАС в 1999 году.

Механизмы внутриклеточного транспорта и секреции остаются одним из самых интересных и широко обсуждаемых вопросов современной биологии (Farquhar, Palade, 1981). Несмотря на то, что за исследования в этой области американским ученым Р. Шекману, Д. Ротману и Т. Зюдхофу в 2013 году присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине, вопрос о роли везикул в процессах внутриклеточного транспорта остается открытым.

Наиболее популярными моделями внутриклеточного транспорта остаются везикулярная теория и модель созревания цистерн (Beznoussenko, Mironov, 2002; Mironov et al., 2005). Везикулярная модель или модель диссоциации основана на представлении, что различные компартменты секреторного пути стабильны и полностью изолированы друг от друга. При этом связь между ними осуществляется с помощью небольших транспортных везикул. Формирование покрытых белковыми комплексами (окаймленных) везикул на поверхности более проксимального (находящегося ближе к эндоплазматическому ретикулуму) компартмента сопровождается концентрированием в них транспортируемых белков (карго). После отпочковывания транспортная везикула теряет белковое окружение, диффундирует через цитозоль и сливается со следующим более дистальным компартментом, что обеспечивает перенос карго. Предложенная более 30 лет назад везикулярная модель долгое время оставалась общепризнанной и до сих пор публикуется во многих учебниках как доказанная теория. Однако постепенно накапливается целый ряд данных, противоречащих везикулярной модели. Например, с позиции везикулярной теории сложно объяснить отсутствие в транспортных везикулах целого ряда секретируемых белков (альбумин, проинсулин и т.д.). Кроме того, остается непонятным, как осуществляется транспорт больших молекулярных комплексов проколлагена, по своему размеру в 5 раз превышающих средний размер везикул (Bonfanti et al., 1998). Именно наблюдения за процессами транспорта крупных надмолекулярных агрегатов послужили основой для создания модели созревания и прогрессии цистерн (Becker et al., 1995; Mironov et al., 1997).

Модель созревания цистерн подразумевает, что транспортируемый белок остается в составе крупных мембранных компартментов, сравнимых по размеру с цистернами комплекса Гольджи и ЭР. Благодаря потоку мембран, осуществляемому в эукариотической клетке СОР-зависимыми везикулами, цистерны постепенно движутся из ЭР в компартменты цис-

Гольджи и далее в компартменты транс-Гольджи. При этом в различных мембранных компартментах (цистернах) секреторного пути поддерживается специфичная концентрация гликозидаз и трансфераз, обеспечивающих строгий порядок гликозилирования секретируемых белков (Mironov et al., 1997). Именно транспортные везикулы осуществляют возврат (рециклинг) Гольджи-специфичных ферментов в свои исходные компартменты по мере продвижения цистерн в дистальном направлении, а также обеспечивают смену состава липидов и белков в цистернах по мере их созревания (Bannykh, Balch, 1997; Glick et al., 1997). Однако и эта модель не смогла объяснить все экспериментальные данные, полученные при изучении секреторного аппарата эукариотической клетки. В частности, возврат Гольджи-специфичных ферментов в более ранние компартменты подразумевает их концентрирование в везикулах, формируемых с участием комплекса COPI. Однако повышенное содержание гликозидаз и трансфераз не обнаружено в COPI-зависимых везикулах (Orci et al., 2000; Kweon et al., 2004). Более того, COPI-формируемые везикулы не обнаружены в наиболее дистальной цистерне транс-Гольджи (Ladinsky et al., 1999; Ladinsky et al., 2002), несмотря на то, что такие ферменты как сиалилтрансфераза и фукозилтрансфераза здесь присутствуют и должны быть возвращены в более проксимальный компартмент (Rabouille et al., 1995; Opat et al., 2001).

Возможность объяснить все перечисленные выше противоречия появилась после публикации результатов изучения транспорта температурочувствительного варианта G-белка вируса везикулярного стоматита, слитого с GFP-белком, в клетках млекопитающих. Полученные данные ясно показали, что кинетика выхода белка из различных компартментов секреторного пути соответствует его транспортировке по непрерывным плеоморфным тубулярным структурам (Hirschberg, et al., 1998). Непрерывные временные связи между отдельными компартментами секреторного пути могли бы возникать в ситуации, когда слияние

мембранной структуры-переносчика с более дистальной цистерной предшествовало бы ее отделению от более проксимального компартмента. Например, слияние транспортного домена с более дистальной цистерной могло бы являться сигналом для ее отделения от более проксимального компартмента (Veznousseiko, Mironov, 2002). В этом случае транспорт мембранных белков по фактически непрерывному секреторному пути мог бы осуществляться с помощью латеральной диффузии молекул в липидном бислое мембран.

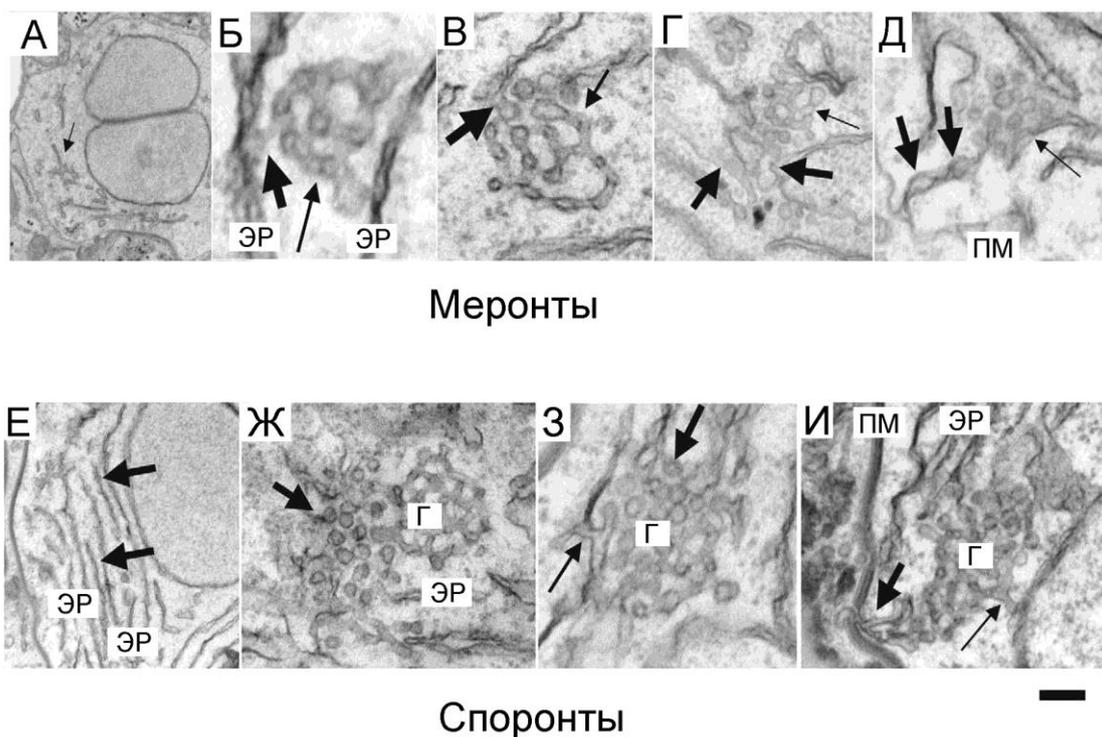
Как уже отмечено выше, одним из подходов для дальнейшего изучения общих механизмов внутриклеточного транспорта могло бы стать использование микроспоридий в качестве минимизированной в ходе эволюции модели эукариотической клетки. Приступая к структурно-функциональному анализу секреторного аппарата микроспоридий, в первую очередь мы хотели оценить роль СОР-зависимых везикул в работе системы внутриклеточного транспорта паразитов. Как и в предыдущих экспериментах, объектами данного исследования послужили два вида микроспоридий рода *Paranosema* - паразит жирового тела двупятнистого сверчка *P. grylli* и паразит жирового тела саранчовых *P. locustae*.

#### **4.1.2. Морфологический анализ Гольджи-подобных структур *P. grylli*.**

Электронно-микроскопический анализ клеток паразита на раннем мерогональном этапе развития позволил обнаружить скопления (кластеры) мембран размером около 300-700 нм (Рисунок 22, А). Эти образования состоят из продолговатых и округлых мембранных структур диаметром 30-50 нм, часто соединенных между собой более тонкими (25-35 нм) тубулами (Рисунок 22, Б, В). На срезе каждого меронта присутствует 5-7 таких кластеров, соединенных с ЭР и иногда ассоциированных с плазматической мембраной (Рисунок 22, Б-Д). По мере перехода меронтов к процессам спорогонии снаружи от цитоплазматической мембраны начинается

формирование будущей оболочки споры паразита. С этого момента клетка характеризуется как споронт (Vavra, Larsson, 1999). В споронтах *P. grylli* по сравнению с меронтами увеличивается количество цистерн ЭР (Рисунок 22, Е), а диаметр Гольджи-подобных мембранных кластеров возрастает до 800-900 нм (Рисунок 22, Ж-И). В составе кластера можно выделить более «везикулярную» часть, представленную скоплением округлых структур диаметром до 70 нм (Рисунок 22, Ж, З). На этой стадии развития паразитов более четко просматривается связь Гольджи-подобных кластеров паразита с плазматической мембраной и ЭР (Рисунок 22, З, И). Следующий этап спорогонии в клетках микроспоридий характеризуется началом построения полярной трубки. При этом клетка приобретает овальную форму и характеризуется как споробласт (Vavra, Larsson, 1999). Как показал электронно-микроскопический анализ споробластов микроспоридии *P. grylli*, отличительной особенностью клеток, приступивших к построению полярной трубки, служит наличие одиночного, крупного, хорошо развитого комплекса Гольджи, пространственно соединенного с помощью непрерывных тубул с формирующимся филаментом (Рисунок 23). Данный результат еще раз подтверждает активное участие секреторного аппарата микроспоридий в формировании структурных компонентов споры.

Для анализа трехмерной структуры секреторного аппарата микроспоридий на следующем этапе исследования был использован метод электронно-микроскопической томографии с последующей реконструкцией пространственной структуры Гольджи-подобных мембранных кластеров. Использование данного подхода ясно показало, что уже в меронтах изучаемые структуры представляют собой разветвленную тубулярную сеть с диаметром отдельных тубул около 25-40 нм, соединенную с ядерной мембраной и цистернами ЭР (Рисунок 24, А). Каждый тубулярный кластер состоит из двух морфологически различных частей. Первая часть представляет собой сеть, состоящую из разветвленных тубул диаметром 30-



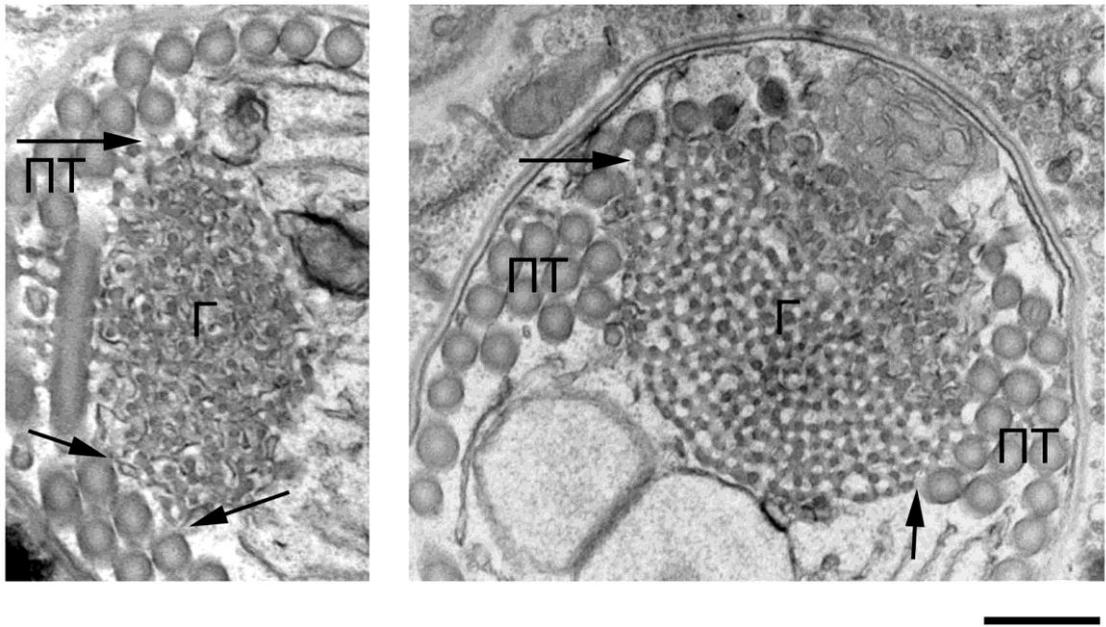
**Рисунок 22. Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры Гольджи-подобных структур в клетках микроспоридии *P. grylli*.**

А-Е. Скопления (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 «везикулярная» часть, представленная скоплением округлых структур диаметром до 70 нм (Ж, З, толстые стрелки) и 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 nm (Е); 200 nm (Д, З).



**Рисунок 23. Электронно-микроскопический анализ ультраструктуры одиночного комплекса Гольджи в споробластах микроспоридии *P. grylli*. Пространственная связь комплекса Гольджи (Г) с формирующейся полярной трубкой (ПТ) указана стрелками. Размер линейки 500 нм.**

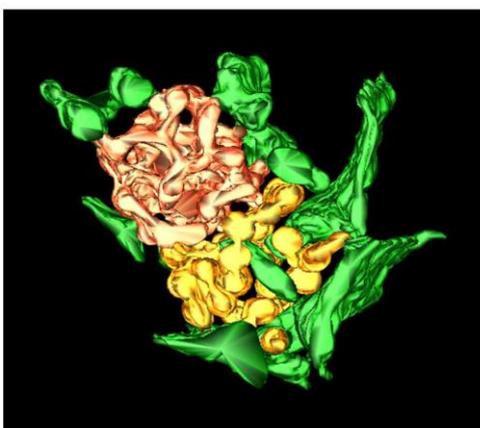
45 нм с уплощенными доменами на уровне разветвлений. На гладкой поверхности этих тубул не обнаружено каких-либо видимых покрытий, характерных для формирующихся и отпочковывающихся СОPI (Orci et al., 1986) и СОPII-везикул (Bannykh et al., 1996). Вторая часть кластеров состоит из менее разветвленной сети варикозных (имеющих периодические утолщения) тубул. Диаметр тубул в наиболее узких местах составлял около 25 нм. По мере превращения меронтов в споронты приблизительно в 2 раза увеличивалась варикозная часть Гольджи (Рисунок 24, Б, В). По мере превращения клеток паразита в поздние споронты и в споробласты структура тубулярной сети становилась морфологически более разнообразной с появлением разветвлений в местах варикозных расширений.

Наиболее интересным результатом электронной томографии секреторного аппарата меронтов, споронтов и споробластов микроспоридии *P. grylli* оказалось отсутствие изолированных везикул на всех стадиях внутриклеточного развития паразитов. 90% проанализированных кластеров были пространственно связаны с ЭР, 10% - с цитоплазматической мембраной паразита и все они были лишены каких-либо изолированных везикул. Следует отметить, что кластеры, демонстрирующие связь одновременно с ЭР и плазматической мембраной, не обнаружены на ранних стадиях внутриклеточного развития микроспоридий. Несмотря на то, что на электронно-микроскопических изображениях округлые структуры в составе тубулярных кластеров имели морфологическое сходство с везикулами, последовательный анализ виртуальных срезов отдельных кластеров показал, что все мембранные структуры Гольджи микроспоридий связаны в единую непрерывную сеть (Рисунок 25). Анализ трех перпендикулярных проекций для десяти отдельных “везикул” подтвердил, что все они пространственно соединены между собой тонкими тубулами в единую сеть.

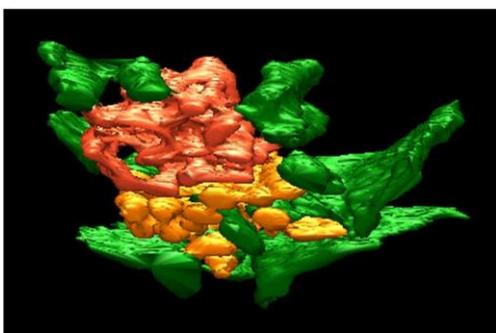
Отсутствие свободных везикул у микроспоридий противоречило двум общепринятым и описанным выше моделям внутриклеточного транспорта,



**А**  
меронт



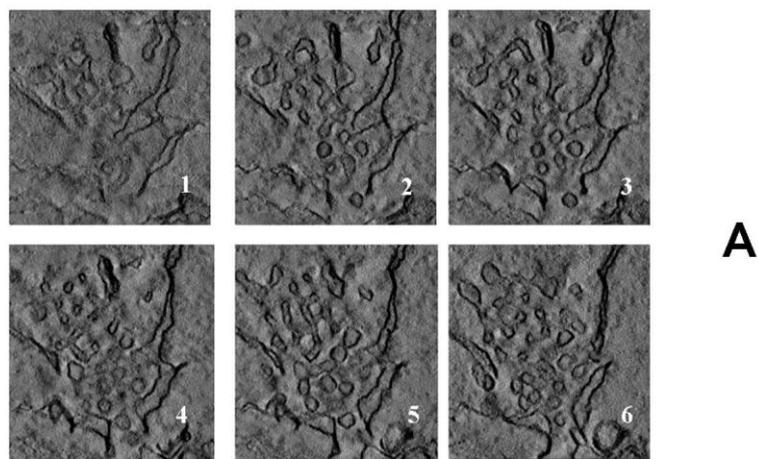
**Б**  
споронт



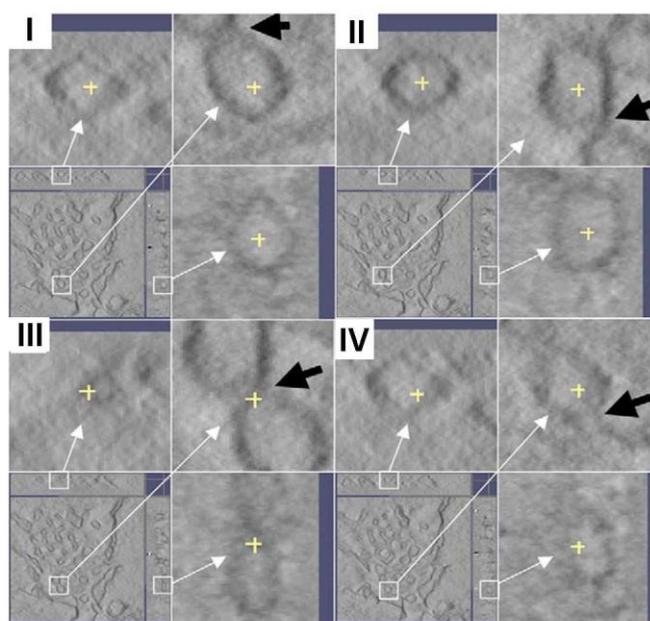
**В**  
поздний споронт

**Рисунок 24. Трехмерная реконструкция тубулярных кластеров *P. grylli*.**

Клетки жирового тела зараженных сверчков стандартно фиксировали в 1% глутаровом альдегиде и 200 нм срезы использовали для ЭМ томографии. Проведенный анализ позволил обнаружить в окруженных цистернами ЭР (зеленый цвет) кластерах тубулярную (коричневый и оранжевый цвет) и варикозную (желтый цвет) части комплекса Гольджи. Все мембранные структуры были соединены в единую непрерывную сеть с помощью тонких тубул. При этом изолированные транспортные структуры отсутствовали в изучаемых структурах.



**А**



**Б**

**Рисунок 25. Электронная томография Гольджи-подобных структур микроспоридии *P. grylli*.**

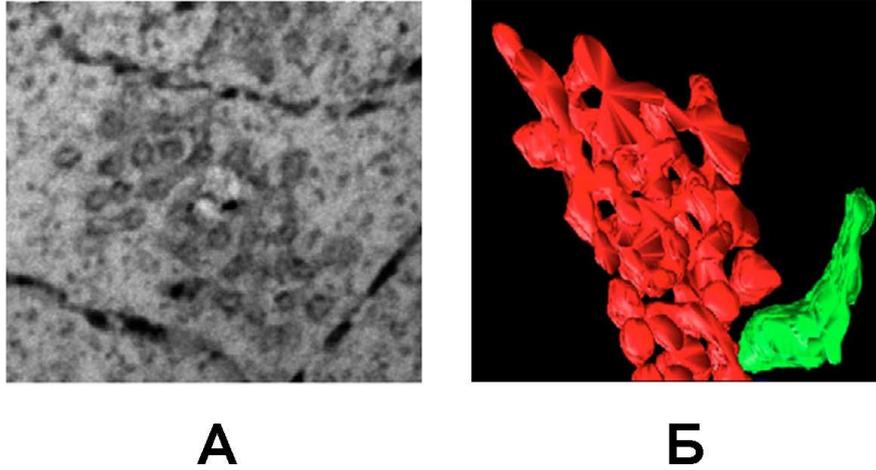
А. Последовательное сопоставление серийных виртуальных срезов отдельных кластеров показало, что все мембранные структуры Гольджи микроспоридий связаны в единую непрерывную сеть.

Б. Анализ трех перпендикулярных проекций для десяти отдельных округлых структур подтвердил, что все они пространственно соединены между собой тонкими тубулами в единую сеть.

подразумевающим обязательное присутствие в клетке COP-зависимых везикул. С целью подтверждения достоверности полученных нами результатов был предпринят ряд дополнительных экспериментов. Было учтено, что в описанных выше экспериментах была использована стандартная химическая фиксация биологического материала (зараженного жирового тела сверчков) в 1% глутаровом альдегиде. Несмотря на то, что химическая фиксация широко используется в электронно-микроскопических исследованиях, этот метод может стать источником артефактов. Теоретически везикулы диаметром 50-60 нм могут сформироваться в клетках микроспоридий, но в ходе фиксации слиться с соседними мембранными структурами. Другая причина, обуславливающая невозможность обнаружить транспортные везикулы в клетках микроспоридий, могла быть связана с их слишком коротким периодом жизни, чтобы быть обнаруженными в наших экспериментах. Поскольку в работе была проанализирована трехмерная структура большого числа тубулярных кластеров *P. grylli*, данные артефакты были маловероятны, но теоретически возможны.

#### **4.1.3. Подтверждение отсутствия изолированных везикул в клетках микроспоридий *P. grylli* с использованием различных методических подходов.**

С целью избежать возможности слияния изолированных транспортных везикул с другими мембранными компартментами микроспоридий в ходе фиксации биологического материала был использован метод ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением (McIntosh, 2001). Электронная микроскопия и анализ трехмерной структуры шести тубулярных кластеров после заморозки под высоким давлением и криозамещения показал отсутствие свободных 50-60 нм везикул в клетках микроспоридий (Рисунок 26). Поскольку данный метод фиксации материала является наиболее современным и фактически не приводит к появлению



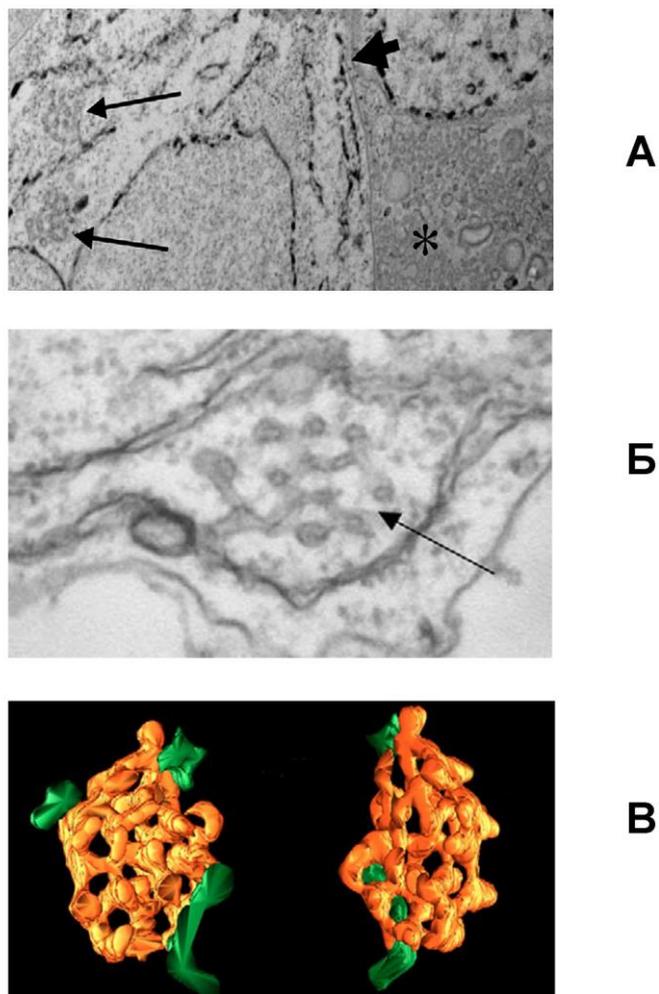
**Рисунок 26. Электронная микроскопия (А) и трехмерная реконструкция тубулярных кластеров (Б) в меронтах *P. grylli* после заморозки зараженной ткани под высоким давлением с последующим криозамещением.**

Использование данного современного метода фиксации биологического материала, позволяющего максимально сохранить нативную структуру мембранных структур, подтвердило отсутствие изолированных везикул в клетках микроспоридий.

артефактов (McIntosh, 2001), полученный результат свидетельствовал о том, что отсутствие транспортных везикул в клетках паразита не является результатом их слияния с другими мембранами при фиксации биологического материала.

Для предотвращения возможности немедленного слияния вновь сформированной COP-зависимой везикулы с компартментом-акцептором, осуществлено ингибирование процессов слияния мембран в клетках паразита и хозяина (Безнусенко и др., 2006, Beznoussenko et al., 2007). Важным компонентом, вовлеченным в процесс слияния мембран, включая слияние COP1-зависимых везикул с компартментами Гольджи, служит белок NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) млекопитающих (Hoyle et al. 1996). У дрожжей гомологичный белок известен как vesicular-fusion protein SEC18. Поскольку последовательности, кодирующие белок NSF, присутствуют в геномах всех изученных видов микроспоридий, использование специфичных ингибиторов активности NSF способно остановить процесс слияния мембран и способствовать накоплению транспортных везикул в клетке паразита. Как следует из названия белка, таким относительно селективным ингибитором NSF является N-этилмалеимид (NEM) - производное малеиновой кислоты, легко проникающее через биологические мембраны (Mironov et al., 2001; Kweon et al., 2004).

Для ингибирования процессов SNARE-зависимого слияния мембран частично разрушенное тефлоновым пестиком жировое тело зараженных *P. grylli* сверчков инкубировали в ФСБ в присутствии 1 М NEM (также растворенном в ФСБ) в течение 10 мин при 4°C, затем 2 минуты с дитиотрейтолом (ДТТ), отмывали и клетки паразита фиксировали для электронно-микроскопического анализа и томографии. Как и ожидалось, в клетках хозяина количество округлых мембранных структур, соответствующих COP1 - везикулам увеличивалось приблизительно в 5 раз при ингибировании слияния везикул N-этилмалеимидом (Рисунок 27, А).



**Рисунок 27. Электронная микроскопия (А-Б) и трехмерная реконструкция тубулярных кластеров (В) в меронтах *P. grylli* после обработки N-этилмалеимидом (NEM).**

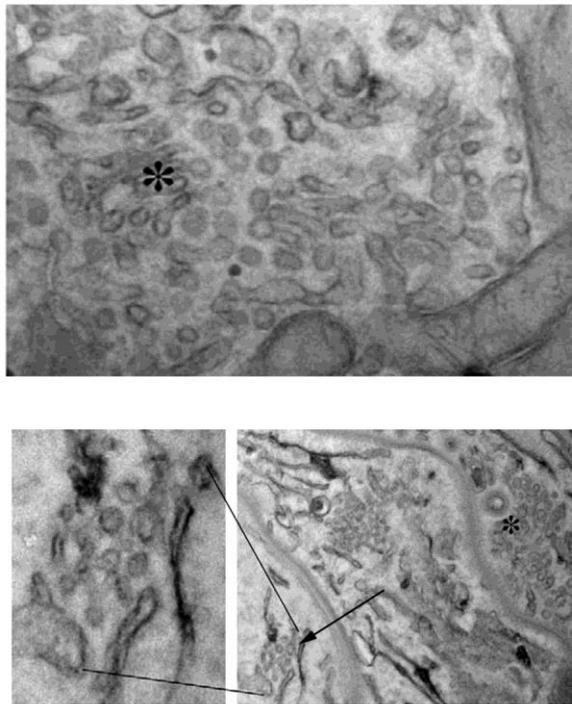
Ингибирование процесса слияния СОР-зависимых везикул с компартментами Гольджи приводило к увеличению округлых мембранных структур приблизительно в 5 раз в цитоплазме клетки хозяина (А, отмечено звездочкой). При этом данная обработка не влияла на структуру тубулярных кластеров (отмечено тонкими стрелками) в клетке микроспоридий и не приводила к появлению в них изолированных везикул.

Толстая стрелка указывает на цитоплазматическую мембрану меронта, отделяющую паразита от цитоплазмы клетки хозяина.

Однако в клетках микроспоридий проведенная обработка не привела к появлению 50-60 нм везикул (Рисунок 27, Б, В).

Другой подход, использованный нами для обнаружения везикул в клетках микроспоридий, связан с ингибированием процессов “раздевания” (снятия белковой оболочки) СОPI-зависимых везикул с помощью тетрафлюорида алюминия ( $AlF_4$ ) (Cole et al., 1996). Как и в предыдущем эксперименте, частично разрушенное тефлоновым пестиком жировое тело зараженных сверчков инкубировали в присутствии  $AlF_4$  (20 мМ NaF; 0.05 мМ  $AlCl_3$ ) в течение 20 мин при 37°C и анализировали с помощью ЭМ. Аналогично результату, полученному в эксперименте с NEM, в цитоплазме клетки хозяина число СОPI-зависимых везикул увеличивалось приблизительно в три раза, тогда как размер цистерн Гольджи уменьшался (Рисунок 28). Это доказывало, что нам действительно удалось блокировать “раздевание” везикул и их последующее слияние с цистернами ЭР. При этом в клетках микроспоридий мы опять не обнаружили появления каких-либо изолированных везикул (Рисунок 28).

Таким образом, использование дополнительных подходов, которые могли бы повысить чувствительность методов обнаружения СОPI-зависимых везикул в клетках микроспоридий, не дало положительного результата. С одной стороны, авезикулярная природа комплекса Гольджи микроспоридий еще раз подчеркнула уникальность функционального аппарата этих внутриклеточных паразитов. С другой стороны, полученные данные представляли значительный интерес для изучения общих механизмов внутриклеточного транспорта. Если бы удалось доказать, что структурные белки, необходимые для формирования споры, действительно транспортируются через Гольджи-подобные тубулярные кластеры микроспоридий, это бы свидетельствовало о принципиальной возможности осуществления внутриклеточного транспорта по непрерывному секреторному пути.



**Рисунок 28. Электронная микроскопия тубулярных кластеров в меронтах *P. grylli* после обработки тетрафлюоридом алюминия ( $AlF_4$ ). Ингибирование процесса “раздевания” СОР-зависимых везикул приводило к увеличению округлых мембранных структур приблизительно в 3 раза в цитоплазме клетки хозяина (отмечено звездочкой), но не влияло на структуру тубулярных кластеров в клетках микроспоридий (отмечено стрелкой).**

На следующем этапе исследования мы показали, что основные структурные белки оболочки споры и полярной трубки микроспоридии *P. grylli* действительно транспортируются к формируемым структурам по непрерывной сети тубул, представляющей собой комплекс Гольджи микроспоридий, и часть из них подвергается гликозилированию.

## **4.2. Участие Гольджи-подобных авезикулярных структур во внутриклеточном транспорте основных белков оболочки споры и полярной трубки микроспоридий.**

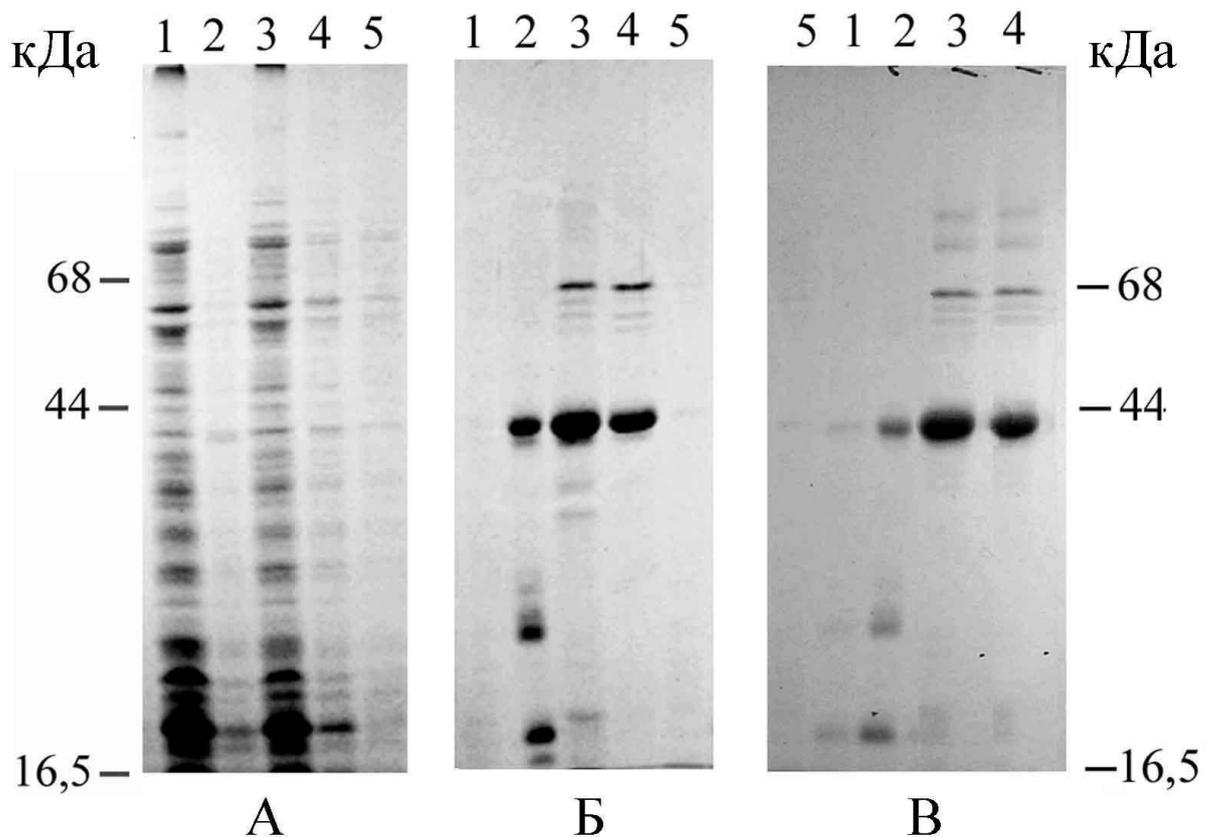
### **4.2.1. Выделение (избирательная солюбилизация) основного белка оболочки спор *P. grylli*.**

Уже в первых экспериментах, выполненных сотрудниками нашей группы, было показано, что кипячение интактных (неразрушенных) спор микроспоридии *P. grylli* в присутствии 2% ДСН и 1% 2-МЭ приводила к солюбилизации значительных количеств белка с молекулярным весом около 40 кДа (p40). На основании этого было высказано предположение, что данный полипептид относится к основным белкам оболочки споры (Seleznev et al., 1995).

В данной работе, при подборе условий солюбилизации и выделения данного белка обнаружено, что на одном из этапов активации процесса экструзии (выброса) полярных трубок спорами *P. grylli* наблюдается высвобождение в среду значительных количеств p40 в растворимом состоянии. В эксперименте была использована несколько модифицированная схема активации, разработанная Kurtti и соавторами для спор микроспоридии *Nosema furnacalis* (Kurtti et al., 1994). Очищенные споры *P. grylli* последовательно инкубировали 30 мин при комнатной температуре в растворе 1 (1 mM Трис, 10 mM ЭДТА), а затем столько же в 12 объемах щелочно-солевого раствора 2, содержащего 10 mM КОН и 170 mM КСl.

Последующий перенос спор в 6 объемов раствора 3 (25 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА, 170 мМ КСl) сопровождался выбросом полярных трубок и выходом спороплазм в окружающую среду. Таким образом, непосредственным стимулом процесса экструзии являлся сдвиг рН при переносе спор из щелочной среды раствора 2 в нейтральную среду раствора 3. При этом инкубация спор в щелочно-солевом растворе 2 сопровождалась высвобождением в среду значительных количеств белка р40 (Dolgikh, Semenov, 2003). Ресуспендирование центрифужного осадка спор *P. grylli* объемом около 100 мкл в растворе 2 приводило к солюбилизации около 200 мкг белка. Анализ солюбилизованного материала с помощью ДСН-ПААГЭ показал присутствие в пробе практически одиночной мажорной белковой полосы размером 40 кДа (Рисунок 29, Б).

Следует отметить, что присутствие обоих компонентов раствора 2 является критичным для солюбилизации р40. После инкубации спор в присутствии только 170 мМ КСl высвобождения в среду каких-либо белков не наблюдалось (не показано). Напротив, инкубация спор в присутствии 10 мМ КОН (без добавления КСl) вызывает высвобождение многих белков спор, но лишь незначительных количеств р40 (Рисунок 29, А). Точное указание объема раствора 2, добавляемого к спорам (12 объемов центрифужного осадка спор) связано с частичной нейтрализацией щелочного рН в ходе инкубации. В случае добавления недостаточного количества щелочи, сдвиг рН до нейтральных значений может вызвать предварительную экструзию спор. Более высокая концентрация щелочи в растворе 2 также вызывает избирательную солюбилизацию р40 (Рисунок 29, В). Однако при концентрации КОН более 50 мМ споры теряют способность к экструзии. Продолжительность хранения спор также оказывала влияние на эффективность солюбилизации белка. При инкубации в растворе 2 свежих спор наблюдалась солюбилизация нескольких дополнительных белковых



**Рисунок 29. Эффективность высвобождения r40 при инкубации спор *P. grylli* в различных условиях.**

А - инкубация в растворе 2 без добавления 170 мМ КСl ; Б - раствор 2, содержащий 10 мМ КОН; В - раствор 2, содержащий 50 мМ КОН.

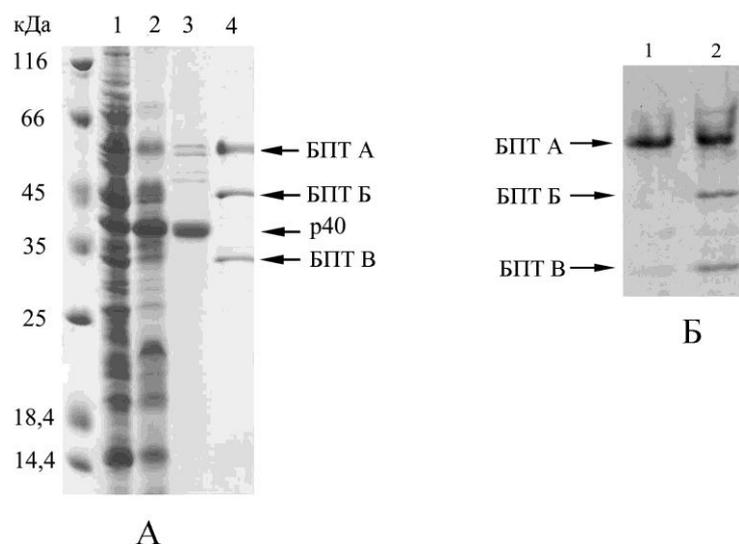
1 - споры, хранившиеся в воде в течение года; 2 - споры хранившиеся в воде в течение 4 месяцев; 3, 4 - свежесыделенные споры; 5 - споры, хранившиеся 18 месяцев в присутствии 0,02% азидата натрия. Во всех случаях споры хранили при 4°C.

полос с молекулярным весом 55-65 кДа (Рисунок 29, Б, В, дорожки 3, 4). Однако именно в этом случае наблюдался максимальный выход белка. Хранение спор в воде при 4°C в течение нескольких месяцев приводило к значительному снижению содержания р40 в солубилизованном материале (Рисунок 29, Б, В, дорожка 2). Присутствие в этих пробах белковых полос размером менее 40 кДа свидетельствует о возможности гидролиза белка р40 в ходе хранения. Длительное хранение спор (более года) приводило к исчезновению р40 в спорах, как в отсутствие (Рисунок 29, Б, В, дорожка 1), так и в присутствии антимикробного агента азид натрия (Рисунок 29, Б, В, дорожка 5). В результате проведенных экспериментов мы пришли к выводу, что использование зрелых спор *P. grylli* после хранения 1-2 недели при 4°C оптимально для выделения основного белка оболочки.

#### **4.2.2. Выделение трех белков полярной трубки *P. grylli*.**

В 1976 году американским исследователем Е. Вайднером (Weidner 1976b) было установлено, что полярные трубки микроспоридий после экструзии остаются устойчивыми к диссоциации в присутствии ДСН, мочевины, Тритона X-100, перекиси водорода, но растворяются под действием SH-содержащих соединений 2-МЭ и ДТТ. Этот результат предполагал важную роль S-S связей, образуемых остатками цистеина в поддержании структуры полярных трубок, а также позволял использовать 2-МЭ и ДТТ при выделении белков полярной трубки (БПТ).

Для избирательной солубилизации БПТ использованы споры после экструзии полярных трубок, вызванной их последовательной инкубацией в растворах 1-3. Отмывка спор 3% ДСН и последующая инкубация в присутствии высокой концентрации 2-МЭ (50-75%) приводила к диссоциации полярных трубок и избирательной экстракции трех белков с молекулярной массой 56 кДа (БПТ А), 46 кДа (БПТ Б) и 34 кДа (БПТ В) (Рисунок 30, А, дорожка 4) (Dolgikh, Semenov, 2003; Dolgikh et al., 2005).



**Рисунок 30. Анализ с помощью ДСН-ПААГЭ белков, избирательно экстрагируемых из спор *P. grylli*.**

А. Механическое разрушение спор в фосфатно-солевом буферном растворе с последующим кипячением гомогената в буфере для ДСН-ПААГЭ, содержащем 2% ДСН и 1% 2-МЭ, приводит к солюбилизации множества белков (дорожка 1). Кипячение в том же растворе интактных (не разрушенных) спор приводит к солюбилизации значительно меньшего числа белков, являющихся компонентами оболочки споры (дорожка 2, р40 указан стрелкой). Инкубация интактных спор в щелочно-солевом растворе (10 мМ КОН, 170 мМ КСl) приводит к избирательной солюбилизации основного белка оболочки р40 (дорожка 3, указан стрелкой). Отмывка спор после экструзии в 3% ДСН и последующая диссоциация выброшенных полярных трубок в присутствии 50% 2-МЕ и 3% ДСН приводит к избирательной солюбилизации трех белков полярной трубки размером около 56, 46 и 34 кДа (дорожка 4, отмечены стрелками).

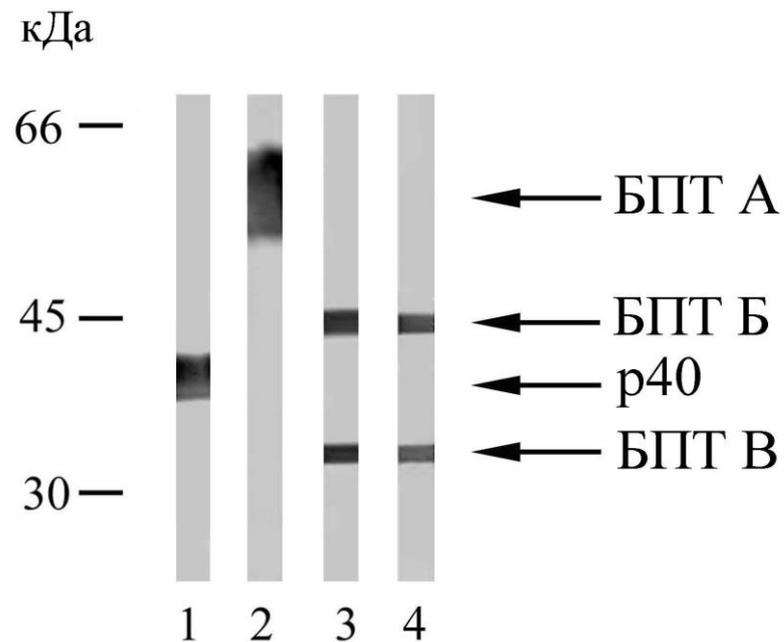
Б. Присутствие ДСН в растворе является критичным для солюбилизации БПТ Б и БПТ В, но не БПТ А. Для определения концентрации ДСН, необходимой для эффективной солюбилизации двух белков, споры с выброшенными полярными трубками инкубировали в 3% ДСН, отмывали в воде и белки экстрагировали 75% 2-МЭ в присутствии 0.5% (дорожка 1) и 1% (дорожка 2) ДСН.

Следует отметить, что присутствие ДСН критично для солюбилизации БПТ Б и БПТ В, но не БПТ А. Отмывка спор от ДСН в воде или 8 М мочеvine перед инкубацией в присутствии 50-75% 2-МЭ приводит к избирательной солюбилизации БПТ А, но не БПТ Б или БПТ В (Dolgikh, Semenov, 2003). В ходе исследования нам удалось определить, что для эффективной солюбилизации БПТ Б и БПТ В минимальная концентрация ДСН в солюбилизирующем растворе должна быть между 0.5% и 1.0% (Рисунок 30, Б) (Dolgikh et al., 2005).

#### **4.2.3. Получение поликлональных антител к белкам оболочки споры и полярной трубки *P. grylli* и анализ их специфичности.**

Солюбилизованные структурные белки спор были использованы для иммунизации кроликов и получения специфичных поликлональных антител. Солюбилизованный белок оболочки р40 после удаления дебриса центрифугированием нейтрализовали добавлением 1/20 объема 1М Трис-С1 буфера (рН 8.0), а смесь трех экстрагированных БПТ тщательно диализовали против буфера 50 мМ глицин-NaOH (рН 9.0). Иммунизация кроликов с использованием 2 мг белка осуществлена в ходе пяти внутривенных инъекций с трехдневным интервалом. Для очистки антител к основному белку оболочки спор экстрагированный белок разделяли в 12 % ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и полосу, соответствующую р40, использовали для выделения антител из иммунной сыворотки, полученной после иммунизации кроликов тем же белком. В случае выделения антител к БПТ, экстрагированные белки также разделяли в 12% ПААГ, переносили на нитроцеллюлозу и одну и ту же иммунную сыворотку использовали для получения антител к соответствующим белковым полосам.

Иммуноблоттинг общих белков спор микроспоридий с очищенными антителами показал, что нам удалось получить антитела, специфично распознающие изучаемые белки (Рисунок 31). Антитела к белку оболочки



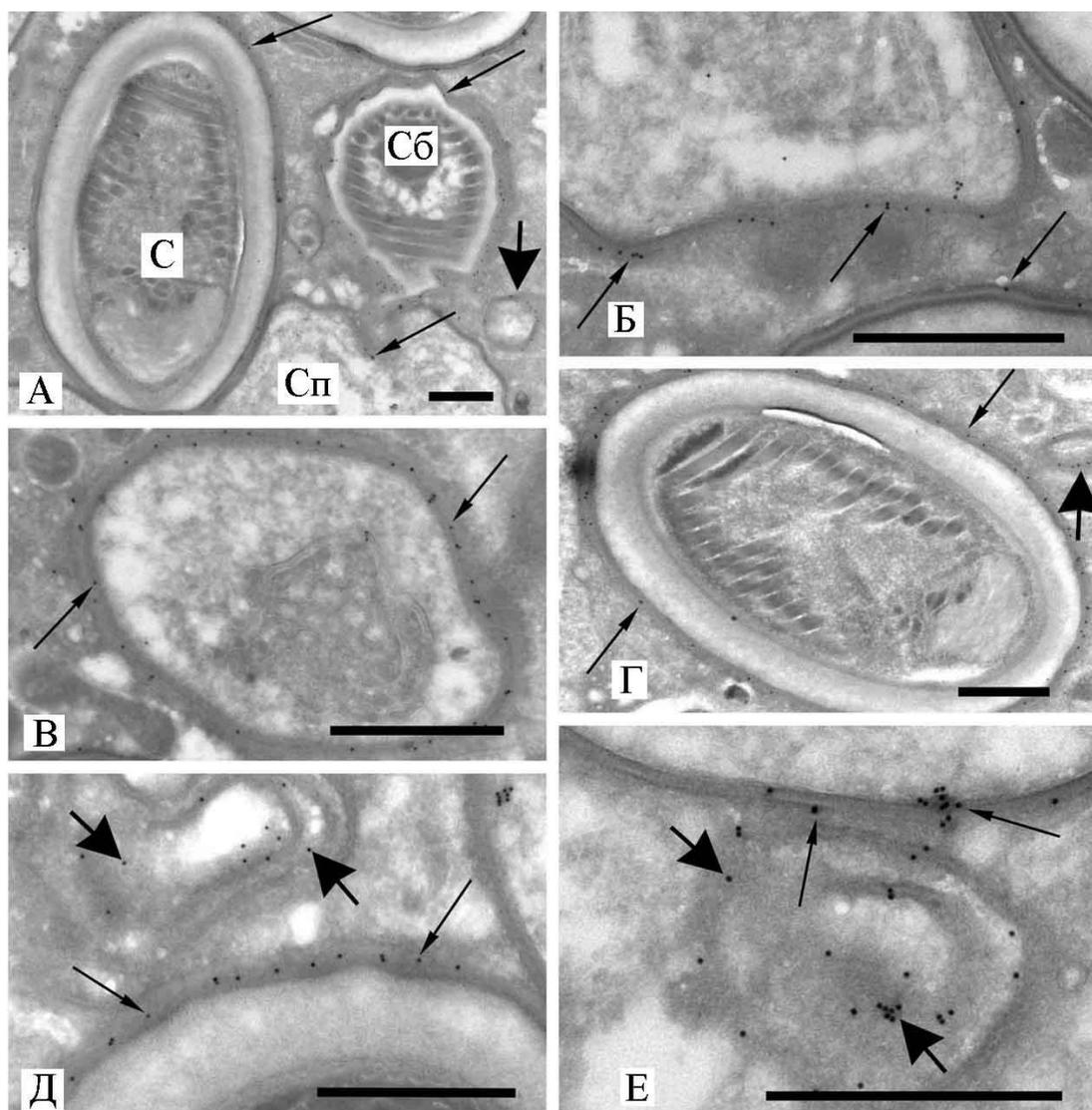
**Рисунок 31. Анализ специфичности антител к структурным белкам оболочки споры и полярной трубки с помощью иммуноблоттинга.**

Механически разрушенные споры *P. grylli* кипятили в присутствии раствора, используемого при приготовлении проб для ДСН-ПААГЭ и экстрагированные белки анализировали с помощью иммуноблоттинга.

1 - антитела против р40 (40 кДа), 2 - антитела против БПТ А (56 кДа), 3 - антитела против БПТ Б (46 кДа), 4 - антитела против БПТ В (34 кДа).

споры р40, как и антитела к БПТ А специфично распознавали в пробах одиночные полосы соответствующего молекулярного веса (40 и 56 кДа соответственно). Напротив, антитела специфичные к двум другим белкам полярной трубки одинаково распознавали среди белков спор две полосы, полностью соответствующие по своему размеру молекулярной массе БПТ Б и БПТ В (46 и 34 кДа соответственно). Полученный результат показал перекрестную реакцию при использовании полученных антител и наличие общих антигенов (аминокислотных последовательностей) в составе молекул БПТ Б и БПТ В (Dolgikh et al., 2005).

Для анализа специфичности полученных антител с помощью иммуноэлектронной микроскопии (ИЭМ) были изготовлены криосрезы зараженных жировых тел двупятнистых сверчков в клетках которых присутствовали все стадии внутриклеточного развития микроспоридии *P. grylli*. Проведенный анализ показал, что окруженные лишь клеточной мембраной меронты не распознаются антителами к основному белку оболочки спор р40. В споронтах с началом спорогонии гранулы коллоидного золота обнаруживаются на формирующейся экзоспоре - электронноплотном внешнем слое оболочки (Рисунок 32, А, Б). Интенсивность мечения экзоспоры антителами против р40 увеличивалась в ходе спорогонии и была максимальной в споробластах (Рисунок 32, А, В) и спорах (Рисунок 32, Г, Д). При этом превращение споробласта в спору характеризуется началом формирования эндоспоры - электроннопрозрачного внутреннего слоя оболочки. Несмотря на появление эндоспоры, на криосрезах спор антитела специфично распознавали лишь внешний, электронноплотный слой оболочки, что свидетельствует о том, что р40 является основным белком именно экзоспоры *P. grylli*. Эндоспора, полярная трубка или какие-либо другие структуры спор не распознавались антителами к р40. Интересно отметить, что данные антитела специфично метили своеобразные структуры в цитоплазме зараженных клеток хозяина. На



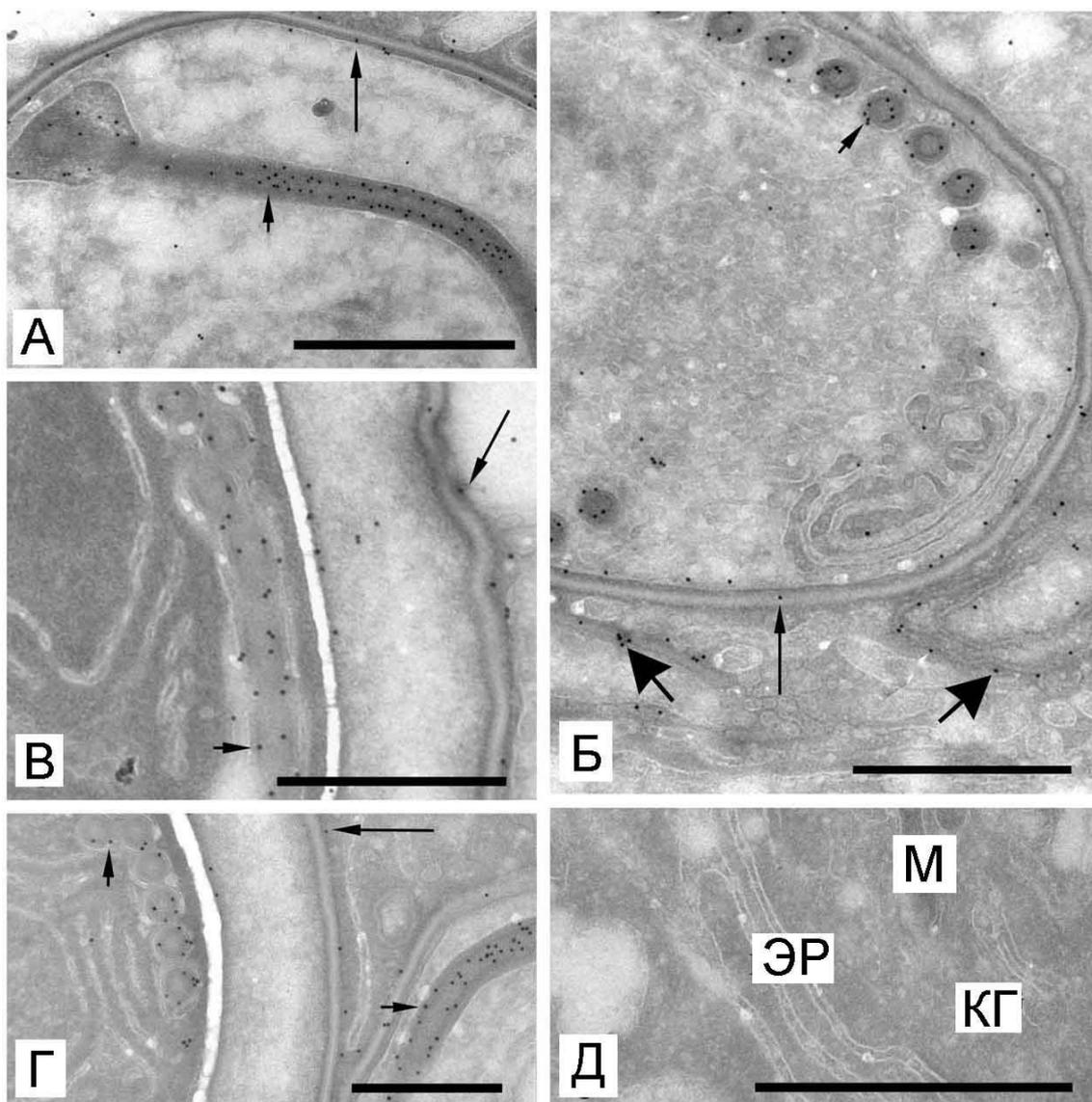
**Рисунок 32. Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против основного белка оболочки спор р40.**

Антитела к р40 распознают формирующуюся экзоспору споронтов (А, Б), споробластов (А, В), спор (Г, Д) и ассоциированные с паразитом концентрические структуры в цитоплазме хозяина (Д, Е). При этом оболочка споры (А, Г) и эндоспора (А, Г, Д) не окрашивались антителами к р40. Тонкие стрелки указывают на иммуномечение оболочки клеток и спор; толстые стрелки указывают на мечение концентрических структур в цитоплазме зараженной клетки.

Sp - споронт, Cб - споробласт, С - спора. Масштаб линейки 0.5 мкм.

криосрезам эти структуры представляли собой электронноплотные концентрические круги, тесно ассоциированные со стадиями спорогонии и спорами микроспоридий (Рисунок 32, Д, Е). Уровень мечения (концентрация гранул коллоидного золота на единицу площади) был сходным на экзоспоре и на концентрических структурах в цитоплазме хозяина. Наиболее вероятной причиной формирования описанных структур в цитоплазме зараженной клетки, на наш взгляд, является их высвобождение в ходе уменьшения поверхности оболочки паразита при спорогенезе. Морфометрия различных стадий жизненного цикла *P. grylli* показала, что диаметр меронтов составляет  $4.4 \pm 0.2$  мкм (Sokolova et al., 2003). Размер споронтов и споробластов равен  $4.7 \pm 0.2 \times 3.6 \pm 0.2$  и  $5.7 \pm 0.1 \times 2.1 \pm 0.1$  мкм соответственно. Формирование споры микроспоридий сопровождается резким уменьшением площади поверхности до размера  $3.3 \pm 0.1 \times 1.4 \pm 0.1$  мкм. Это поднимает вопрос о судьбе излишков материала оболочки (экзоспоры), которые необходимо элиминировать. Присутствие концентрических структур в цитоплазме клетки хозяина позволяет предположить возможность выделения избыточного материала экзоспоры в зараженную клетку. Далее, компоненты оболочки споры должны либо накапливаться в зараженной цитоплазме либо подвергаться деградации с помощью ферментов хозяина.

В случае инкубации криосрезом зараженного жирового тела с антителами к БПТ А наблюдалось интенсивное мечение полярной трубки (Рисунок 33, А-Г). Полученные данные окончательно подтвердили, что БПТ А размером около 56 кДа действительно представляет собой основной компонент полярной трубки микроспоридии *P. grylli*. Наряду с интенсивным мечением полярной трубки антитела к этому белку достоверно распознавали формирующуюся оболочку споробласта (Рисунок 33, А, Б, Г). На срезах спор они достоверно окрашивали экзоспору и внутренний (контактирующий с



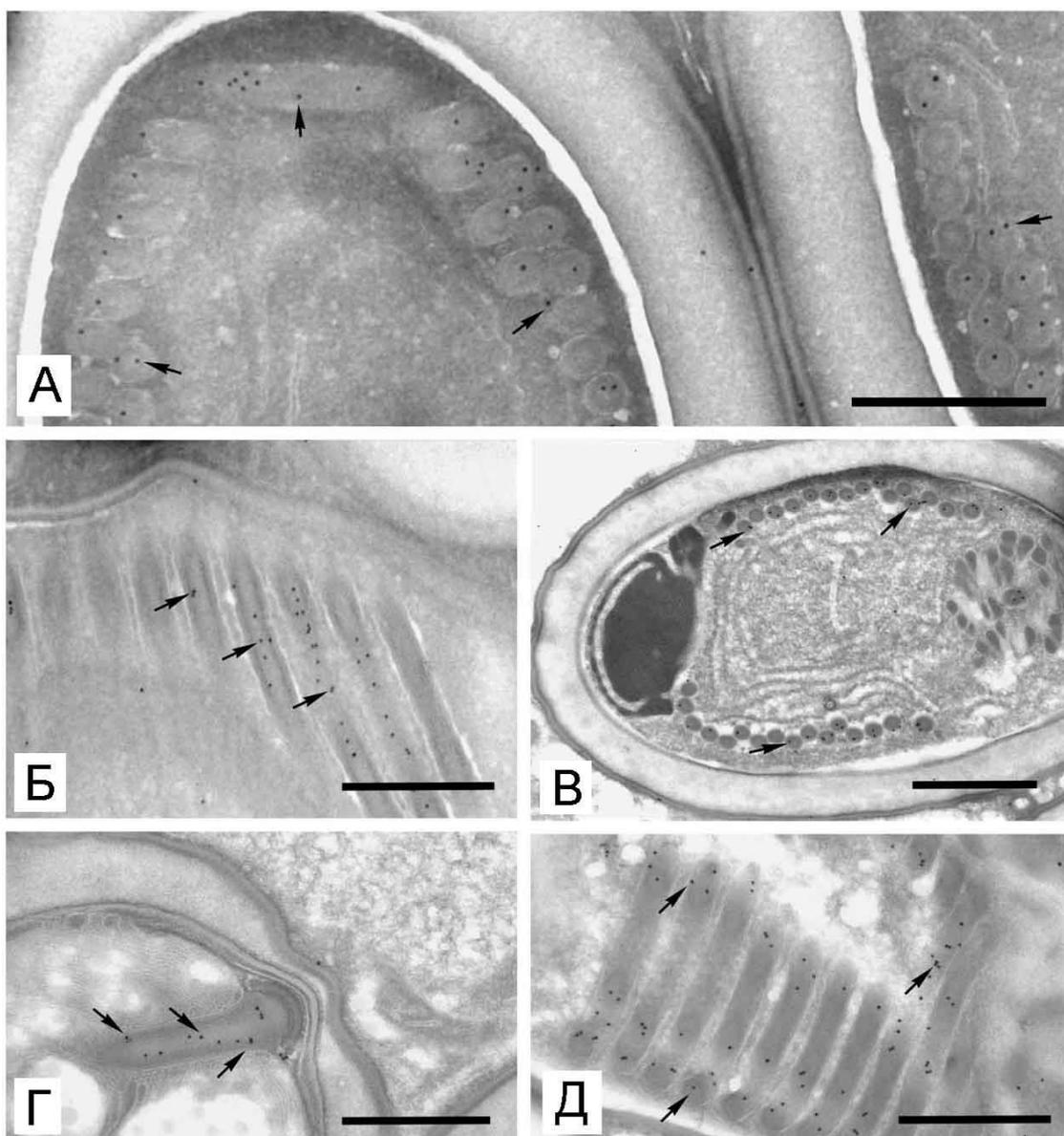
**Рисунок 33. Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против БПТ А.**

А-Г. Антитела специфично распознавали полярный филамент (короткие тонкие стрелки), оболочку спор и споробластов (длинные, тонкие стрелки), ассоциированные с клеткой паразита концентрические структуры в цитоплазме хозяина (толстые стрелки). Д. Отсутствие специфического мечения структур клетки хозяина за пределами зараженной зоны. М - митохондрии, КГ - комплекс Гольджи, ЭР - цистерны эндоплазматического ретикулома. Масштаб линейки 0.5 мкм.

цитоплазматической мембраной) слой эндоспоры (Рисунок 33, Б, В, Г). Описанные в цитоплазме хозяина концентрические структуры, содержащие компоненты экзоспоры (p40) также распознавались антителами к БПТ А (Рисунок 33, Б). Несмотря на то, что мечение структур оболочки споры выглядело специфичным, оно не было таким интенсивным как мечение полярной трубки. Наиболее вероятным объяснением перекрестного мечения различных структур антителами против БПТ А следует признать сходный характер гликозилирования компонентов полярной трубки и оболочки споры. Далее мы увидим, что БПТ А является наиболее интенсивно гликозилированным белком *P. grylli*.

Как и ожидалось, перекрестно реагирующие антитела против БПТ Б и БПТ В показали сходную картину иммуномечения на криосрезах зараженного жирового тела (Рисунок 34). В обоих случаях наблюдалось специфичное распознавание полярной трубки в споробластах и спорах *P. grylli*. Полученный результат полностью подтвердил, что оба белка, экстрагированных в присутствии 2-МЭ и ДСН, действительно представляют собой структурные компоненты полярной трубки.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов нам действительно удалось экстрагировать основные белковые компоненты оболочки споры (экзоспоры) и полярной трубки микроспоридии *P. grylli*. Интересным результатом работы оказалось обнаружение того, что активация процесса экструзии полярных трубок спор *P. grylli* в щелочно-солевом растворе сопровождалась высвобождением в среду значительных количеств основного белка экзоспоры. С одной стороны, это дало возможность успешно использовать очень простую схему выделения p40. С другой, данный результат позволял предположить, что удаление основного компонента экзоспоры приводит к увеличению проницаемости оболочки и поступлению воды внутрь споры, что и приводит к экструзии. Иными словами, предполагаемой функцией p40 могло быть предотвращение



**Рисунок 34. Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против БПТ Б и ВПТ В.**

А, Б. Специфичное мечение полярного филамента спор (А) и споробласта (Б) антителами против БПТ Б. В-Д. Специфичное мечение полярного филамента спор (В, Г) и споробласта (Д) антителами против БПТ В. Стрелки указывают мечение полярной трубки. Масштаб линейки 0.5 мкм.

преждевременного выброса полярных трубок. Возможно, высвобождение компонентов экзоспоры в среду относится к универсальным механизмам активации спор микроспоридий. Например, солюбилизация поверхностных антигенов наблюдалась при щелочной обработке спор микроспоридии *N. bombycis* (Kawarabata, Hayasaka 1987). При этом авторы отмечают, что оптимальные условия активации экстрезии полярных трубок *N. bombycis* и солюбилизации белков оболочки совпадают.

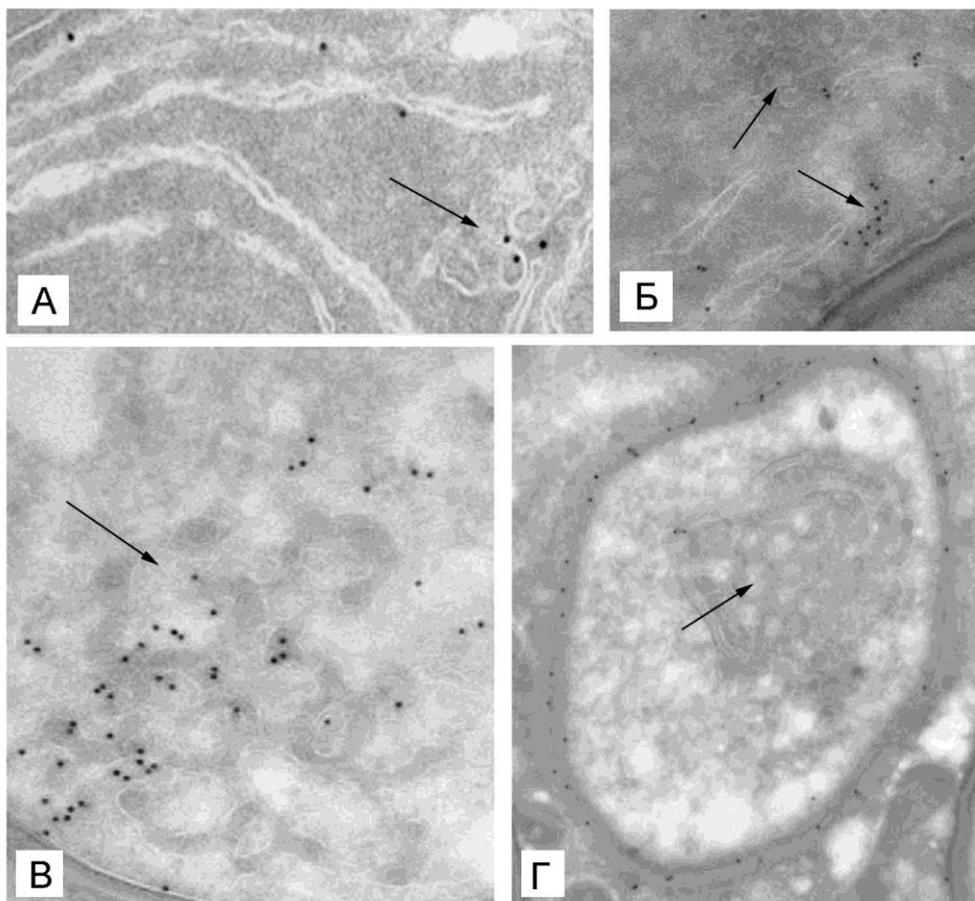
Накапливающиеся данные об аминокислотных последовательностях, кодирующих компоненты оболочки споры микроспоридий, показали высокую гетерогенность белков этой группы (Bohne et al. 2000; Hayman et al. 2001; Peuvel-Fanget et al., 2006; Xu et al., 2006; Wu et al., 2008; Wu et al., 2009). На данном этапе мы пока не можем выделить какие-либо семейства гомологичных белков у разных видов микроспоридий и отнести к одной из них р40 *P. grylli*, тем более что его аминокислотная последовательность до сих пор не установлена. Напротив, относительно белков полярной трубки *P. grylli* можно достоверно говорить о принадлежности к одному из трех семейств РТР 1 - РТР 3, обнаруженных в геномах различных видов микроспоридий (Delbac et al., 1998, 2001; Peuvel et al., 2002, Polonais et al., 2005). В частности, установлено, что выявленный нами в спорах *P. grylli* БПТ А принадлежит к семейству РТР 1, поскольку распознается антителами против гомологичного белка *P. locustae* (Polonais et al., 2005). Напротив, БПТ Б и В принадлежат к семейству РТР 2 поскольку БПТ В специфично распознавался антителами к РТР 2 *P. locustae* (Polonais et al., 2005). Несмотря на то, что БПТ Б *P. grylli* в экспериментах французских коллег не распознавался антителами к РТР 2, это могло быть связано с низким содержанием SH-содержащего реагента дитиотрейтола (100 мМ или около 1.5%) в растворе, использованном для солюбилизации полярных трубок. Совсем недавно появились дополнительные данные подтверждающие, что

семейство РТР 2 действительно может быть мультигенным в пределах генома одного вида микроспоридий, поскольку в спорах *P. locustae* обнаружен еще один его представитель РТР 2b (Polonais et al., 2013).

#### **4.2.4. Внутриклеточный транспорт структурных белков полярной трубки и оболочки спор *P. grylli* с участием тубулярных кластеров.**

Как уже отмечалось, тубулярная мембранная сеть в клетках микроспоридий значительно увеличивается при переходе к спорогонии и достигает максимального размера на стадии споробласта, приступающего к формированию полярной трубки. Этот факт косвенно указал нам на важную роль тубулярных структур в процессах формирования оболочки споры и полярной трубки паразита. Однако экспериментальные данные, подтверждающие это и окончательно проясняющие функциональную роль Гольджи-подобных кластеров в физиологии микроспоридий, отсутствовали на момент начала исследований. Таким образом, на следующем этапе было необходимо доказать, что белки полярной трубки и оболочки споры паразитов действительно транспортируются из цистерн ЭР к формируемым структурам споры по обнаруженной у микроспоридий непрерывной тубулярной сети. Для этого проведен анализ особенностей мечения этих структур на криосрезах клеток микроспоридии *P. grylli* с помощью полученных ранее антител против р40 и трех белков полярной трубки.

Иммунолокализация р40 на криосрезах показала, что в меронтах белок одновременно присутствует в цистернах ЭР и тубулярных кластерах приблизительно в равном соотношении (Рисунок 35, А, Б). В споронтах начало формирования оболочки споры сопровождалось увеличением концентрации р40 в Гольджи-подобных структурах (Рисунок 35, В). Как показал количественный подсчет, на этой стадии внутриклеточного развития паразитов плотность мечения тубулярных кластеров антителами против р40 приблизительно в 3.5 раза выше, чем плотность мечения ЭР. На поздних

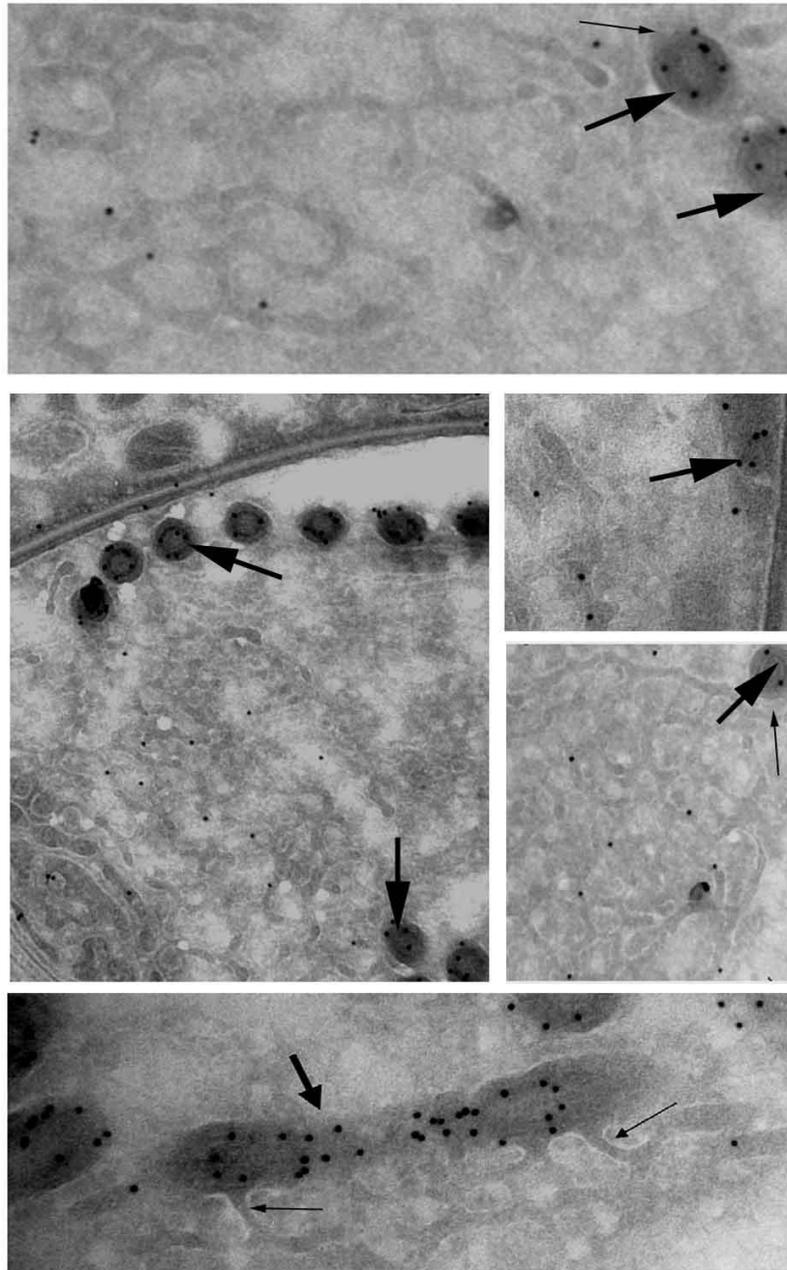


**Рисунок 35. Иммуноэлектронная микроскопия подтвердила активное участие Гольджи-подобных тубулярных структур *P. grylli* во внутриклеточном транспорте основного белка оболочки споры.**

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против р40 показало появление белка в цистернах ЭР и тубулярных кластерах паразита уже на стадии мерогонии (А, Б). Наиболее высокая концентрация р40 в Гольджи-подобных структурах микроспоридий наблюдалась в споронтах при формировании экзоспоры - внешнего слоя оболочки (В). На поздних стадиях спорогонии наибольшая плотность мечения наблюдалась в фактически сформированном внешнем слое оболочки споры (Г).

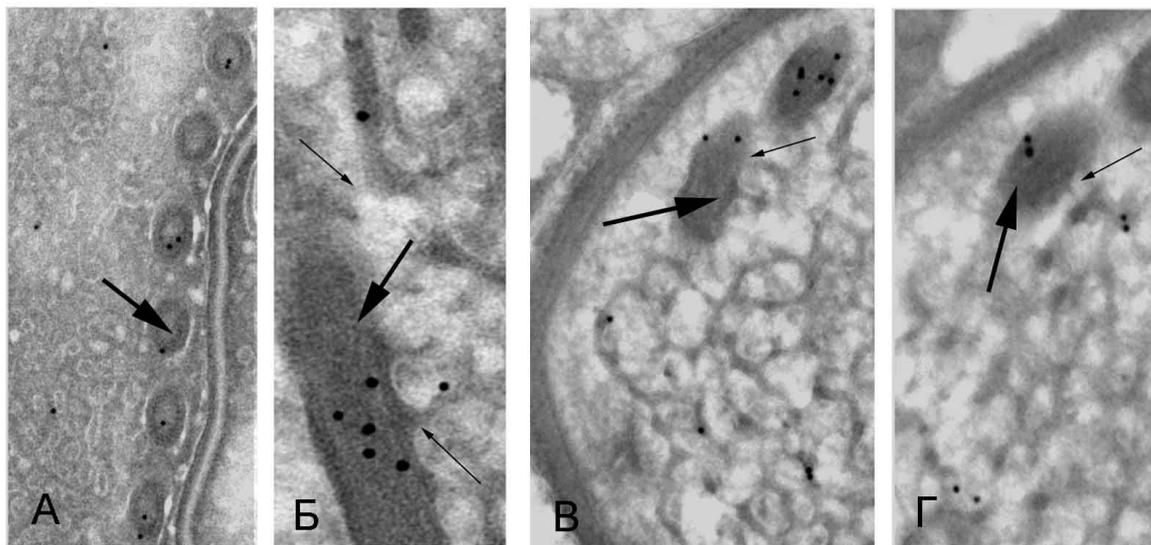
стадиях спорогонии наибольшая плотность мечения наблюдалась в фактически сформированном внешнем слое оболочки споры (экзоспоры) (Рисунок 35, Г). Интересно отметить слабое мечение структур комплекса Гольджи в споробластах микроспоридий, что может быть связано с завершением процессов формирования экзоспоры.

В отличие от белка оболочки споры, компоненты полярной трубки микроспоридий фактически не накапливались в клетках паразитов на стадии мерогонии и ранней спорогонии. Соответствующие антитела практически не окрашивали какие-либо структуры в меронтах и споронтах *P. grylli* (не показано). В споробластах процесс формирования полярной трубки сопровождался концентрированием БПТ А (Рисунок 36), БПТ Б (Рисунок 37, А) и БПТ В (Рисунок 37, Б-Г) в хорошо развитых тубулярных кластерах, пространственно связанных с формирующимся полярным филаментом. Это позволило сделать вывод об участии данных мембранных структур во внутриклеточном транспорте структурных белков полярной трубки. Как и ожидалось, наибольшая плотность мечения наблюдалась на срезах уже сформированного полярного филамента, что соответствует процессу накопления доставляемых белков в этих структурах. Таким образом, в ходе выполненных исследований нам удалось показать, что тубулярные структуры в клетках микроспоридий действительно осуществляют транспорт поступающих в ЭР секретлируемых белков к плазматической мембране паразита и формирующейся полярной трубке. Установлено, что эти структуры выполняют в клетках паразита функцию, свойственную комплексу Гольджи. Для окончательного доказательства того, что авезикулярные мембранные кластеры представляют собой комплекс Гольджи паразитов оставалось показать, что транспортируемые через них белки подвергаются гликозилированию под действием Гольджи-специфичных ферментов, как это имеет место в ходе секреции белков в клетках других организмов.



**Рисунок 36. Иммуноэлектронная микроскопия подтвердила активное участие Гольджи-подобных структур во внутриклеточном транспорте основного белка полярной трубки *P. grylli*.**

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против БПТ А показало, что процесс формирования полярной трубки в споробластах сопровождается концентрированием белка в хорошо развитых тубулярных кластерах, а также его последующим накоплением в формирующемся полярном филаменте (указан стрелками).



**Рисунок 37. Иммуноэлектронная микроскопия подтвердила активное участие Гольджи-подобных структур во внутриклеточном транспорте двух гомологичных белков полярной трубки *P. grylli*.**

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела сверчков с помощью антител против БПТ Б (А) и БПТ В (Б-Г) показало, что процесс формирования полярной трубки в споробластах сопровождается транспортом белков через тубулярную сеть и их последующим накоплением в формирующемся полярном филаменте (указан стрелками).

### **4.3. Особенности гликозилирования белков микроспоридии *P. grylli*, транспортируемых через комплекс Гольджи.**

#### **4.3.1. Состояние изученности особенностей гликозилирования белков микроспоридий к началу исследования.**

Поскольку мы показали, что основной белок оболочки споры микроспоридий и белки полярной трубки действительно транспортируются к формируемым структурам споры, проходя через тубулярную сеть комплекса Гольджи, на следующем этапе исследования было необходимо доказать, что они претерпевают при этом специфичные посттрансляционные модификации и, в частности, гликозилирование. При этом анализ особенностей гликозилирования белков микроспоридий представлялся весьма непростой задачей, поскольку основные ферменты, участвующие в этом процессе не были обнаружены в первом расшифрованном геноме микроспоридии *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001). Одной из интересных особенностей физиологии *E. cuniculi* оказалось полное отсутствие генов, участвующих в N-гликозилировании мембранных и секретируемых белков. Данный процесс начинается в ЭР с присоединения олигосахаридного предшественника к остатку аспарагина белковой молекулы. Начальные этапы N-гликозилирования белков идентичны у всех эукариотических организмов от дрожжей до человека включительно, но микроспоридии оказались неожиданным исключением. Анализ списка белок-кодирующих последовательностей *E. cuniculi* также показал, что помимо потери всех ферментов, участвующих в N-гликозилировании, микроспоридии сохранили способность к O-маннозилированию белков по типу, сходному с таковым у дрожжей (Lussier et al., 1997). В геноме *E. cuniculi* обнаружены гены ферментов, участвующих в этом процессе, за исключением бета-1,3-маннозилтрансферазы - фермента, обеспечивающего присоединение терминальных остатков маннозы.

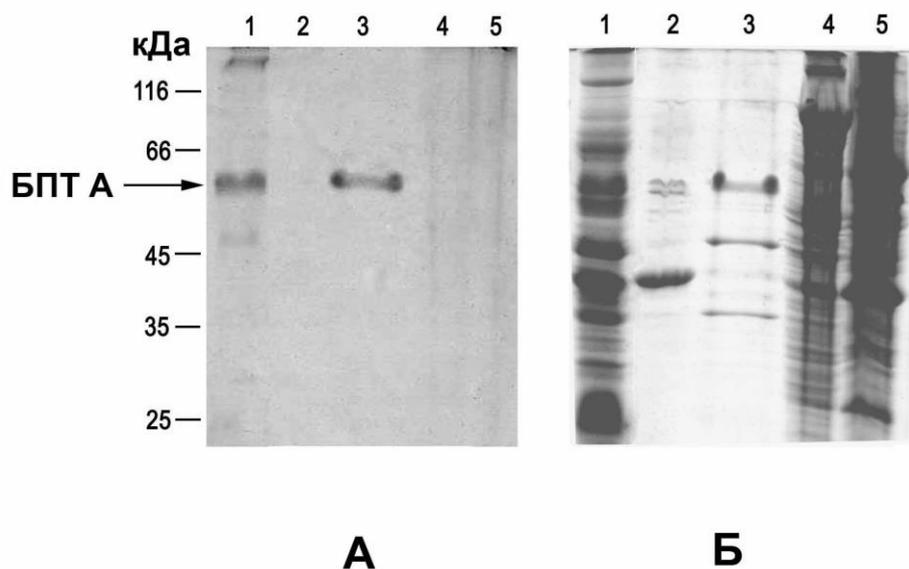
Данные об особенностях гликозилирования белков у других видов микроспоридий, накопленные к моменту расшифровке генома *E. cuniculi*, оказались немногочисленными. Кроме того, эти биохимические данные часто противоречили результатам геномного анализа. Например, было показано, что лектины ConA и WGA взаимодействуют с поверхностью спор микроспоридии *Glugea plecoglossi*, а также с мажорным белком с молекулярной массой 55 кДа и несколькими минорными полипептидами (Kim et al., 1999). Эти же лектины специфично распознавали два структурных белка оболочки споры микроспоридии *Encephalitozoon intestinalis* (Hayman et al., 2001). Однако лектин WGA распознает остатки и олигомеры N-ацетилглюкозамина и, следовательно, специфичен для N-гликозилированных белков. Гликозилирование основного белка полярной трубки РТР1 микроспоридии *E. cuniculi* оказалось еще одним примером таких противоречий. Данный белок распознавался лектином ConA, специфичным к терминальным бета-маннозным и бета-глюкозным остаткам (Xu et al., 2004). Поскольку микроспоридии сохранили лишь ферменты, обеспечивающие O-маннозилирование белков, следовало ожидать, что РТР1 будет распознаваться лектином GNA, специфичным к терминальным бета-маннозным остаткам. Однако в случае микроспоридии *E. hellem* этого не наблюдалось (Xu et al., 2004).

Все это свидетельствовало о необходимости дальнейшего изучения особенностей гликозилирования белков микроспоридий с применением новых биохимических методов, а также о необходимости расширения круга исследуемых видов. Для изучения особенностей гликозилирования белков микроспоридии *P. grylli* мы использовали в своей работе подходы, связанные с обработкой белков специфичными гликозидазами и лектинами, а также специфичную окраску гликопротеинов в геле с помощью периодата и реагента Шиффа.

#### 4.3.2. Общая оценка степени гликозилирования белков спор *P. grylli*.

На первом этапе исследования белки спор *P. grylli* и жирового тела хозяина (двупятнистых сверчков) были разделены методом ДСН-ПААГЭ с последующей окраской общих гликопротеинов в геле с помощью периодата и реагента Шиффа (Рисунок 38). Чувствительность данного метода довольно низка и позволяет обнаружить лишь высокогликозилированные белки и протеогликаны (Jay et al., 1990). В нашем эксперименте это подтвердилось отсутствием ярко окрашенных полос при анализе проб жирового тела сверчков. Несмотря на наличие у насекомых классического аппарата Гольджи и интенсивный синтез в их жировом теле таких гликопротеинов, как вителлогенины (Кемра-Томм et al., 1990), анализ данных проб показал лишь присутствие множества слабоокрашенных полос (Рисунок 38, дорожки 4, 5). Среди белков спор микроспоридий общее количество окрашенных полос оказалось меньше, однако отдельные полосы демонстрировали более яркую окраску, что свидетельствует о высокой степени их гликозилирования. Среди всех белков микроспоридий и клетки хозяина наиболее гликозилированным оказался основной белок полярной трубки паразита БПТА с молекулярной массой около 56 кДа (Рисунок 38, дорожка 1). Высокая степень гликозилирования данного белка сохранялась и после солюбилизации экструзированных полярных трубок в присутствии 50% 2-МЭ (Рисунок 38, дорожка 3). Интересно отметить, что в случае основного белка оболочки споры с мол. массой около 40 кДа (p40) положительная реакция отсутствовала (Рисунок 38, дорожка 2).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что некоторые белки спор относятся к высокогликозилированным. Вероятно, это структурные компоненты споры, и присутствие в их составе значительного количества углеводных компонентов необходимо для выполнения специфичных функций. В то же время, основная часть белков спор или не гликозилирована, или содержит небольшое число углеводных остатков.



**Рисунок 38. Выявление гликопротеинов в спорах микроспоридии *Paranosema grylli*.**

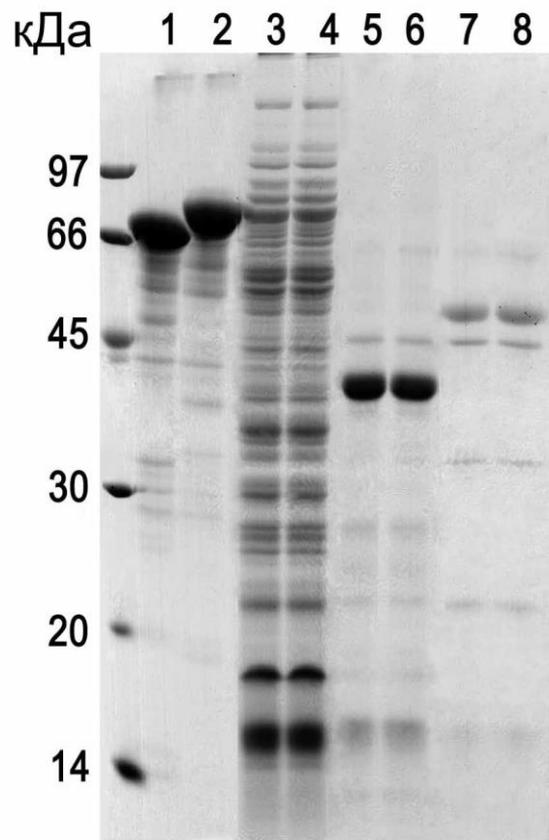
Белки разделяли методом ДСН-ПАГЭ с последующим окрашиванием в присутствии периодата и реагента Шиффа для обнаружения углеводов (А) или Кумасси R-250 для выявления белков (Б). Дорожки: 1 - общий экстракт белков спор *P. grylli* (разрушенные споры кипятили 10 мин в присутствии 0.1 М Трис-Сl (рН 8.0), 2 % ДСН и 5 % 2-МЭ); 2 -основной белок оболочки р40, экстрагированный в ходе инкубации интактных спор в 10 мМ КОН и 170 мМ КСl; 3 - споры после стимуляции выброса полярных трубок были отмыты 3%-ным ДСН, белки полярной трубки экстрагированы в присутствии 50 % 2-МЭ; 4, 5 - соответственно растворимая и мембранная фракции жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus*. БПТ А - основной белок полярной трубки (56 кДа).

Поскольку низкая чувствительность данного метода не позволяет выявить слабо гликозилированные белки, на следующем этапе исследования были использованы более чувствительные методы обработки белков специфичными гликозидазами и связывания с лектинами.

#### **4.3.3. Отсутствие N-гликозилированных белков в спорах *P. grylli*.**

Для обнаружения в спорах микроспоридии *P. grylli* гликопротеинов с N-связанными углеводными цепями использован метод их отщепления от белковой молекулы с помощью высокоспецифичной N-гликозидазы F (Tarentino et al., 1985). С этой целью избирательно экстрагированные белки оболочки споры, внутренние белки спор и белки полярной трубки инкубировали в присутствии фермента и анализировали изменение их электрофоретической подвижности с помощью ДСН-ПААГЭ после обработки N-гликозидазой F. В качестве положительного контроля использован трансферин человека - гликопротеин, содержащий N-связанные углеводные цепи. Как показало разделение белков методом ДСН-ПААГЭ, обработка трансферина человека N-гликозидазой F приводила к повышению электрофоретической подвижности данного белка в геле за счет удаления N-связанных углеводных компонентов (Рисунок 39, дорожки 1, 2). В то же время ни один из экстрагированных внутренних белков спор (Рисунок 39, дорожки 3, 4), белков оболочки (Рисунок 39, дорожки 5, 6) и полярной трубки (Рисунок 39, дорожки 7, 8) не показал изменения электрофоретической подвижности после обработки данным ферментом. Это свидетельствует в пользу отсутствия N-связанных углеводных цепей в составе белков *P. grylli*.

С целью подтвердить данные, полученные в ходе экспериментов с N-гликозидазой F, общие фракции белков спор *P. grylli* и хозяина (жирового тела сверчка) были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и инкубированы в присутствии лектина WGA, выделенного из зародышей



**Рисунок 39. Обработка белков спор *P. grylli* N-гликозидазой F.**

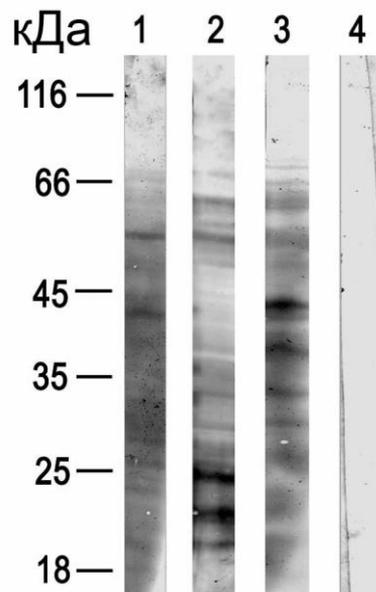
Пробы содержали: трансферрин человека (1, 2), внутренние белки спор (3, 4), поверхностные белки спор (5, 6) и белки полярной трубки (7, 8). 1, 3, 5, 7 - пробы обработаны ферментом, 2, 4, 6, 8 - контроль; ДСН-ПААГЭ, окраска геля Кумасси R-250.

распознает остатки и олигомеры N-ацетил- D-глюкозамина и, следовательно, специфичен для N-гликозилированных белков. Как и следовало ожидать, WGA-пероксидазные конъюгаты распознавали целый ряд белков различной молекулярной массы в пробах жирового тела хозяина (Рисунок 40, дорожки 1, 2). В то же время в пробах спор ни один белок не продемонстрировал специфичного окрашивания (Рисунок 40, дорожки 3, 4). На основании полученных данных можно было сделать окончательный вывод об отсутствии N-гликозилированных белков в спорах данного вида микроспоридий.

#### **4.3.4. Выявление остатков маннозы в структурных белках спор *P. grylli*.**

Как отмечалось выше, анализ предполагаемых белков - кодирующих последовательностей в геноме микроспоридии *E. cuniculi* выявил наличие ферментов, участвующих в O-маннозилировании белков. В связи с этим представляло интерес получить биохимическое подтверждение присутствия остатков маннозы в составе различных белков микроспоридий, в первую очередь в составе структурных компонентов споры. С этой целью проведена избирательная солюбилизация основного белка оболочки споры *P. grylli* p40 и предпринята попытка его преципитации в присутствии лектина GNA, конъюгированного с агарозными шариками. Данный лектин выделен из подснежника *Galanthus nivalis* и специфично распознает терминальные остатки маннозы. В результате эксперимента показано, что, несмотря на отсутствие положительной реакции при окраске p40 в присутствии периодата и реагента Шиффа, данный белок связывается с GNA-агарозой (Рисунок 41).

Способность p40 связываться с лектином нарушалась после обработки белка альфа и бета маннозидазами (Рисунок 41, А, дорожки 7, 8), но не зависела от присутствия в инкубационной среде 1 % неионного детергента

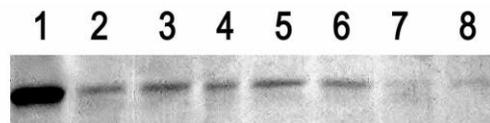


**Рисунок. 40. Гибридизация общих белков жирового тела сверчка и спор *P. grylli* с лектином WGA, конъюгированным с пероксидазой хрена.**

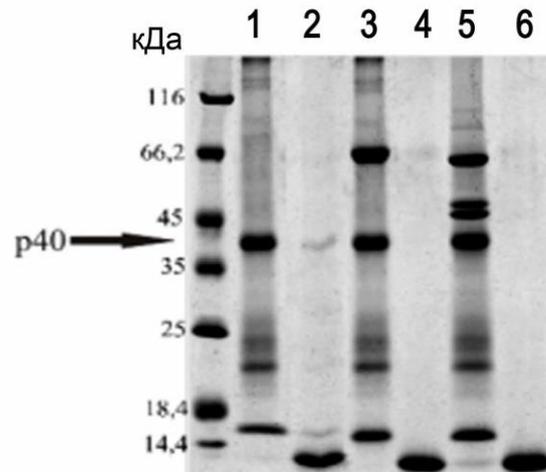
1, 2 - белки хозяина, соответственно окрашенные Понсо и инкубированные с WGA-пероксидазой; 3, 4 - белки спор паразита, соответственно окрашенные Понсо и инкубированные с WGA-пероксидазой.

Тритон Х-100 (Рисунок 41, А, дорожка 3), что свидетельствует о специфичности данного процесса. Однако в результате инкубации лишь часть солюбилизованного белка связывалась с GNA-агарозой. Поскольку инкубация одной и той же аликвоты солюбилизованного р40 с разным объемом GNA-агарозы не приводила к заметному изменению количества преципитируемого белка (Рисунок 41, А, дорожки 2, 4, 5), наблюдаемое частичное связывание не могло быть следствием недостаточной емкости использованного сорбента. Одно из возможных объяснений связано с тем, что лишь часть молекул р40 содержит остатки маннозы и количество углеводных остатков, связанных с отдельной молекулой, не достаточно для визуально различимого разделения гликозилированной и негликозилированной форм.

Поскольку наше исследование выполнено с использованием микроспоридии рода *Paranosema*, филогенетически удаленного от рода *Encephalitozoon*, сопоставление полученных нами данных с результатами расшифровки генома *E. cuniculi* позволило заключить, что редукция аппарата гликозилирования белков - общее свойство данной группы внутриклеточных паразитов. В частности, показано отсутствие N-связанных гликопротеинов в спорах *P. grylli*. При этом нам удалось показать что, несмотря на потерю большинства ферментов, вовлеченных в этот процесс, основные белки оболочки споры и полярной трубки, транспортируемые через комплекс Гольджи, все же подвергаются гликозилированию. Было показано, что БПТ А *P. grylli* является наиболее гликозилированным гликопротеином среди белков не только паразита, но и клетки хозяина. Обнаружение маннозилирования основного белка оболочки споры еще раз подтвердило, что микроспоридии сохранили способность к O-связанному маннозилированию белков. Это соответствовало не только присутствию соответствующих генов в геноме *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001), но и первым биохимическим данным, полученным при изучении особенностей



**А**



**Б**

**Рисунок 41. Связывание основного белка оболочки спор *P. grylli* с GNA-агарозой (два независимо проведенных эксперимента).**

А. 50 мкл экстрагированного из интактных спор белка (1) инкубировали в присутствии 100 (2), 50 (3, 4, 6-8) или 12.5 (5) мкл 50%-ной суспензии шариков агарозы с пришитым лектином. Дополнительно связывание проводили в присутствии 1 % Тритона X-100 (3) и после обработки белка бета маннозидазой (7), альфа маннозидазой (8) или после контрольной инкубации в буфере для маннозидазы (6). Осадки отмывали и связавшиеся белки элюировали кипячением 10 мин в 50 мкл раствора 0.1 М Трис-НСl, рН 8.0, содержащего 2 % ДСН и 5 % 2-МЭ. Б. 1, 2 - контрольная обработка экстрагированного из интактных спор белка р40 с буфером для маннозидазы; 3, 4, - обработка бета маннозидазой; 5, 6, - обработка альфа маннозидазой. 1, 3, 5 - исходный белок до связывания с шариками GNA-агарозы; 2, 4, 6 - белок специфично связавшийся с GNA-агарозой и элюированный кипячением в буфере для ДСН-ПААГЭ.

2004). Позднее в научной литературе появилась информация о присутствии в спорах микроспоридий *E. cuniculi* и *P. locustae* O-связанных гликанов, состоящих из линейных цепей альфа-1,2-связанных остатков маннозы (Taupin et al., 2007).

#### **4.4. Экспрессия генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *P. locustae*.**

Таким образом, в ходе проведенных исследований на примере микроспоридий рода *Paranosema* нам удалось показать, что секреторный аппарат, участвующий во внутриклеточном транспорте, гликозилировании и секреции белков паразита, представляет собой сеть разветвленно-варикозных тубул. Эта структура соединяет ЭР с плазматической мембраной и формирующейся полярной трубкой, но лишена каких-либо везикул. Везикулы в данном исследовании не обнаружены даже при применении метода ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением и ингибировании процессов слияния и “раздевания” (uncoating) COP-везикул соответственно с помощью N-этилмалеимида и  $AlF_4$  (Beznoussenko et al., 2007). В 2013 году группой американских коллег в ходе трехмерной томографической реконструкции комплекса Гольджи спороплазм микроспоридии *A. algerae* получены аналогичные результаты, свидетельствующие об отсутствии изолированных везикул в клетках паразитов (Takvorian et al. 2013). Таким образом, можно утверждать, что авезикулярная структура аппарата секреции наблюдается у филогенетически удаленных видов микроспоридий, принадлежащих к различным филогенетическим кладам.

Однако, как показали результаты расшифровки геномов патогена человека *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001) и еще нескольких видов микроспоридий, целый ряд генов, традиционно вовлеченных в процессы

везикулярного транспорта, в геноме авезикулярных паразитов все таки присутствует. На заключительном этапе исследования секреторного аппарата микроспоридий мы попытались выяснить коррелирует ли отсутствие у микроспоридий COP-зависимых везикул с отсутствием или низким уровнем экспрессии генов, вовлеченных в их формирование и последующее слияние с мембранными компартментами.

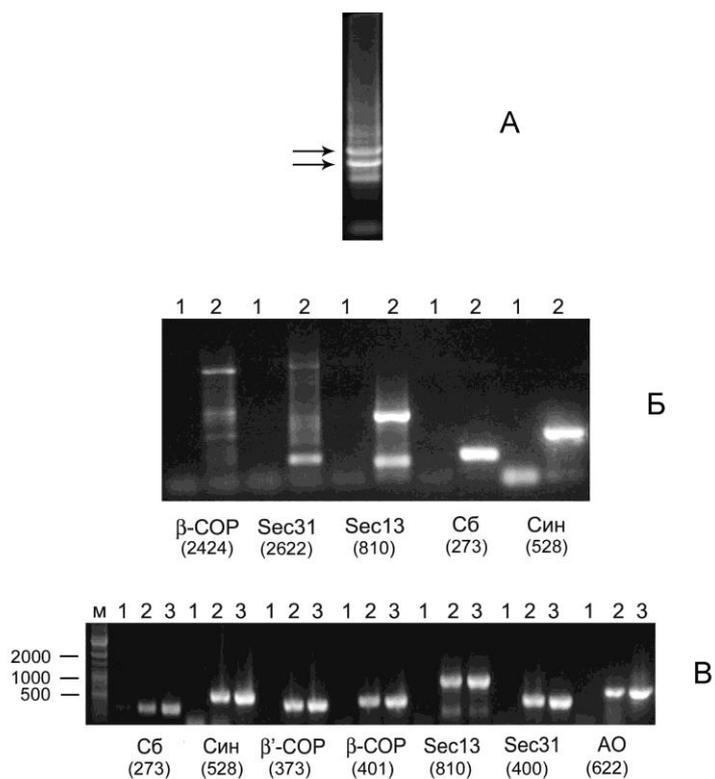
Для анализа содержания мРНК, кодирующей белки микроспоридии *P. locustae*, ответственные за формирование и слияние транспортных везикул, использован метод ОТ-ПЦР. Данный подход подразумевает выделение общей РНК паразита и синтез кДНК копий транскриптов с помощью фермента обратная транскриптаза и олиго-дТ праймеров в качестве затравки. Последующая ПЦР-амплификация копий генов и их фрагментов с использованием синтезированной кДНК в виде матрицы позволяет оценить содержание синтезированных продуктов друг относительно друга, а также относительно уровня амплификации какого-либо гена с известными

функцией и уровнем экспрессии. Кроме того, полученные ранее антитела к Sec 13 субъединице комплекса COPII и SNARE-белку синтаксину *P. locustae* (раздел 2.4.3. настоящей диссертации) были использованы для их иммунолокализации в клетках микроспоридий.

#### **4.4.1. Анализ содержания мРНК-транскрипов, кодирующих субъединицы COPI, COPII и SNARE-белки в клетках микроспоридий.**

Разделение в 1% агарозном геле суммарной РНК, выделенной из  $3 \times 10^8$  стадий внутриклеточного развития микроспоридии *P. locustae* с помощью реагента PureZOL (Bio-Rad, США), показало хорошую эффективность метода и сохранность полос, соответствующих основным фракциям 23S и 16S рибосомальной РНК микроспоридий (Curgu et al., 1990) (Рисунок 42, А). Выделенная РНК после удаления примесей геномной ДНК с помощью фермента ДНКазы I была использована для синтеза кДНК. Поскольку

затравкой для синтеза кДНК послужили универсальные олиго-дТ праймеры, набор кДНК продуктов пропорционально отражал содержание мРНК транскриптов, имеющих в 3'-концевой области последовательность поли-А. Полученная кДНК была использована для анализа экспрессии 6 генов, вовлеченных в везикулярный транспорт:  $\beta$  и  $\beta'$  субъединиц коаномерного комплекса COPI, Sec13 и Sec31 субъединиц комплекса COPII, синтаксин-подобного белка и SNARE-белка синаптобревина. ПЦР-амплификация полноразмерных копий генов показала, что эффективность ПЦР снижается с увеличением размера амплифицируемого фрагмента (Рисунок 42, Б). Копии генов размером более 2000 пн (Sec31,  $\beta$ -COPI), синтезировались значительно хуже по сравнению с генами длиной менее 1000 пн (Sec13, синаптобревин, белок SFT семейства). В связи с этим для протяженных генов (Sec31,  $\beta$ -COP и  $\beta'$ -COP) были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать 3'-концевые фрагменты генов длиной около 400 пн (Таблица 1). ПЦР анализ с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты ДНК до 1000 пн показал примерно одинаковый уровень экспрессии шести изученных генов (Рисунок 42, В). Использование в качестве матрицы кДНК, синтезированной на 200 нг суммарной РНК стадий, обеспечивало выход ПЦР-продукта, соизмеримый с таковым для 1 мкг геномной ДНК паразита (положительный контроль). Более того, уровень экспрессии генов везикулярного транспорта оказался сравнимым с уровнем экспрессии гена альтернативной оксидазы - фермента, участвующего в центральном метаболизме паразита и обеспечивающего передачу электронов на кислород. Полученный результат не был следствием присутствия остатков геномной ДНК в пробах, поскольку в контрольных экспериментах, когда ОТ не была добавлена в смесь для синтеза кДНК, положительная реакция отсутствовала.



**Рисунок 42. Анализ уровня экспрессии генов COP- и SNARE-белков в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae* с помощью ОТ-ПЦР.**

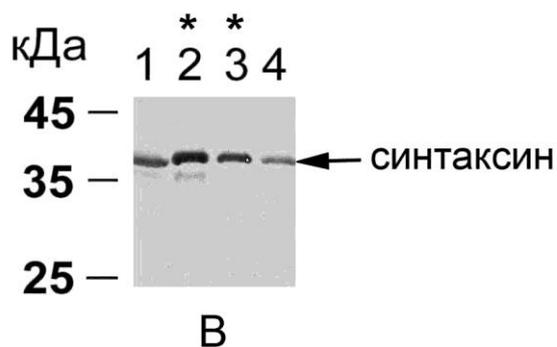
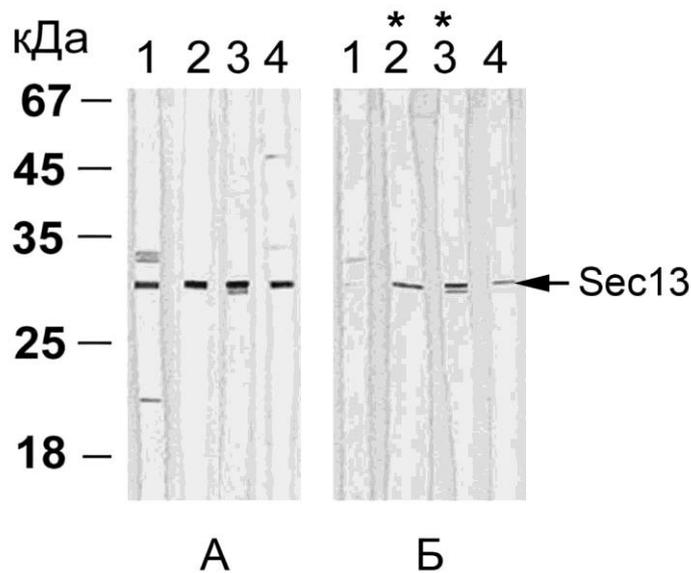
А. РНК выделяли из стадий внутриклеточного развития микроспоридий, разделяли в 1% агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. Наличие четких полос соответствует 23S и 16S рРНК (указаны стрелками). Б. Амплификация полноразмерных копий генов показала, что эффективность ПЦР снижается с увеличением размера продукта. В. ПЦР с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты до 1000 пн, показал примерно одинаковый уровень экспрессии шести изученных генов и гена кодирующего альтернативную оксидазу. *Сб* - синаптобrevин, *Син* - синтаксин-подобный белок SFT семейства,  $\beta'$ -COP и  $\beta$ -COP - субъединицы комплекса COP I, *Sec13* и *Sec31* - субъединицы COPII, *AO* - альтернативная оксидаза. 1 - отрицательный контроль (ОТ не была 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.).

#### 4.4.2. Накопление Sec13 субъединицы COPII и SNARE-белка синтаксина в клетках микроспоридий и их связь с мембранами паразита.

Как уже отмечено в главе 2, в результате иммунизации кроликов рекомбинантными белками, наработанными в клетках *E. coli*, были получены и очищены антитела к субъединице Sec13 комплекса COPII и SNARE-белку синтаксину микроспоридии *P. locustae*. В ходе анализа белков микроспоридий с помощью иммуноблотинга также показано, что оба белка, участвующих в процессах формирования и слияния везикул, накапливаются как в спорах, так и стадиях внутриклеточного развития авезикулярных микроспоридий (Рисунок 8). При этом содержание белка Sec13 несколько выше в спорах, а синтаксина в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*.

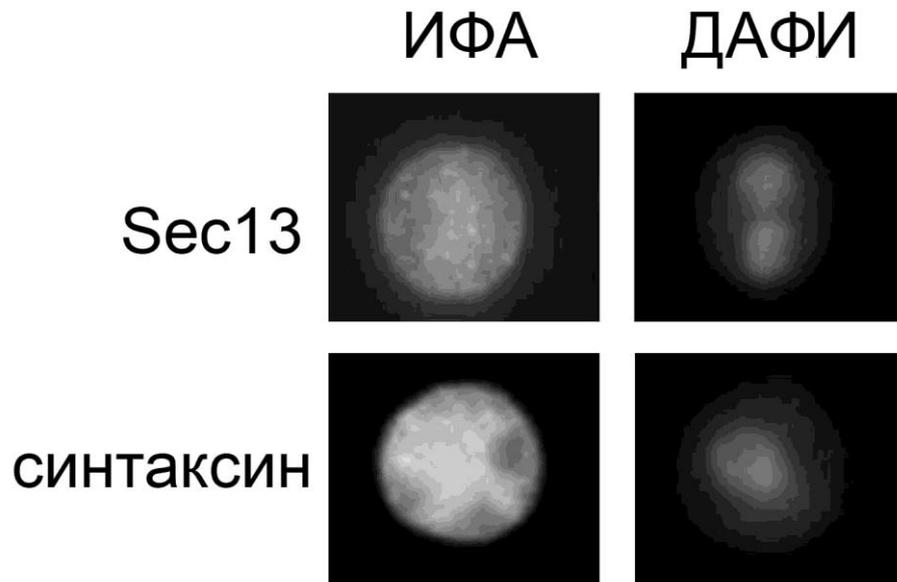
С целью показать связь обоих белков с мембранами паразита споры *P. locustae* были разрушены в 25 mM Трис-HCl буфере (pH 8.0) в присутствии 0.3 M сахарозы и последовательно центрифугированы при различных скоростях. Анализ полученных осадков, ресуспендированных в том же буфере до объема конечного супернатанта, показал что изучаемые белки присутствуют в грубом дебрисе (осадок после центрифугирования гомогената 10 мин при 200 g), мембранной фракции (осадки после центрифугирования 20 мин при 20000 g и в течение часа при 460000 g), а также в растворимой фракции (итоговый супернатант) (Рисунок 43). При этом большая часть обоих белков обнаружена в мембранной фракции (Долгих и др., 2010а).

Сходный результат получен при иммунофлюоресцентной микроскопии клеток микроспоридий, инкубированных в присутствии антител против белка Sec13 и синтаксина (Рисунок 44). Как видно из рисунка, антитела к субъединице комплекса COPII и SNARE-белку *P. locustae* неравномерно окрашивают мембранные структуры клеток. При этом рисунок мечения



**Рисунок 43. Иммуноблотинг белков спор *P. locustae* с очищенными антителами против Sec13 субъединицы COP II (А, Б) и SNARE-белка (В) синтаксина.**

Очищенные споры разрушали в присутствии 0.3М сахарозы. Осадки после последовательного центрифугирования гомогената при 100g 10 мин (дорожка 1), 20000g 20 мин (дорожка 2), 430000 g 1 час (дорожка 3) были ресуспендированы в том же буфере до объема конечного супернатана (дорожка 4) и равные аликвоты проанализированы с помощью иммуноблтинга. А, Б. Разное разведение антител против белка Sec13 (1:25 и 1:125). В. Обработка мембраны антителами против белка синтаксина. Звездочками указаны дорожки 2 и 3, соответствующие мембранным фракциям, в которых наблюдалась максимальное содержание COP- и SNARE-белков.



**Рисунок 44. Иммунофлюоресцентная микроскопия меронтов *P. locustae* с использованием антител против Sec13 субъединицы комплекса COPII и SNARE-белка синтаксина.**

Данный эксперимент показал различную локализацию двух белков в мембранных структурах паразита. ДАФИ (4',6-диамидино-2- фенилиндол) - флуоресцентный ядерный краситель, который прочно связывается с АТ-богатыми районами ДНК.

#### 4.4.3. Предполагаемая роль генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридий.

Таким образом, в данном исследовании мы получили весьма интересный результат. С одной стороны, мы показали непрерывность секреторного пути микроспоридии *P. locustae* и убедительно доказали отсутствие транспортных везикул в клетках паразитов (Beznoussenko et al., 2007). Более того, как уже отмечалось, отсутствие изолированных везикул в клетках паразитов подтверждено американскими коллегами в ходе трехмерной томографической реконструкции комплекса Гольджи спороплазм микроспоридии *A. algerae* (Takvorian et al. 2013). Это свидетельствовало не только о достоверности полученных нами результатов, но и об универсальности авезикулярной структуры секреторного пути у различных представителей группы. С другой стороны, мы продемонстрировали относительно высокую транскрипционную активность генов, вовлеченных в формирование транспортных везикул и их слияние с мембранными компартментами. Кроме того, для Sec13 субъединицы комплекса COPII и SNARE-белка синтаксина показано не только присутствие мРНК транскриптов, но и накопление обоих белков в клетках паразита, а также их ассоциация с мембранной фракцией. Полученный результат хорошо согласуется с тем, что во всех расшифрованных к настоящему времени геномах микроспоридий обнаружено присутствие генов везикулярного транспорта, что косвенно подтверждает их функциональную активность и важную роль в физиологии микроспоридий.

Функциональная активность генов везикулярного транспорта микроспоридий поднимает вопрос о том, какую функцию они могут выполнять в авезикулярных клетках паразита. К настоящему времени мы не имеем достаточного количества экспериментальных данных для ответа на этот вопрос. Для его выяснения необходимо проведение дальнейших экспериментов связанных с иммунолокализацией, выделением и анализом

СОР-комплексов и SNARE-белков микроспоридий. Например, одной из предполагаемых функций СОР-комплексов в клетках микроспоридий может быть их участие в сортировке и концентрировании секретлируемых карго-белков (Beznoussenko, Mironov 2002).

Не менее интересным представляется вопрос о том, насколько уникален пример авезикулярного транспорта, обнаруженного в клетках микроспоридий рода *Paranosema*, связан ли он с минимизацией паразитической клетки при переходе к внутриклеточному паразитизму и наблюдается ли подобная ситуация у свободноживущих организмов. Поскольку филогенетическая связь микроспоридий с грибами к настоящему времени фактически доказана (Fischer, Palmer, 2005), интерес представляют данные ультраструктурного анализа секреторного аппарата дрожжей *Saccharomyces cerevisia* - одного из модельных объектов клеточной биологии. Структуры, эквивалентные комплексу Гольджи, впервые описаны у *S. cerevisiae* как изолированные мембранные элементы, окруженные мелкими везикулами (Preuss et al., 1992). Позднее было установлено, что независимо распределенные в цитоплазме элементы представляют собой кластеры тубул, часто содержащих на конце утолщения в виде секреторных гранул (Rambourg et al., 1993). Изучение трехмерной структуры секреторного аппарата дрожжей с помощью стереоэлектронной микроскопии показало, что тубулярная сеть комплекса Гольджи обеспечивает непрерывную связь между ЭР и формируемыми секреторными гранулами. Поскольку при анализе крайне редко выявлялись изолированные везикулы, тубулы и вакуоли, авторы делают вывод о непрерывности секреторного пути в клетках *S. cerevisiae* (Rambourg et al., 2001).

Вероятно, данный тип строения комплекса Гольджи не универсален даже среди дрожжевых грибов. Например, секреторный аппарат метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* представляет стопку из 3-4 изолированных цистерн, непосредственно примыкающих к ЭР (Mogelsvang et

al., 2003). Однако принципиальное сходство в строении секреторного аппарата микроспоридий и дрожжей *S. cerevisiae* позволяют заключить, что авезикулярный транспорт не уникален для данной группы паразитов и встречается, по крайней мере, у некоторых свободноживущих грибов. Уникальная особенность комплекса Гольджи микроспоридий заключается в полном отсутствии транспортных везикул, что может быть связано с утратой ряда ключевых генов при переходе к внутриклеточному паразитизму.

## **Глава 5. Роль секретируемых белков микроспоридий в управлении физиологическими процессами и молекулярно-генетическими программами зараженной клетки насекомого-хозяина.**

### **5.1. Состояние изученности проблемы к началу исследований.**

#### **5.1.1. Секретируемые белки внутриклеточных паразитов как инструмент воздействия на клетку хозяина.**

Тесный пространственный контакт внутриклеточных паразитов с цитоплазмой зараженной клетки предполагает, что в ходе эволюции эти микроорганизмы приобрели способность перестраивать физиологию зараженной клетки под свои нужды, управляя молекулярно-генетическими программами и биохимическими процессами хозяина. Для паразита жизненно необходимо решение двух основных задач. Во-первых, он должен успешно противостоять таким защитным реакциям хозяина как индукция апоптоза (Carmen, Sinai, 2007), продукция активных радикалов кислорода (Nathan, Shiloh, 2000), автофагия, действие интерферон-индуцибельных ГТФаз (Martens, Howard, 2006) и лизосомальной системы. Во-вторых, паразит должен обеспечить себя питательными веществами в ограниченных условиях зараженной клетки (Sibley, 2011).

Молекулярные механизмы воздействия паразитов на зараженную клетку в последнее время становятся предметом детального исследования у представителей двух систематических групп простейших - Apicomplexa и Kinetoplastida. В частности, уже накоплен обширный материал, что все изученные внутриклеточные паразиты способны эффективно ингибировать апоптотические процессы в зараженной клетке. Установлено, что основным механизмом, используемым паразитами, стала активация ядерного транскрипционного фактора NF-κB, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла (Carmen, Sinai, 2007). NF-κB

находится в цитоплазме клетки в неактивном состоянии, формируя комплекс с ингибиторным белком I $\kappa$ B. Активация транскрипционного фактора осуществляется при фосфорилировании I $\kappa$ B под действием I $\kappa$ B-киназы (IKK). Это приводит к деградации I $\kappa$ B в результате действия протеосомы 26S, высвобождению NF- $\kappa$ B из состава ингибирующего комплекса, его транслокации в ядро и активации транскрипции контролируемых генов (Perkins, 2007). В частности, показано, что два представителя типа Apicomplexa используют разные киназы ингибитора I $\kappa$ B для активации фактора NF- $\kappa$ B. У паразита *Toxoplasma gondii* обнаружена собственная киназа TgIKK, локализуемая на мембране паразитофорной вакуоли и фосфорилирующая белок I $\kappa$ B. При этом для транскрипции NF- $\kappa$ B-активируемых генов необходимо участие как TgIKK паразита, так и собственной IKK зараженной клетки (Molestina, Sinai, 2005). В тоже время, пироплазмы *Theileria parva* и *Theileria annulata*, развиваясь в прямом контакте с цитоплазмой зараженной клетки, иммобилизуют на своей поверхности IKK хозяина в виде крупных мультисубъединичных комплексов, обладающих высокой киназной активностью в отношении белка I $\kappa$ B (Heussler et al., 2002). Приведенные данные показывают, что белки, локализованные на поверхности клетки паразита или на мембране паразитофорной вакуоли, часто играют важную роль во взаимоотношениях с зараженной клеткой. В качестве еще одного примера можно привести поверхностную металлопротеазу GP63 жгутиконосца *Leishmania major*, играющую важную роль в воздействии паразита на клетку хозяина (Halle et al., 2009). В частности, данный фермент ответственен за ингибирование сигнального каскада с участием митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), поскольку инактивирует белок p38, играющий центральную роль в этом пути.

Однако наибольшим потенциалом по воздействию на зараженную клетку, вероятно, обладают белки паразита, секретлируемые в цитоплазму

зараженной клетки. В зависимости от выполняемой функции, растворимые молекулы могут специфично накапливаться в различных компартментах хозяина и свободно взаимодействовать с молекулами-мишенями зараженной клетки. Среди представителей типа Apicomplexa наиболее интересные секретлируемые белки обнаружены у пироплазм рода *Theileria*. Развиваясь в непосредственном контакте с цитоплазмой клеток хозяина (почти исключительно лейкоцитов), эти уникальные паразиты приобрели способность вызывать их обратимую трансформацию (иммортализацию). К настоящему времени у *T. annulata* обнаружено уникальное семейство, состоящее из 5 секретлируемых белков, транспортируемых в цитоплазму и далее в ядро клетки хозяина (Swan et al., 2001; Swan et al., 2003; Shiels et al., 2004). Поскольку эти белки располагают ДНК-связывающим доменом, их участие в регуляции транскрипционной активности генов хозяина весьма вероятно. Кроме того, в субтеломерных регионах генома этих паразитов обнаружено обширное семейство, состоящее из 85 генов, кодирующих переменные секретлируемые белки (Schmuckli-Maurer et al., 2009). В настоящее время изучаются особенности экспрессии и внутриклеточной локализации этих белков. Многие из них содержат сигнал для ядерной локализации (NLS, nuclear localization signal), а экспрессия одного из белков в культуре клеток млекопитающих привела к его накоплению в ядре.

Для других представителей Apicomplexa и Kinetoplastida возможность секреции белков в цитоплазму хозяина ограничивается мембраной паразитофорной вакуоли, что подразумевает необходимость выработки паразитом механизмов для преодоления дополнительного барьера. Например, фосфатаза PP2C-hn (Gilbert et al., 2007) и протеинкиназа ROP16 (Saeij et al., 2007) *T. gondii*, транспортируемые в ядро хозяина, представляют собой белки роптрий и выделяются в зараженную клетку в момент проникновения (Ravindran, Boothroyd, 2008). В качестве примера белков, выделяемых в клетку хозяина эндопаразитическими жгутиконосцами, можно

привести фактор элонгации-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) лейшманий *Leishmania donovani*, транспортируемый из фагосомы в цитоплазму зараженного макрофага с помощью еще не известного механизма и взаимодействующий с белком SHP-1, представляющим собой одну из фосфатаз остатков тирозина в белках млекопитающих (Nandan et al., 2002, Nandan et al., 2005).

Важно отметить, что в отличие от внутриклеточных Protozoa, к началу данного исследования фактически неизученными оставались белки, секретируемые в клетку хозяина представителями типа Microsporidia. При этом имелись все основания полагать, что данная группа облигатных внутриклеточных паразитов может оказаться самым интересным объектом для такого рода исследований.

### **5.1.2. Косвенные данные о способности микроспоридий управлять молекулярно-генетическими программами и физиологическими процессами зараженной клетки хозяина.**

Среди множества данных, свидетельствующих о сложном и разнообразном характере взаимоотношений микроспоридий со своими хозяевами, в первую очередь следует подчеркнуть их чрезвычайно широкое распространение среди животных. В отличие от всех других внутриклеточных эукариотических паразитов, микроспоридии известны у представителей почти всех типов животного царства от простейших до приматов, включая человека (Исси, 1986). Это говорит о том, что они давно перешли к внутриклеточному паразитизму, пройдя чрезвычайно длительный путь адаптации к развитию внутри другой клетки. В отличие от внутриклеточных споровиков и жгутиконосцев, большинство видов микроспоридий развивается в прямом контакте с цитоплазмой хозяина, что позволяет паразитам не только эффективно использовать ресурсы зараженной клетки, но и управлять ею с целью создания условий максимально благоприятных для своего развития. В этом отношении

микроспоридий уместно сравнить с пироплазмами рода *Theileria*. Как уже было отмечено, именно эти представители типа Apicomplexa, развиваясь в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки хозяина, способны эффективно управлять зараженной клеткой вплоть до запуска программ ее обратимой трансформации (иммортализации). Именно у пироплазм обнаружено большое разнообразие белков, секретируемых в цитоплазму зараженной клетки (Swan et al., 2001; Swan et al., 2003; Shiels et al., 2004; Schmuckli-Maurer et al., 2009).

Данные, накопленные в ходе расшифровки геномов нескольких видов микроспоридий, подтвердили правомерность предположения о целенаправленном вмешательстве микроспоридий в физиологические процессы зараженной клетки. Они ясно показали уникальную степень минимизации собственного функционального аппарата паразитов (Katinka et al., 2001; Cornman et al., 2009; Keeling et al., 2010), а также наличие в геноме целого ряда переносчиков, способных к эффективной эксплуатации метаболической системы клетки хозяина (Katinka et al., 2001; Cornillot et al., 2002; Heinz et al. 2012). При этом наиболее интересным, с точки зрения адаптации к внутриклеточному паразитизму, было приобретение функциональных АТФ/АДФ-транспортеров пластидно-бактериального типа, подробно описанное в главе 2.

Столь сильная зависимость микроспоридий от метаболической системы клетки хозяина с большой долей вероятности позволила предположить способность паразитов перестраивать физиологические процессы зараженной клетки, направляя их на обеспечение своего развития субстратами энергетического и пластического обмена. Основным или одним из основных механизмов такого воздействия со стороны микроспоридий могла стать секреция паразитом разнообразных факторов белковой природы в цитоплазму зараженной клетки. В главе 2 подробно описаны разнообразные морфофункциональные изменения, которые микроспоридии

способны вызвать в зараженных клетках хозяина. Кроме того, в литературе появились интересные данные о том, что микроспоридии, как и другие внутриклеточные паразиты, способны подавлять процессы апоптоза (запрограммированной смерти) в зараженных клетках с помощью пока неизученных молекулярных механизмов (del Aguila et al., 2006; Scanlon et al., 1999).

На основе проанализированных данных мы пришли к выводу о том, что белки микроспоридий, предположительно секретируемые паразитом в цитоплазму зараженной клетки, могли бы относиться к трем функциональным категориям. Первую группу могли бы составлять ферменты, способные мобилизовать запасные питательные вещества зараженной клетки хозяина и метаболизировать промежуточные соединения энергетического и пластического обмена. Ко второй группе мы отнесли белковые факторы, проникающие в ядро зараженной клетки для участия в регуляции уровня экспрессии генов хозяина на транскрипционном уровне. Представители третьей группы секретируемых паразитом белков могли бы взаимодействовать с компонентами сигнальных каскадов зараженной клетки, воздействуя тем самым на молекулярно-генетические программы хозяина.

Для проверки высказанной гипотезы мы попытались обнаружить в геноме микроспоридии *P. locustae* гены, кодирующие секретируемые белки паразита, потенциально вовлеченные во взаимоотношения с зараженной клеткой (Долгих и др., 2010б). В качестве объектов исследования, способных воздействовать на насекомое-хозяина по одному из трех предполагаемых механизмов, выбраны гены (1) гидролитического фермента, относящегося к семейству  $\alpha/\beta$ -гидролаз, (2) гексокиназы и (3) двух представителей мультигенных семейств, кодирующих белки, содержащие обогащенные лейцином повторы. ПЦР-амплификация кодирующих последовательностей, их гетерологичная экспрессия в бактериальных и дрожжевых клетках, получение специфичных антител к рекомбинантным полипептидам и

иммунолокализация позволили подтвердить предположение о секреции паразитом в цитоплазму зараженной клетки хозяина белков, относящихся к различным функциональным категориям.

## **5.2. Изучение роли $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* во взаимоотношениях паразита с зараженной клеткой хозяина.**

### **5.2.1. Анализ нуклеотидной последовательности гена $\alpha/\beta$ -гидролазы, обнаруженной в геноме *P. locustae*.**

Последовательность, кодирующая гидролазу микроспоридии *P. locustae* представлена в свободном доступе на сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (номер последовательности AY608637.1). Данная последовательность кодирует полипептид размером около 41.5 кДа, состоящий из 372 аминокислотных остатков. Как показал BLAST- анализ данной последовательности, кодируемый белок принадлежит к семейству  $\alpha/\beta$ -гидролаз, включающему в себя такие гидролитические ферменты как протеазы, липазы, пероксидазы, эстеразы, эпоксид гидролазы и т.д. (Nardini, Dijkstra, 1999).

Наличие в составе молекулы N-концевого сигнального пептида, ответственного за ее секрецию, было предсказано с помощью сервера TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Предсказанный сигнальный пептид состоит из 18 аминокислотных остатков. С целью исключить присутствие гидрофобного (трансмембранного) домена, обуславливающего встраивание фермента в мембрану паразита, последовательность проанализирована с помощью сервера ТМНММ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/>). Поскольку проведенный анализ не обнаружил трансмембранного домена в составе молекулы, были все основания предполагать его секрецию за пределы клетки паразита.

Для ПЦР-амплификации копии гена использована следующая пара праймеров: CCATGGATCCATGCTGCCTGAGATCATCATGAA (прямой) и GTCAGAATTCTTACTCATCAAAAGCAACAAC (обратный). Для встраивания гена в экспрессирующий вектор к 5'-концу праймеров добавлены сайты, узнаваемые рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI (отмечены подчеркиванием).

ПЦР-амплификация гена, встраивание фрагментов ДНК в вектор pRSET, предназначенный для экспрессии белков в бактериях *E. coli*, и определение нуклеотидных последовательностей нескольких клонированных последовательностей позволили получить интересный результат. В ходе этого эксперимента нам удалось обнаружить в составе фермента *P. locustae* наличие С-концевых повторов VPENPLVSTLSVP(E/D)DLP(A/T)CTQH, обогащенных остатками аминокислоты пролин (отмечены подчеркиванием). В отличие от последовательности, представленной в базе данных NCBI и имеющей три таких повтора, большинство клонированных нами генов имели пять, и даже восемь копий пептида VPENPLVSTLSVP(E/D)DLP(A/T)CTQH (Рисунок 45). BLAST-анализ всех известных последовательностей гомологичных гидролаз микроспоридий показал, что наличие таких повторов - уникальное свойство микроспоридии *P. locustae*. Присутствие обогащенных остатками пролина повторов в С-концевой части фермента микроспоридий предполагает его функциональное сходство с липазами млекопитающих, активируемыми солями желчных кислот (bile salt-stimulated lipases (BSSL)). Представители этой группы являются мультифункциональными липолитическими ферментами, обладающие различными карбоксил-эстеразными активностями (Wang, Hartsuck, 1993). Поскольку истощение запасных жиров в клетках насекомых, зараженных различными видами микроспоридий, хорошо известно (Canning, 1962; Darwish et al., 1989; Долгих и др., 2011.), гетерологичная экспрессия в

**A** ELSRKSGAKLVITKGDHNTIGDPEVWRHVFEFVSCSDMT VPENPLVSTLSVPDDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPPVSAQMGLAGKTVWAFDE

**Б** ELSRKSGAKLVITKGDHNTIGDPEVWRHVFEFVSCSDMT VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPTCTQH VLENPPVSAQMGLAGKTVWAFDE

**В** ELSRKSGAKLVITKGDHNTIGDPEVWRHVFEFVSCSDMT VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH  
VPENPLVSTLSVPEDLPTCTQH VLENPPVSAQMGLAGKTVWAFDE

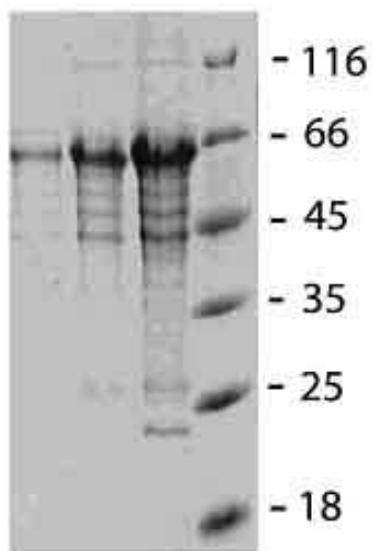
**Рисунок 45. Присутствие С-концевых пролин богатых повторов в составе молекулы  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae*.**

А. Последовательность, представленная на сайте NCBI, содержит три копии пептида VPENPLVSTLSVP(E/D)DLP(A/T)CTQH. Б. Большинство клонированных нами копий гена гидролазы содержит пять повторов. В. В некоторых клонированных копиях гена обнаружены восемь таких повторов.

бактериях *E. coli*, получение и очистка поликлональных антител к рекомбинантному белку были предприняты для изучения особенностей его локализации в клетках жирового тела саранчи, зараженных микроспоридией *P. locustae*.

### **5.2.2. Гетерологичная экспрессия $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в клетках бактерии *E. coli*.**

Как и при экспрессии других рекомбинантных белков микроспоридии *P. locustae* (глава 2), в случае  $\alpha/\beta$ -гидролазы отмечено токсичное воздействие чужеродного белка на рост бактерий. Несмотря на то, что на чашках с твердой средой LB и ампицилином вырастали колонии нормального размера, при добавлении в среду индуктора экспрессии ИПТГ развития колоний не наблюдалось. Эффективная экспрессия  $\alpha/\beta$ -гидролазы была достигнута в штамме С41 при инокуляции свежих колоний в жидкую среду LB и культивировании в течение ночи при 37° С после добавления в среду индуктора экспрессии ИПТГ. В отличие от большинства других рекомбинантных белков паразита, образующих в бактериях нерастворимые белковые включения, изучаемый фермент накапливался в цитоплазме *E. coli* в растворимой форме. Это дало возможность осуществить его эффективную очистку с помощью металло-хелатной аффинной хроматографии на Ni-содержащих колонках. Растворимый рекомбинантный белок, содержащий N-концевую последовательность, состоящую из 6 гистидиновых остатков (6xHis), эффективно связывался с Ni-содержащей смолой при пропускании через колонку растворимой фракции гомогената бактериальных клеток, разрушенных ультразвуком. Дальнейшее повышение концентрации имидазола (конкурирующего с остатками гистидина за связывание с ионами никеля) до 0.3 М в уравнивающем буфере сопровождалось специфичной элюцией рекомбинантного белка. Анализ полученных фракций с помощью ДСН-ПААГЭ (Рисунок 46) показал высокую степень очистки наработанного



**Рисунок. 46. Анализ  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae*, наработанной в бактериях *E. coli* и очищенной с помощью металло-хелатной хроматографии.**

Белки разделяли с использованием ДСН-ПАГЭ, окрашивая гели красителем Кумасси R-250. На дорожки нанесено разное количество рекомбинантного белка.

продукта, достаточную для получения специфичных антител. При этом молекулярный вес рекомбинантного белка, оцененный с помощью ДСН-ПААГЭ, составил около 66 кДа, в то время как предсказанный размер эстеразы, несущей пять копий С-концевой повторяющейся последовательности, плюс N-концевой рекомбинантный пептид вектора (4кДа) соответствует молекуле белка размером лишь 50 кДа. Наиболее вероятным объяснением наблюдаемых различий может быть общий отрицательный заряд молекулы гидролазы микроспоридий. Среди всех изучаемых нами белков паразита данный фермент имеет наиболее низкую изоэлектрическую точку (4.75), самый отрицательный заряд при рН 7.0 (-25.08) и в 2 раза более высокое содержание кислых аминокислот (60 остатков) по сравнению с содержанием основных (33 остатка). Таким образом, низкая электрофоретическая подвижность белка при ДСН-ПААГЭ может быть обусловлена свойством кислых белков связывать меньше ДСН (Monstadt, Holldorf, 1991).

Выделенный белок был использован для иммунизации кроликов, что позволило получить к нему специфичные антитела и приступить к иммунолокализации фермента в клетках зараженного жирового тела саранчи. Поскольку полученные антитела планировалось использовать для изучения возможности секреции  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в клетку хозяина с помощью иммуноблоттинга, на следующем этапе исследования было необходимо получить пробы цитоплазмы зараженных клеток жирового тела саранчи, незагрязненные внутренними (несекретируемыми) белками паразита.

### **5.2.3. Получение проб цитоплазмы зараженных клеток хозяина.**

Возможность повреждения клеток паразита при разрушении зараженной ткани представлялась достаточно важной методической проблемой на данном этапе исследования (Долгих и др., 2012). Это могло привести к

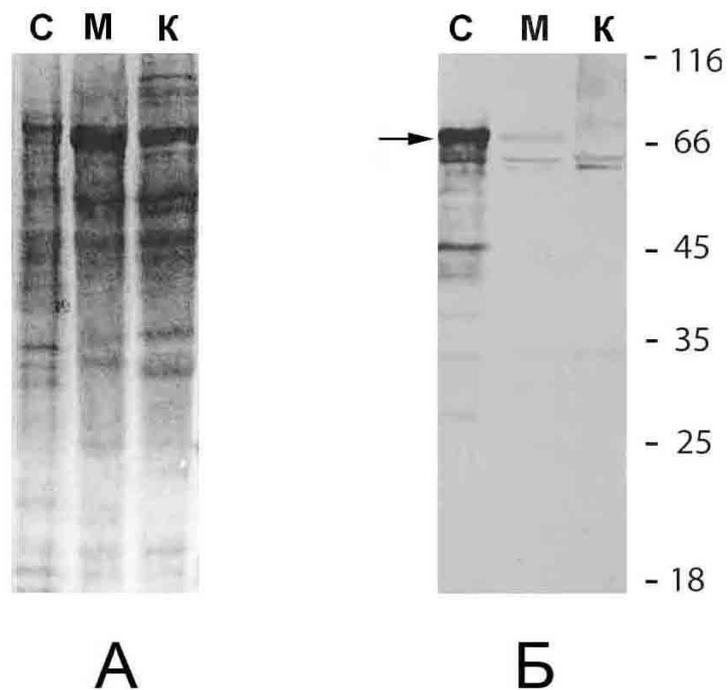
загрязнению проб цитоплазмы зараженных клеток хозяина несекретируемыми белками паразита. С целью избежать такой возможности, отпрепарированное жировое тело зараженной саранчи разрушали на холоду в стеклянном гомогенизаторе с неплотно пригнанным тефлоновым пестиком в присутствии изотонического ФСБ (138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.8). Для удаления спор и стадий внутриклеточного развития паразитов гомогенат незамедлительно центрифугировали при 100 g в течение 10 мин, супернатант дополнительно центрифугировали 20 мин при 18000 g и растворимую фракцию использовали в качестве пробы белков цитоплазмы клеток. Для получения контрольных проб жировое тело незараженных особей саранчи препарировали, разрушали и центрифугировали аналогично тому, как это было сделано для зараженной ткани. В качестве дополнительного контроля для иммуноблоттинга использованы пробы белков стадий внутриклеточного развития *P. locustae*, выделенных центрифугированием в градиенте плотности 20% раствора Перколла (Seleznev et al., 1995).

Поскольку даже при мягкой гомогенизации зараженной ткани и удалении стадий внутриклеточного развития паразитов с помощью низкоскоростного центрифугирования их частичное разрушение все же возможно, было необходимо найти маркер контроля такого загрязнения в приготовленных пробах. Растворимые метаболические ферменты паразита не могли быть использованы для этой цели, так как в главе 2 мы показали их специфичное накопление лишь в зрелых спорах микроспоридии *P. locustae* (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al. 2011). Для данного исследования наибольший интерес представлял факт накопления в меронтах и споронтах *P. locustae* молекулярных шаперонов семейства Hsp70 (Рисунок 8), представляющих собой растворимые несекретируемые белки (Dolgikh et al. 2011; Долгих и др., 2012). Поскольку в работе планировалось изучение секреторных белков *P. locustae*, наиболее близким к ним по

внутриклеточной локализации и поведению в ходе приготовления проб следовало признать шаперон ЭР-Hsp70. Данный белок отличается от трех других представителей семейства, обнаруженных в геноме *P. locustae*, наличием N-концевого сигнального пептида и C-концевой последовательности REEL, обеспечивающей его удержание в цистернах эндоплазматического ретикулума (Sato et al., 2006).

Полученные при проведении исследований, описанных в главе 2, антитела к ЭР-Hsp70 были использованы для Вестерн-блот анализа проб цитоплазмы зараженных и незараженных клеток хозяина, а также белков стадий внутриклеточного развития паразитов, выровненных по содержанию общего белка (Рисунок 47, А). В ходе иммуноблоттинга установлено, что молекулярный шаперон ЭР-Hsp70 практически отсутствовал в приготовленных пробах цитоплазмы зараженных клеток зараженного жирового тела саранчи (Рисунок 47, дорожка М), несмотря на его высокое содержание в стадиях внутриклеточного развития паразита (Рисунок 47, дорожка С). Как и ожидалось, в контрольных пробах жирового тела незараженных насекомых (Рисунок 47, дорожка К) данный белок также отсутствовал. Полученные данные показали, что приготовленные пробы могли быть использованы для поиска белков паразита, секретируемых в цитоплазму зараженной клетки, с помощью иммуноблоттинга. Используемые нами процедуры гомогенизации жирового тела зараженной саранчи, осаждения спор и стадий внутриклеточного развития паразита с помощью центрифугирования позволили получить пробы цитоплазмы клеток хозяина практически незагрязненные маркерным белком ЭР-Hsp70 микроспоридии *P. locustae*.

#### **5.2.4. Анализ содержания $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в клетках паразита и хозяина с помощью иммуноблоттинга.**



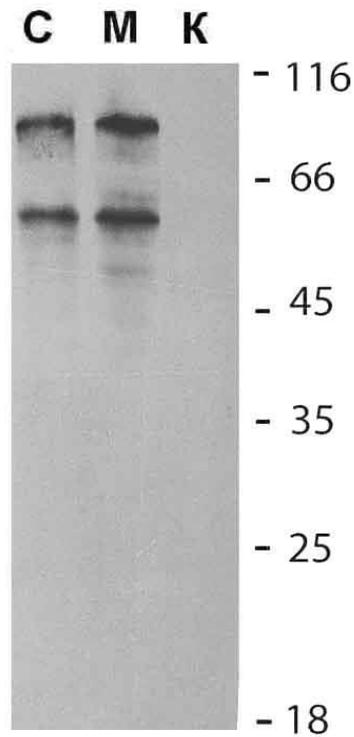
**Рисунок 47. Анализ содержания ЭР-Нsp70 (указан стрелкой) в выровненных по содержанию белка пробах стадий внутриклеточного развития *P. locustae* (С), а также цитоплазмы зараженного (М) и контрольного (К) жирового тела саранчи.**

А. Окраска нитроцеллюлозной мембраны после переноса белков красителем Понсо S. Б. Иммуноблоттинг.

Для анализа содержания  $\alpha/\beta$ -гидролазы паразита в приготовленных пробах белков жирового тела саранчи и стадиях внутриклеточного развития *P. locustae* был использован метод иммуноблоттинга с антителами против рекомбинантного фермента, выделенного из клеток *E. coli*. В ходе эксперимента обнаружено накопление  $\alpha/\beta$ -гидролазы в пробах зараженного жирового тела саранчи, а также в стадиях внутриклеточного развития (Рисунок 48). При этом содержание фермента в цитоплазме зараженных клеток хозяина (Рисунок 48, дорожка М) было несколько выше, чем в клетках паразита (Рисунок 48, дорожка С). Полученные антитела специфично распознавали в обеих пробах две полосы, соответствующие белкам с молекулярным весом около 62 и 80 кДа. Размер нижней полосы полностью соответствовал размеру рекомбинантного фермента (65-66 кДа) без учета N-концевого пептида размером 4 кДа в составе вектора. Присутствие в пробах более высокомолекулярной полосы, возможно, связано с наличием в клетках паразита дополнительной формы, с большим количеством копий C-концевого пептида VPENPLVSTLSVP(E/D)DLP(A/T)CTQH, обнаруженного нами в составе фермента. Накопление значительных количеств  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в зараженных клетках хозяина и специфичность полученных антител позволили нам приступить к более точной иммунолокализации фермента с помощью иммунофлюоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии.

#### **5.2.5. Локализация $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в зараженных клетках жирового тела саранчи.**

Для иммунолокализации белков паразита в структурах клетки хозяина жировое тело зараженной микроспоридиями саранчи фиксировали 4% формальдегидом и замораживали в жидком азоте после инкубации в растворе 30% сахарозы в качестве криопротектора. Замороженные срезы толщиной 10 мкм изготавливали на криотоме Microm HM 520, помещали на

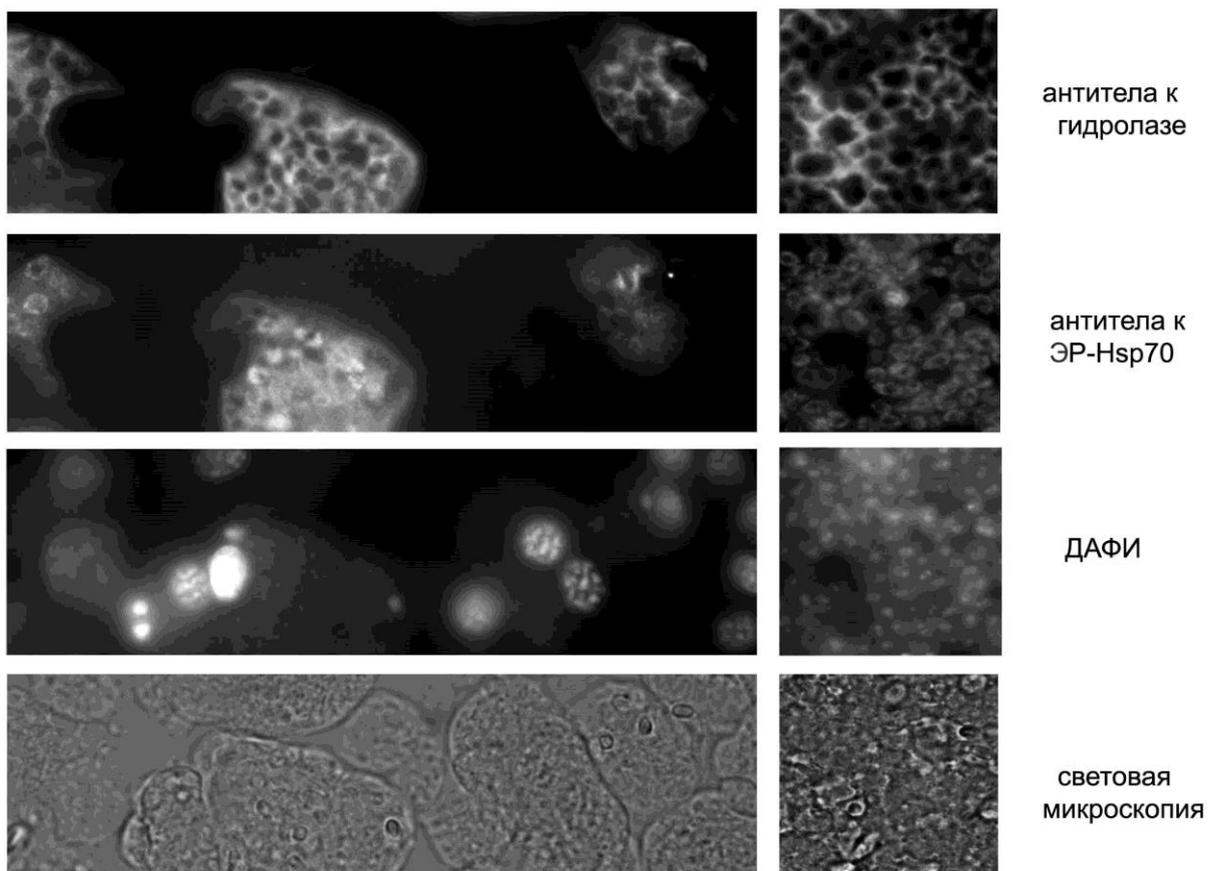


**Рисунок 48.** Анализ содержания  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в выровненных по содержанию белка пробах стадий внутриклеточного развития (С) *P. locustae*, а также цитоплазмы зараженного (М) и контрольного (К) жирового тела саранчи с помощью иммуноблоттинга.

предметное стекло и инкубировали с полученными ранее антителами, а затем с коммерческими конъюгатами Alexa Fluor 488 Anti-Mouse IgG и Alexa Fluor 546 Anti-Rabbit IgG Abs (Life Technologies). Подробно процедура иммунофлюоресцентного анализа описана в главе 1.

Для визуализации клеток паразита на срезах зараженного жирового тела саранчи было решено использовать антитела против шаперона ЭР-Hsp70 *P. locustae*. Как было показано с помощью иммуноблоттинга (Рисунок 47), данный белок накапливается в клетках и спорах паразита, но не секретруется в цитоплазму зараженной клетки хозяина. Как и ожидалось, ИФА подтвердил специфичное накопление ЭР-Hsp70 в клетках паразита (Рисунок 49). При этом антитела неравномерно окрашивали мембранные структуры, напоминающие цистерны ЭР, вокруг ядра паразита, но не распознавали что-либо в цитоплазме зараженных и незараженных клеток жирового тела саранчи (Senderskiy et al., 2014). Споры паразита, имеющие толстую, непроницаемую для антител оболочку, также оставались неокрашенными, что подтверждает внутриспоровую локализацию шаперона.

Напротив, антитела к  $\alpha/\beta$ -гидролазе *P. locustae* практически не распознавали клетки паразита на срезах зараженной ткани (Рисунок 49). Меронты, споронты, споробласты, споры и ядра хозяина выглядели как темные неокрашенные зоны, окруженные ярко светящейся цитоплазмой зараженной клетки, содержащей значительное количество секретуемой гидролазы паразита (Senderskiy et al., 2014). Распознавание белка паразита в цитоплазме зараженной клетки оказалось строго специфичным поскольку никакие структуры в незараженных клетках жирового тела саранчи не распознавались антителами к  $\alpha/\beta$ -гидролазе паразита. Таким образом, обработка одних и тех же срезов зараженного жирового тела саранчи с помощью антител, полученных в мышах и кроликах подтвердила факт



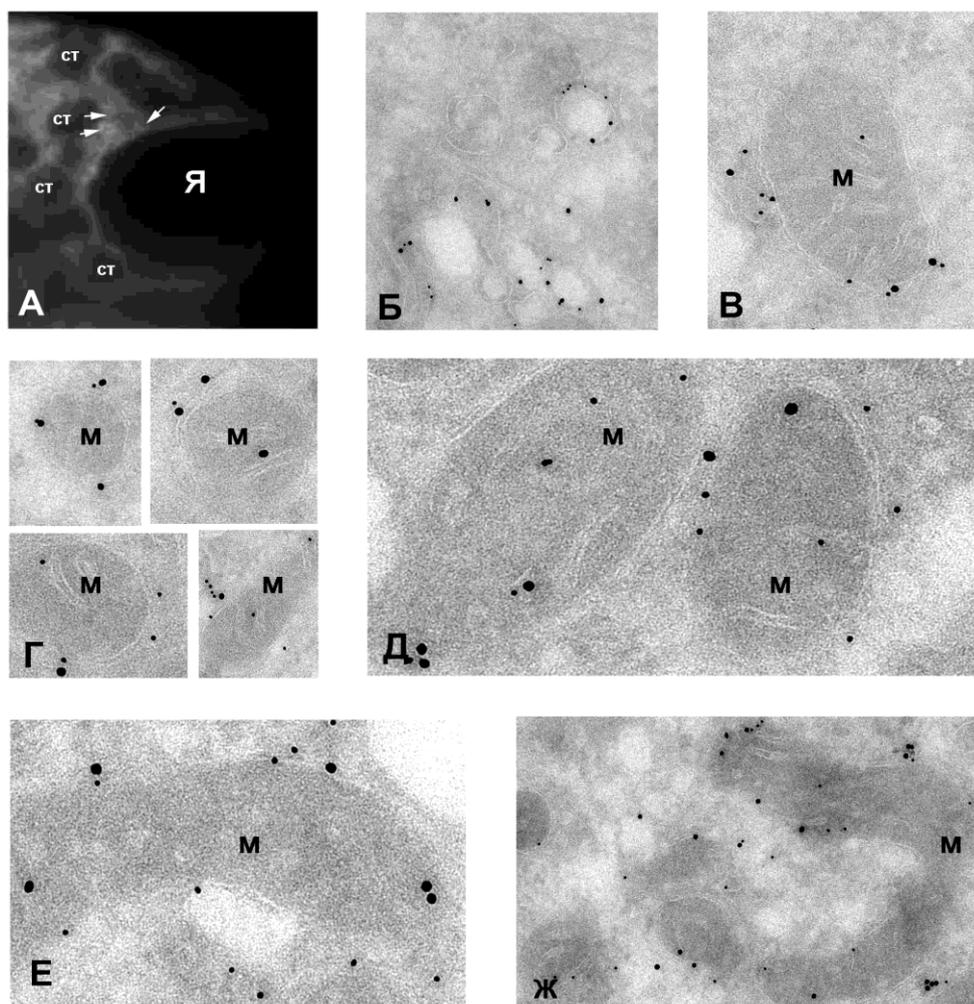
**Рисунок 49. Иммунолокализация ЭР-Hsp70 и  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи.**

Накопление паразитического фермента в цитоплазме зараженных клеток доказано с помощью анализа 10 мкм срезов зараженной ткани методом иммунофлуоресцентной микроскопии. ДАФИ (4',6-диамидино-2-фенилиндол) - флуоресцентный ядерный краситель.

специфичной секреции фермента паразита в цитоплазму зараженных клеток хозяина.

Более тщательный анализ распределения флюоресцентной метки на срезах зараженной ткани показал, что  $\alpha/\beta$ -гидролаза паразита не просто накапливается в цитоплазме зараженной клетки, но и связывается с различными мембранными структурами хозяина многие из которых по размеру, характеру распределения и форме напоминают митохондрии (Рисунок 50, А). При этом наиболее яркое свечение наблюдалось на периферии органелл, что может свидетельствовать о мембранной локализации фермента. Иммуноэлектронная микроскопия ультратонких криосрезов зараженного жирового тела саранчи с использованием антител к секретируемой гидролазе *P. locustae* подтвердила ее связь с мембранными структурами зараженной клетки (Рисунок 50, Б), включая митохондрии хозяина (Рисунок 50, В-Ж). На срезах значительная доля зерен коллоидного золота локализовалась на мембранах митохондрий и других структур клетки.

Следует отметить, что ассоциация гидролитического фермента паразитов с митохондриями и другими мембранными структурами хозяина позволила объяснить противоречие между результатами иммуноблоттинга, показавшего присутствие данного фермента в меронтах и споронтах *P. locustae*, выделенных с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла, и данными иммунофлюоресцентного анализа о практически полном отсутствии  $\alpha/\beta$ -гидролазы в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий. Наиболее вероятным объяснением данного противоречия может быть выделение мембранных структур клетки хозяина (и связанной с ними гидролазы) вместе с меронтами и споронтами паразита при центрифугировании в градиенте плотности Перколла. Более того, вполне возможно установление специфичной связи между стадиями внутриклеточного развития микроспоридий и мембранными органеллами зараженной клетки. Пространственная связь митохондрий хозяина с



**Рисунок 50. Иммунофлуоресцентная (А) и иммуноэлектронная (Б-Ж) микроскопия срезов зараженного жирового тела саранчи позволила получить данные о связи  $\alpha/\beta$ -гидролазы микроспоридии *P. locustae* с митохондриями и другими мембранными структурами зараженной клетки (на рисунке А отмечены стрелками).**

Я - ядро зараженной клетки хозяина, СТ-стадии внутриклеточного развития микроспоридий, М - митохондрии хозяина. На рисунках Б-Ж разный диаметр частиц коллоидного золота соответствует двум независимым процедурам очистки антител из иммунной сыворотки.

мембраной паразитофорной вакуоли обнаружена у *Toxoplasma gondii* (Sinai, Joiner, 2001). Предполагаемая в течение многих лет ассоциация микроспоридий с митохондриями хозяина (Scanlon et al., 2004) также получила экспериментальное подтверждение в 2014 году (Hacker et al., 2014). С физиологической точки зрения, полученный нами результат также имеет свое объяснение. Поскольку жирные кислоты, высвобождаемые в ходе мобилизации триацилглицеридов, расщепляются по механизму  $\beta$ -окисления именно в матриксе митохондрий (Ленинджер, 1974), связь липолитического фермента паразита с митохондриями клетки хозяина может иметь важное функциональное значение.

### **5.3. Гексокиназа *P. locustae* и ее роль во взаимоотношениях паразита с зараженной клеткой хозяина.**

#### **5.3.1. Уникальные свойства гексокиназы микроспоридий.**

Как описано в главе 3, из всех тестированных гликолитических ферментов мы не смогли обнаружить в спорах микроспоридии *P. grylli* только активность гексокиназы (Dolgikh et al., 1997). Поскольку последовательности, кодирующие полный набор гликолитических ферментов, включая гексокиназу, обнаружены в геномах различных видов микроспоридий, можно сделать вывод о том, что фермент должен играть важную роль в физиологии паразитов, а его низкая активность, вероятно, связана с общим низким уровнем углеводного и энергетического обмена в спорах. Однако позднее были получены новые данные о том, что гексокиназа микроспоридий отличается по своим свойствам от других ферментов гликолиза. Во-первых, был показан высокий уровень экспрессии гена гексокиназы микроспоридии *Nematocida parisii* на ранних этапах внутриклеточного развития (Cuomo et al., 2012), когда активации других генов, вовлеченных в гликолиз, не наблюдалось. Во-вторых, проведенный

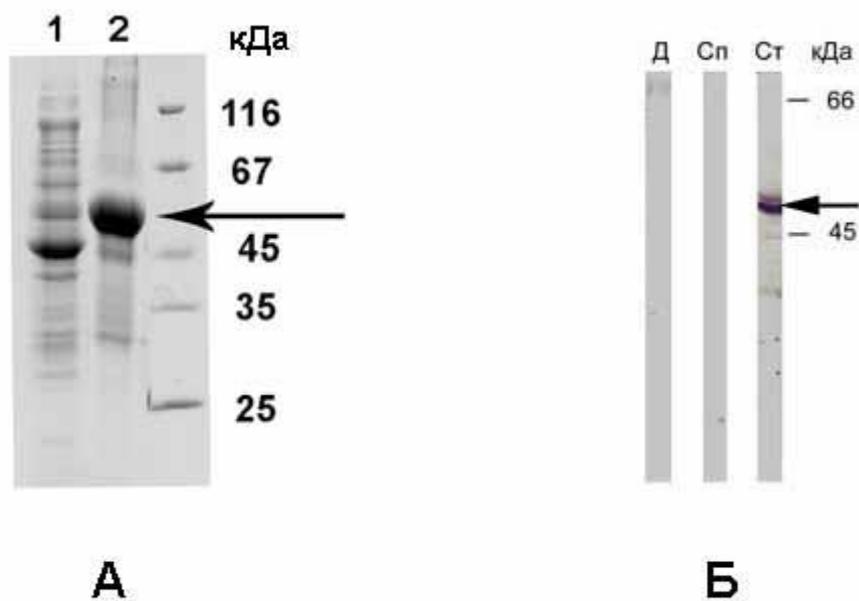
нами компьютерный анализ аминокислотной последовательности гексокиназы микроспоридии *P. locustae* показал присутствие в составе фермента N-концевого сигнального пептида, ответственного за его секрецию (Долгих и др., 2010б). Наличие сигнального пептида у гексокиназы микроспоридии *P. locustae* было предсказано программами TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) и Signal-3D (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>). При этом каждая из программ предсказывала различную протяженность сигнального пептида (18, 12 и 53 аминокислотных остатка соответственно). Поскольку анализ, проведенный с помощью программы TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), не обнаружил присутствия трансмембранного домена в составе фермента, были все основания предполагать его секрецию за пределы клетки паразита. Как показал анализ гомологичных белков других видов микроспоридий, наличие сигнального пептида в составе гексокиназ паразитов оказалось уникальным свойством группы. У гомологичных белков других организмов, включая филогенетически близкие к микроспоридиям грибы, секреторные сигнальные пептиды отсутствовали. Следует также отметить, что наличие секреторного пептида характерно именно для гексокиназ паразитов. Все другие ферменты гликолиза микроспоридий лишены такой последовательности.

Описанные выше уникальные особенности данного фермента микроспоридий позволили предположить его активное участие в воздействии на зараженную клетку хозяина и возможность его выхода за пределы клетки паразита. В качестве косвенного подтверждения данной гипотезы послужили данные о том, что клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* распознавали секреторные сигнальные последовательности шести гексокиназ различных видов микроспоридий и выделяли в культуральную среду маркерный белок, слитый с N-концевыми пептидами ферментов паразитов (Cuomo et al., 2012). Для проверки данного предположения нами осуществлены

гетерологичная экспрессия гексокиназы *P. locustae* в *E. coli*, получение антител к выделенному из бактерий рекомбинантному белку и иммунолокализация фермента в клетках зараженного жирового тела саранчи.

### 5.3.2. Гетерологичная экспрессия гексокиназы *P. locustae* в бактериях *E. coli* и получение антител к рекомбинантному белку.

Для ПЦР-амплификации копии гена гексокиназы *P. locustae* использована следующая пара праймеров: ССААСТСГАГАТГАГГАТГСТТТТГАТСТТТГС (прямой) и ГТСАГААТТСТАСТСААСТААГААГГААГС (обратный). Для встраивания гена в экспрессирующий вектор pRSET к 5'-концу праймеров добавлены сайты, узнаваемые рестриктазами *Xho*I и *Eco*RI (отмечены подчеркиванием). ПЦР-амплификация гена, встраивание фрагментов ДНК в вектор pRSET и эффективная экспрессия гексокиназы в клетках С41 бактерий *E. coli* осуществлены так же, как это описано выше для  $\alpha/\beta$ -гидролазы, а также в главе 2 для других белков микроспоридий. Как и подавляющее большинство экспрессированных в работе белков микроспоридии *P. locustae*, гексокиназа накапливалась в бактериальных клетках в виде нерастворимых белковых включений. В отличие от других белков микроспоридий, образующих белковые включения в бактериях *E. coli* (глава 2), рекомбинантная гексокиназа оказалась нерастворимой в присутствии 8 М мочевины (Рисунок 51, А). Успешная солюбилизация фермента наблюдалась после ресуспендирования белковых включений в растворе 2 % ДСН и 1 % 2-МЭ и инкубации в течение 10-15 мин при 95°C. Поскольку после удаления дебриса центрифугированием и тщательного диализа против ТСБ белок оставался в растворимом состоянии, полученный препарат был использован для иммунизации кроликов, получения сывороток и очистки специфичных антител согласно методикам, описанным ранее. На первом этапе исследования очищенные антитела были использованы для анализа



**Рисунок 51. Гетерологичная экспрессия гексокиназы *P. locustae* в бактериях и анализ специфичности антител, полученных к рекомбинантному белку, с помощью иммуноблоттинга.**

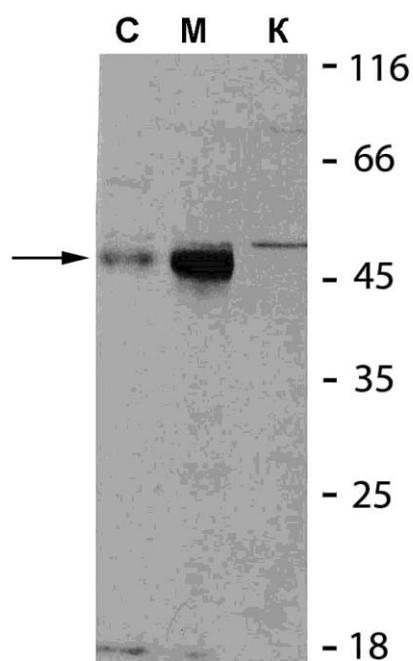
А. В отличие от других белков паразита, образующих белковые включения в бактериях *E. coli*, рекомбинантная гексокиназа *P. locustae* не солюбилизировалась в присутствии 8М мочевины (дорожка 1) и почти в чистом виде оставалась в нерастворимой фракции (дорожка 2).

Б. Иммуноблоттинг показал специфичное распознавание антителами против рекомбинантной гексокиназы белка с молекулярной массой 50 кДа в стадиях внутриклеточного развития, но не спорах паразитов. Д-грубый дебрис гомогената спор, Сп-осветленный гомогенат спор, выровненный по концентрации белка с пробой белков стадий внутриклеточного развития (Ст). Стрелками указаны белковые полосы, соответствующие гексокиназе микроспоридий.

микроспоридий с помощью иммуноблоттинга. Интересным результатом этого эксперимента оказалось специфичное распознавание антителами против гексокиназы белка с молекулярной массой 50 кДа в стадиях внутриклеточного развития, но не в спорах паразитов (Рисунок 51, Б). Поскольку размер выявленной полосы совпадал с размером рекомбинантного белка и соответствовал значению, предсказанному согласно аминокислотной последовательности, полученный результат свидетельствовал о накоплении гексокиназы *P. locustae* именно в стадиях внутриклеточного развития паразита и возможной важной роли фермента во взаимоотношениях микроспоридий с зараженной клеткой хозяина.

### **5.3.3. Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи.**

Для изучения возможности секреции паразитического фермента в цитоплазму зараженной клетки хозяина проведен анализ белков жирового тела саранчи и стадий внутриклеточного развития *P. locustae* с помощью иммуноблоттинга с использованием полученных нами специфичных антител. Данный эксперимент показал накопление значительных количеств гексокиназы в цитоплазме зараженного жирового тела саранчи (Рисунок 52, дорожка М), но не в контрольной (незараженной) ткани (Рисунок 52, дорожка К). Фермент также присутствовал в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*, выделенных центрифугированием в градиенте плотности Перколла (Рисунок 52, дорожка С), но в значительно меньшем количестве. Полученный результат подтвердил наше предположение о секреции значительных количеств гексокиназы микроспоридий в цитоплазму зараженной клетки и позволил приступить к анализу особенностей накопления фермента в зараженном жировом теле саранчи. Как и в случае  $\alpha/\beta$ -гидролазы, для определения локализации гексокиназы *P. locustae* в структурах клетки хозяина предпринят иммунофлюоресцентный анализ



**Рисунок 52. Иммуноблотинг с антителами против гексокиназы *P. locustae* показал специфичное накопление фермента в цитоплазме клеток зараженного (дорожка М), но не контрольного жирового тела саранчье (дорожка К).**

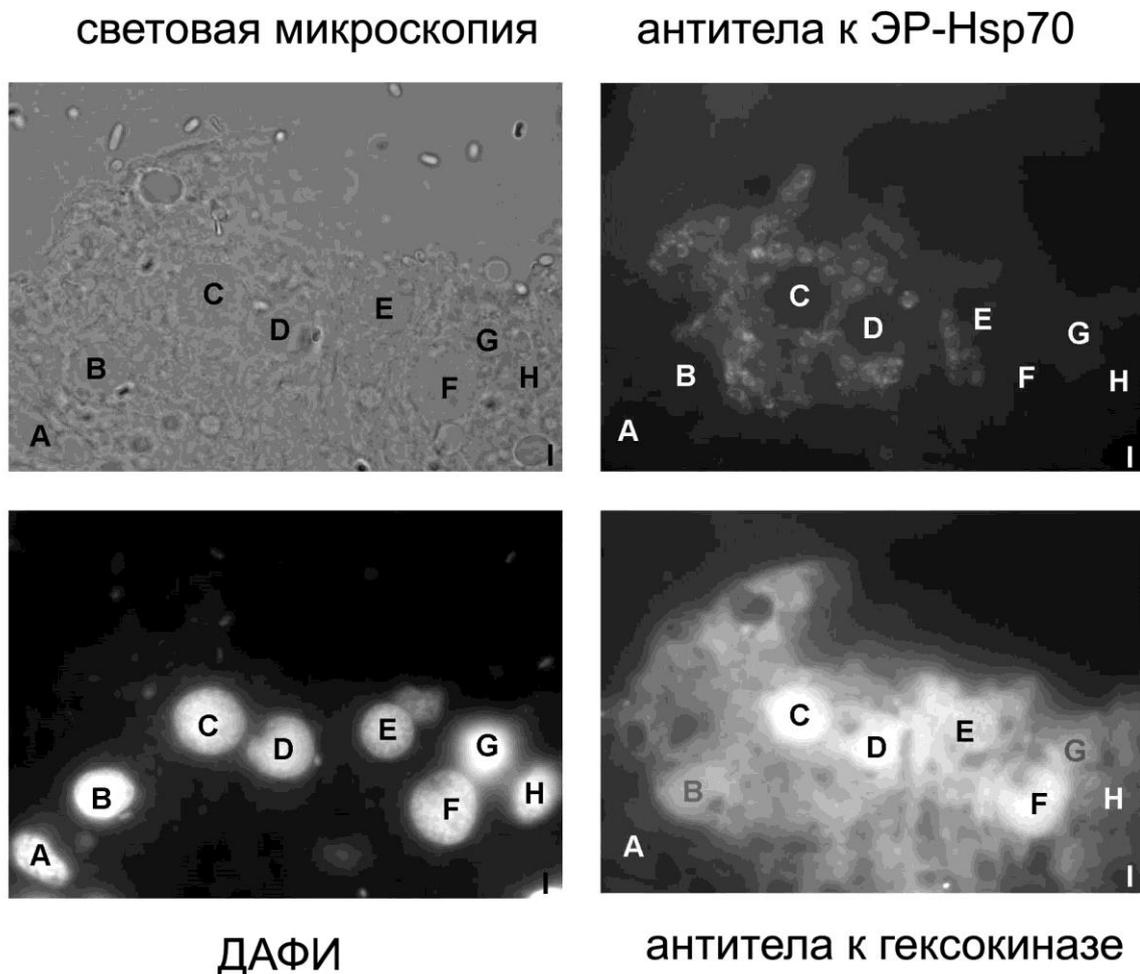
Гексокиназа также присутствовала в стадиях внутриклеточного развития паразита (дорожка С), но в значительно меньшем количестве. На каждую дорожку нанесено одинаковое количество (10 мкг) суммарного белка.

замороженных срезов зараженного жирового тела саранчи. Антитела против шаперона ЭР-Hsp70 *P. locustae* использованы для визуализации клеток паразита на срезах.

Проведенный эксперимент показал, что антитела к гексокиназе распознают фермент в цитоплазме зараженных клеток хозяина и в стадиях внутриклеточного развития паразитов (Рисунок 53). Некоторые клетки паразита выглядели даже более ярко, чем окружающая их цитоплазма. При этом споры паразита и незараженные клетки хозяина не окрашивались антителами к гексокиназе. Однако наиболее интересным и значимым открытием данного исследования оказалось обнаруженное нами накопление гексокиназы микроспоридий в ядрах зараженных клеток хозяина (Рисунок 53). Наиболее яркое окрашивание наблюдалось в ядрах интенсивно зараженных клеток в центре очага заражения. Интенсивность флюоресценции снижалась на периферии очага заражения и отсутствовала в ядрах незараженных клеток (Senderskiy et al., 2014).

Выполненный нами более детальный анализ аминокислотной последовательности гексокиназы *P. locustae* позволил обнаружить в ее составе фрагмент MWKWVSDIIKL, ограниченный остатками 165 и 177, фрагмент ILASLVLGVVKM, ограниченный остатками 392 и 403, фрагмент IAKEVAHLLAL, ограниченный остатками 432 и 442, и фрагмент LENINKDVVV, ограниченный остатками 442 и 451. Эти последовательности полностью соответствуют консенсусу ФХ2-3ФХ2-3ФХФ, где Ф - Leu, Ile, Val, Phe, Met, а Х обозначает любую аминокислоту. Данный консенсус распознается рецептором CRM1 (Xpo1), обеспечивающим транспорт белков между ядром и цитоплазмой клетки (Hutten, Kehlenbach, 2007).

Полученный результат согласуется с данными о том, что гексокиназа II *S. cerevisiae* накапливается в ядрах дрожжей при избытке в среде глюкозы, участвуя в регуляции ее метаболизма (Pelaez et al., 2009). Кроме того, по литературным данным, ядерная локализация гексокиназы II показана в



**Рисунок 53. Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи.**

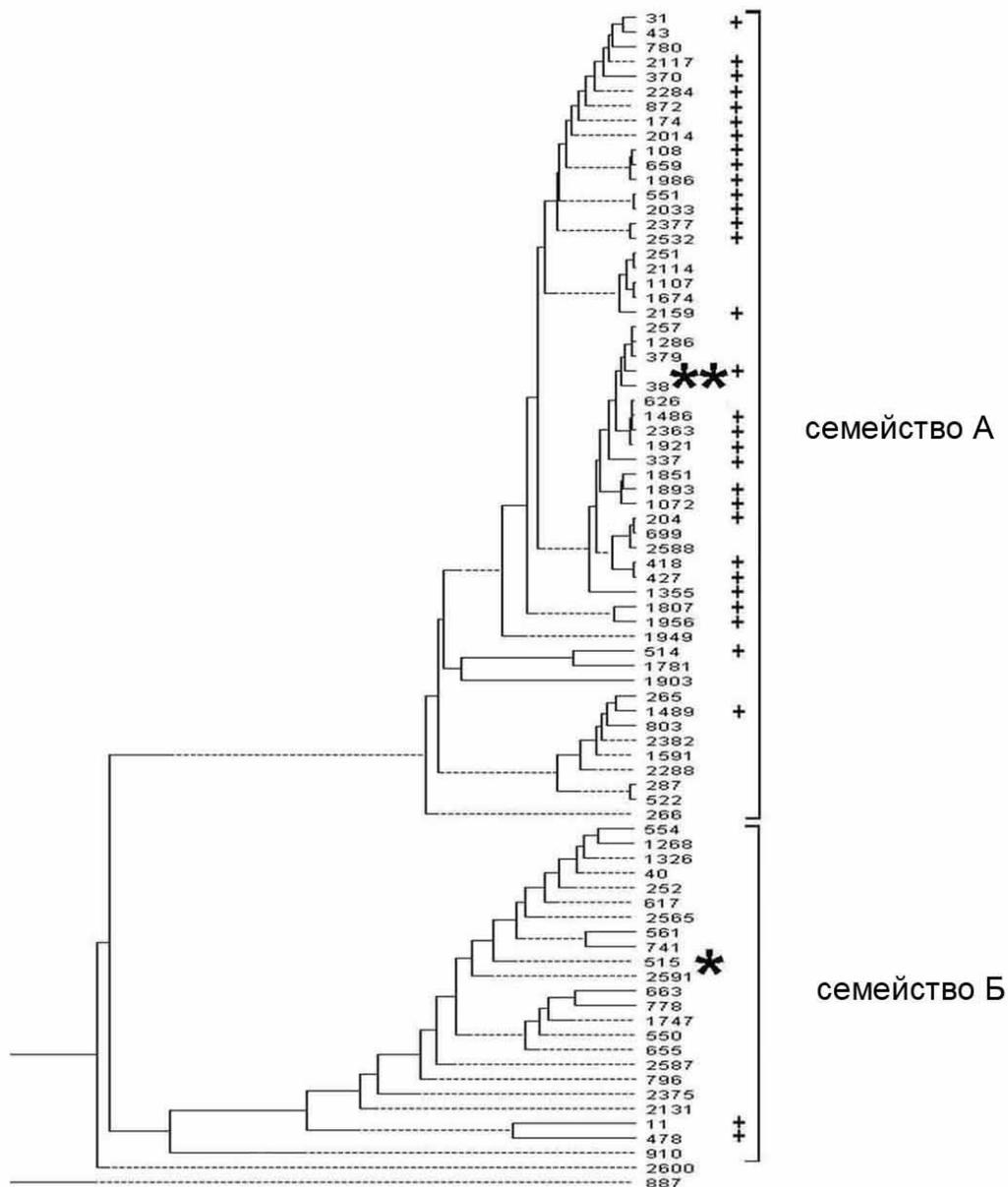
Накопление паразитического фермента в ядрах зараженных клеток доказано с помощью анализа замороженных 10 мкм срезов зараженной ткани с использованием иммунофлюоресцентной микроскопии. Латинские буквы черного цвета указывают на ядра зараженных клеток хозяина, белого цвета - на ядра незараженных клеток, а серого цвета - на ядра клеток, находящихся на периферии очага заражения.

клетках HeLa с помощью иммуоцитохимии и субклеточного фракционирования (Neary, Pastorino, 2010). Таким образом, локализация гексокиназы микроспоридий в ядре зараженных клеток свидетельствует в пользу приобретения ферментом паразита дополнительной функции, связанной с регуляцией уровня транскрипции генов хозяина. Как и гексокиназа II дрожжей (Moreno, Herrero, 2002), фермент микроспоридий может контролировать транскрипционную активность генов хозяина, вовлеченных в углеводный обмен, включая гены транспортеров (Petit et al., 2000), обеспечивающих поступление в зараженную клетку глюкозы и других соединений, необходимых для развития паразита.

#### **5.4. Секретируемые LRR-белки микроспоридии *P. locustae*.**

##### **5.4.1. Роль LRR-белков во взаимоотношениях между паразитом и хозяином.**

Одним из наиболее интересных и интригующих результатов расшифровки геномов различных видов микроспоридий оказалось обнаружение обширных генных семейств, кодирующих белки, содержащие повторы, обогащенные аминокислотой лейцин (LRR-белки). Наиболее обширное семейство LRR-белков, состоящее из 117 генов, было обнаружено в геноме микроспоридии *T. hominis* содержания гексокиназы в спорах и стадиях внутриклеточного развития (Heinz et al. 2012). Последовательности, кодирующие 97 LRR-белков, обнаружены в геноме микроспоридии *Spraguea lophii* (Campbell et al. 2013). Проведенный нами анализ последовательностей, представленных на сайте проекта по расшифровке генома микроспоридии *P. locustae*, также позволил обнаружить два таких семейства (Рисунок 54), кодирующих соответственно 25 и 55 LRR-белков (Senderskiy et al., 2014; Williams et al., 2014). Уже на этом этапе исследования с очень высокой долей вероятности можно было предположить активное участие мультигенных семейств,



**Рисунок 54. Анализ аминокислотных последовательностей LRR-белков, обнаруженных в геноме *P. locustae*, с помощью программы ClustalW.** Указаны номера кодирующих последовательностей в геномном проекте. Двумя звездочками обозначен обнаруженный нами новый LRR-белок паразита семейства А, экспрессированный в данном исследовании. Одной звездочкой обозначен представитель семейства Б, также экспрессированный в работе. Белки, обладающие сигнальным пептидом, предсказанным с помощью программы SignalP, обозначены знаком «плюс».

кодирующих LRR-белки микроспоридий, в паразито-хозяинных отношениях.

Во-первых, это подтверждается тем, что обширные мультигенные семейства присутствуют в геномах самых различных групп паразитов, играя важную роль в их взаимоотношениях с хозяином. У малярийных паразитов рода *Plasmodium* различные мультигенные семейства обеспечивают как вариабельность антигенов на поверхности паразита и зараженных клеток (Cunningham et al., 2005), так и секрецию разнообразных белковых факторов в компартменты зараженного эритроцита (Nunes et al., 2007). Сходная картина наблюдается и у других групп внутриклеточных паразитов (Anantharaman et al., 2007; De Pablos, Osuna, 2012). Во-вторых, интересной особенностью LRR-белков микроспоридий оказалась высокая вероятность наличия в их составе N-концевых сигнальных пептидов, ответственных за секрецию молекул за пределы клетки паразита (Рисунок 54). В-третьих, аргументом в пользу важной роли LRR-белков микроспоридий в воздействии на хозяина послужили общие структурно-функциональные особенности этих молекул у различных организмов. 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). LRR-белки играют важную роль в распознавании патогенов защитными системами растений (Dangl, Jones, 2001) и млекопитающих (Nurnberger, Brunner, 2002). Кроме того, они часто выступают в качестве факторов вирулентности различных микроорганизмов, играя важную роль в их взаимоотношениях с хозяином (Kedzierski et al., 2004).

Следует отметить, что генные семейства, кодирующие LRR-белки, не обнаружены ни в одном из геномов микроспоридий, принадлежащих к IV филогенетической кладе (класс *Terresporidia*). Именно к этой группе относятся такие хорошо известные паразиты наземных позвоночных

животных и насекомых как *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *N. bombycis*, *N. ceranae*. Проводя аналогию с утратой паразитами этой интересной группы гена альтернативной оксидазы (глава 3), можно предположить, что и утрата LRR-белков могла быть связана с переходом представителей этой группы к паразитированию на наземных хозяевах. Иными словами, смена круга хозяев при выходе микроспоридий на сушу могла привести к смене набора «инструментов», позволяющих паразиту управлять физиологическими процессами зараженной клетки. Именно смена круга хозяев могла оказаться причиной замены семейств генов, кодирующих LRR-белки на другое мультигенное семейство *InterB* в геноме микроспоридии *E. cuniculi* и некоторых других паразитов человека (Dia et al. 2007). У микроспоридии *N. ceranae* - другого представителя класса *Terresporidia*, инфицирующего медоносную пчелу, утрата семейства LRR-белков сопровождалась формированием в геноме пяти других мультигенных семейств (Cornman et al., 2009). Как и в случае семейства *InterB* *E. cuniculi*, обнаруженные последовательности не имеют гомологии с какими-либо известными белками.

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* с последующим получением поликлональных антител к выделенным рекомбинантным белкам. Анализ содержания обоих белков паразита в жировом теле саранчи и гетерологичная экспрессия полноразмерных копий генов в метилотрофных дрожжевых грибах *Pichia pastoris* подтвердили факт секреции множества LRR-белков паразита в цитоплазму зараженной клетки.

#### **5.4.2. Гетерологичная экспрессия LRR-белков *P. locustae* в бактериях *E. coli* и получение антител к рекомбинантным продуктам.**

Для амплификации гена 204 (нумерация приведена в соответствии с данными проекта по расшифровке генома *P. locustae*), кодирующего один из LRR-белков семейства А микроспоридии *P. locustae*, использованы праймеры CCATGGATCCATGATCAGAAATGCAGCATGTGT (прямой) и GTCAGAATTTCATCTGCCTGATGCTGCTGTGCT (обратный). Праймеры для амплификации гена 515, кодирующего LRR-белок семейства Б, имели последовательности CCATGGATCCATGTATCTGCAGAGAATGATGT (прямой) и GTCAGAATTCTTAGTCACACACGCCATAACTT (обратный). Сайты ферментов рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI, добавленные в 5'-областях праймеров, выделены в обеих парах подчеркиванием.

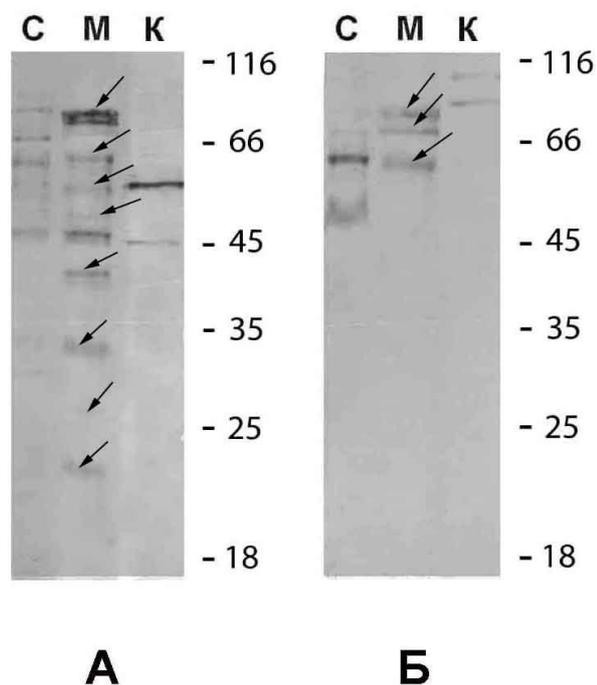
Копии обоих генов амплифицированы с помощью ПЦР и соответствующие фрагменты ДНК встроены в вектор pRSET для последующей экспрессии в бактериях *E. coli*. В случае LRR-белка семейства А полноразмерная копия гена встроена в вектор pRSETа по сайтам *Bam*HI и *Eco*RI. Как показал анализ одной из бактериальных колоний, несущей плазмиду с клонированным фрагментом ДНК, праймеры подобранные к гену 204 позволили амплифицировать новую форму LRR-белка, отсутствующую среди последовательностей, опубликованных на сайте проекта по расшифровке генома *P. locustae*. Именно данный обнаруженный белок, показавший 85-87% идентичности с аминокислотными последовательностями других LRR-белков семейства А, был использован нами в дальнейших экспериментах. В случае гена 515, кодирующего один из LRR-белков семейства Б, в экспрессирующий вектор pRSETс был встроен фрагмент ДНК размером 1155 пн, фланкированный сайтами ферментов рестрикции *Pst*I (позиция 401-го нуклеотида) и *Hind*III (позиция 1546-го нуклеотида). Как и большинство других экспрессированных нами белков *P. locustae*, оба полипептида накапливались в клетках *E. coli* (штамм С41) в виде нерастворимых белковых включений и были экстрагированы в присутствии 8 М раствора мочевины. Молекулярный вес обоих белков

полностью соответствовал предсказанному размеру с учетом дополнительного N-концевого пептида в составе рекомбинантных продуктов. Иммунизация кроликов выделенными белками позволила получить специфичные иммунные сыворотки и очистить антитела к рекомбинантным антигенам, иммобилизованным на нитроцеллюлозной мембране.

#### **5.4.3. Анализ особенностей накопления LRR-белков *P. locustae* в цитоплазме зараженного жирового тела саранчи.**

Множественность форм LRR-белков, закодированных в геноме микроспоридий, а также высокая степень сходства аминокислотных последовательностей у представителей внутри двух семейств (Рисунок 54) позволили заранее предположить, что антитела могут распознавать сразу несколько полос при иммуноблоттинге проб зараженного жирового тела. Кроме того, сходство LRR-белков микроспоридий с ГТФазами, ГТФ-связывающими белками, аденилатциклазами, регуляторами транскрипции и протеинкиназами свидетельствовало о возможной регуляторной роли секретлируемых молекул, что подразумевает их относительно невысокое содержание в зараженной клетке.

Как и ожидалось, в ходе иммуноблоттинга антитела против обоих LRR-белков распознавали в пробах цитоплазмы зараженного жирового тела саранчи несколько полос (Рисунок 55). При этом интенсивность окраски выявленных белков была относительно невысокой. В случае антител к LRR-белку семейства А наблюдалось распознавание 7-8 полос с молекулярным весом приблизительно от 20 до 105 кДа (Рисунок 55, А). Размер секретлируемых паразитом полипептидов соответствовал значениям, предсказанным по данным расшифровки генома *P. locustae*. В частности, LRR-белки семейства А имеют предсказанный размер от 17.2 кДа (ген 1956) до 104.4 кДа (ген 872).



**Рисунок 55. Иммуноблоттинг с антителами к LRR-белкам *P. locustae*.**

А. В случае антител к LRR-белку семейства А наблюдалось распознавание в пробах цитоплазмы зараженного жирового тела 7-8 полос (указаны стрелками) с молекулярным весом приблизительно от 20 до 105 кДа.

Б. Антитела к LRR-белку семейства Б показали специфичное накопление трех белков (указаны стрелками) размером от 63 до 80 кДа. На каждую дорожку нанесено одинаковое количество (10 мкг) суммарного белка.

Антитела к LRR-белку семейства Б показали специфичное накопление в цитоплазме зараженных клеток трех белков размером от 63 до 80 кДа (Рисунок 55, Б). Предсказанный молекулярный вес белка, кодируемого геном 515, составляет 78.8 кДа, а наиболее близкие к нему формы также имеют относительно крупные размеры (63.3 кДа (ген 617), 67.5 кДа (ген 2265), 68.1 кДа (ген 778), 84.6 кДа (ген 741), 85.8 кДа (ген 561)). Таким образом, есть все основания полагать, что обнаруженные секретируемые полипептиды паразита действительно относятся к LRR-белкам семейства Б. Следует отметить, что в пробах контрольного (незараженного) жирового тела саранчи и в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий использованные нами антитела также распознавали ряд белковых полос. Это может быть связано с наличием консервативных мотивов в составе LRR-белков (Matsushima et al., 2000). Однако подвижность этих полос достоверно отличалась от подвижности белков, обнаруженных в пробах зараженного жирового тела саранчи.

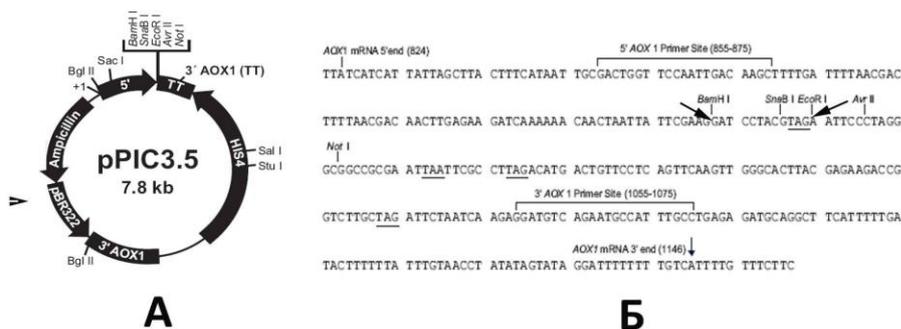
Наряду с анализом изучаемых белков с помощью иммуноблоттинга нами предприняты попытки их иммунолокализации на срезах зараженного жирового тела с использованием методов иммунофлюоресцентной микроскопии. Однако в отличие от экспериментов, связанных с иммунолокализацией гексокиназы и  $\alpha/\beta$ -гидролазы *P. locustae*, использование антител к LRR-белкам обоих семейств не дало положительного результата. Мы не смогли распознать какой-либо специфичный сигнал на срезах зараженного жирового тела саранчи. Это может быть связано как с относительно низким содержанием отдельных LRR-белков в цитоплазме зараженных клеток хозяина, так и с их высоким разнообразием. Поскольку результаты этого эксперимента не дали положительного результата, для подтверждения факта секреции LRR-белков микроспоридиями нами осуществлена гетерологичная экспрессия полноразмерных копий кодирующих генов в метилотрофных дрожжах *Pichia*

*pastoris*. Данный эксперимент показал, что клетки филогенетически близких к микроспоридиям грибов распознают LRR-белки микроспоридий как секретлируемые и выделяют их в культуральную среду в ходе гетерологичной экспрессии.

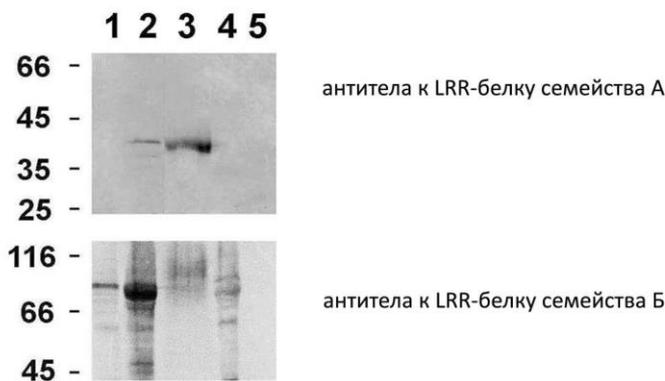
#### **5.4.4. Гетерологичная экспрессия LRR-белков *P. locustae* в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris*.**

Для гетерологичной экспрессии LRR-белков микроспоридий полноразмерные копии кодирующих генов были встроены в вектор pPIC3.5 (Life Technologies), предназначенный для экспрессии белков в клетках *P. pastoris* без добавления к их последовательности какого-либо дополнительного пептида (Рисунок 56, А). Оба гена встраивали в вектор по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI (Рисунок 56, Б). Полученные конструкции, линеаризованные с помощью рестриктазы *Sac*I, переносили в дрожжевые клетки с помощью электропорации и отобранные на минимальной среде колонии-трансформанты использовали для гетерологичной экспрессии обоих генов согласно протоколу, описанному в главе 1. Анализ белков, накапливающихся в ходе экспрессии в дрожжевых клетках и сконцентрированной приблизительно в 50 раз культуральной жидкости, был осуществлен с помощью иммуноблоттинга и полученных ранее специфичных антител.

В результате проведенного эксперимента установлено, что оба LRR-белка микроспоридий практически отсутствуют в клетках *P. pastoris* до добавления в среду метанола - специфичного индуктора дрожжевого промотора *AOX1*, контролирующего экспрессию гетерологичных белков (Рисунок 56, В). После добавления в среду метанола наблюдалось накопление обоих белков, как в дрожжевых клетках, так и в культуральной жидкости (Senderskiy et al., 2014). Данный результат подтвердил, что оба белка паразита распознаются дрожжевыми грибами *P. pastoris* как



экспрессия изучаемых LRR-белков	+	+	+	-	-
экспрессия контрольного белка	-	-	-	+	+
концентрированная среда	-	-	+	-	+
дрожжевые клетки	+	+	-	+	-
индукция экспрессии метанолом	-	+	+	+	+



**В**

**Рисунок 56. Гетерологичная экспрессия LRR-белков *P. locustae* в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris*.**

А. Карта вектора pPIC3.5. Б. Участок вектора pPIC3.5 с сайтами рестрикции для встраивания экспрессируемых генов. В. Анализ накопления изучаемых белков в дрожжевых клетках и сконцентрированной культуральной жидкости с помощью иммуноблоттинга. 1 - дрожжевые клетки до индукции гетерологичной экспрессии в присутствии метанола; 2 - дрожжевые клетки экспрессирующие гетерологичные белки 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 ( $\alpha/\beta$ -гидролазу) паразита (контрольные клетки); 5 - концентрированная культуральная среда после экспрессии контрольного белка.

секретируемые и выделяются за пределы клетки при гетерологичной экспрессии. Более эффективная секреция наблюдалась для LRR-белка семейства А (Рисунок 56, В). Большая часть этого белка накапливалась в культуральной жидкости за пределами дрожжевых клеток. Кроме того, размер секретируемых молекул, оцененный с помощью ДСН-ПААГЭ, полностью соответствовал предсказанному размеру белка (42 кДа). Полученный результат свидетельствует об отсутствии (или очень низком содержании) углеводных остатков в составе секретируемой молекулы. Поскольку у гетерологичных белков, секретируемых дрожжевыми клетками, часто наблюдается избыточное гликозилирование, сопровождающееся добавлением значительного числа маннозных остатков (Nett et al., 2013), данный результат оказался весьма интересным. В главе 4 мы уже затронули вопрос о минимизации аппарата гликозилирования белков у микроспоридий и подчеркнули, что основная часть паразитических белков или не гликозилирована или содержит небольшое число углеводных остатков. Таким образом, есть все основания полагать, что особенности гликозилирования и пространственная конфигурация молекул белка, секретируемых клетками дрожжей и самим паразитом, являются сходными. Этот факт, а также эффективная экспрессия и секреция гетерологичного белка дрожжевыми клетками позволяют планировать новые эксперименты, связанные с его наработкой, очисткой и иммобилизацией для поиска белков-мишеней в зараженном жировом теле саранчи.

Размер LRR-белка семейства Б, накапливающегося в дрожжевых клетках, также соответствовал предсказанному значению (около 79 кДа). Однако его экспрессия сопровождалась накоплением в культуральной жидкости размытой полосы значительно большего размера (Рисунок 56, В), что может соответствовать гликозилированной форме белка.

## 5.5. Научное значение полученных данных и новые направления исследований.

Проведенными исследованиями впервые доказано, что микроспоридии секретируют в зараженную клетку насекомого-хозяина белки, относящиеся к разным функциональным категориям. Так, гексокиназа в значительном количестве накапливается в ядрах зараженных клеток и, следовательно, может участвовать в регуляции транскрипционной активности генов хозяина, вовлеченных в углеводный и энергетический обмен. Представитель семейства  $\alpha/\beta$ -гидролаз, обладающий С-концевыми пролин-богатыми повторами, специфичными для активируемых солями желчных кислот липаз позвоночных, также в значительных количествах секретируется паразитом в зараженную цитоплазму и, вероятно, участвует в мобилизации липидных запасов жирового тела. Третья группа секретируемых факторов представлена LRR-белками, содержащими обогащенные лейцином повторы, формирующими два больших генных семейства в геноме *P. locustae* и составляющими значительную часть секретома этого паразита. Участие LRR-белков в белок-белковых взаимодействиях позволяет предположить их влияние на компоненты сигнальных каскадов зараженной клетки.

К сожалению, строго облигатный характер внутриклеточного паразитизма микроспоридий значительно затрудняет их изучение и делает невозможным использование большинства методов, связанных с манипуляциями на уровне генома паразитов. Для дальнейшего изучения молекулярных механизмов воздействия микроспоридий на зараженную клетку весьма полезной будет разработка новых оригинальных методических подходов.

Одним из перспективных подходов может стать гетерологичная экспрессия отдельных секретируемых белков микроспоридий в модельной эукариотической клетке. Используя в качестве такой модели дрожжевые грибы *Pichia pastoris*, мы уже показали в данном исследовании, что если

экспрессируемый белок микроспоридий относится к секреторным, дрожжи также секретируют его в культуральную среду. Если же у экспрессируемого белка удалить сигнальный пептид, можно успешно сымитировать процесс его попадания в цитоплазму зараженной клетки. В этом случае достаточно важно, чтобы используемая для гетерологичной экспрессии модельная клетка была филогенетически близкой к естественному хозяину изучаемого паразита. Недавно мы показали, что экспрессия гексокиназы *P. locustae* с удаленным сигнальным пептидом в клетках чешуекрылых линии Sf9 сопровождается накоплением белка паразита в ядрах клеток насекомых, как это имеет место и в зараженных клетках жирового тела саранчи - естественного хозяина для данного вида микроспоридий. Таким образом, данный методический подход может оказаться полезным для изучения особенностей локализации секреторируемого паразитом белка в зараженной клетке хозяина и для понимания того, как его секреция влияет на физиологическое состояние зараженной клетки.

Интересным направлением будущих исследований следует признать и поиск белков-мишеней зараженной клетки хозяина, с которыми могут взаимодействовать секреторируемые паразитом белки. Для поиска таких мишеней могут быть применены методы изучения белок-белковых взаимодействий, основанные на использовании двугибридного анализа, аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованным паразитическим белком, поверхностного плазмонного резонанса и другие.

Для поиска новых белков, секреторируемых микроспоридиями в зараженную клетку необходима разработка комплексных подходов, основанных на использовании протеомных методов или создании высокопредставительных библиотек рекомбинантных одноцепочечных антител к белкам зараженных клеток хозяина.

## 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 (Weidner et al., 1999). 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-биологических 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) COPI-зависимых везикул с помощью тетрафлюорида алюминия ( $AlF_4$ ) также не привели к их обнаружению (Beznoussenko et al., 2007). 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 *A. 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 ( $\alpha/\beta$ -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  $\alpha/\beta$ -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 экстрезии 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 секретируемые LRR-белки; (3) уникальными пролин-богатыми С-концевыми повторами в составе секретируемой  $\alpha/\beta$ -гидролазы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алиханов, Ш.Г. Влияние микроспориоза на плодовитость комаров *Aedes caspius caspius* (Culicidae) / Ш.Г. Алиханов // Паразитология. - 1979. - Т. 13, вып. 3. - С. 263-264.

Безнусенко, Г.В. Сравнительный анализ ультраструктурных изменений аппарата Гольджи, индуцированных действием фторида алюминия и NEM в клетках млекопитающих, насекомых и в микроспоридиях/ Г.В. Безнусенко, И.С. Сесорова, В.В. Долгих, Е.В. Моржина, Ю.С. Токарев // Морфология. - 2006. - Т. 129, вып. 4. - С. 21-22.

Бейер, Т.В. Цитохимическое исследование разных стадий жизненного цикла *Toxoplasma gondii*. IV. Дегидрогеназы в эндозоитах / Т.В. Бейер, Й.Х. Сиим, У.М. Хатчисон // Цитология. - 1977. - Т. 19, вып. 7. - С. 813-817.

Бейер, Т.В. Цитохимическое исследование разных стадий жизненного цикла *Toxoplasma gondii*. XI. Ферменты окисления-восстановления в паразитах на стадиях развития из кишечника кошки / Т.В. Бейер, Й.Х. Сиим, У.М. Хатчисон // Цитология. - 1978. - Т. 20, вып. 1. - С. 97-101.

Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. - М.: Мир, 1982. - 446 с.

Гилмур, Д. Метаболизм насекомых / Д. Гилмур. - М.: Мир, 1968. - 230 с.

Долгих, В.В. Активность ферментов углеводного и энергетического обмена в спорах микроспоридии *Nosema grylli* / В.В. Долгих, Е.С. Насонова, Г.Г. Паскерова // Паразитология. - 1996. Т. 30, вып. 2. - С. 178-181.

Долгих, В.В. Анализ экспрессии генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *Paranosema (Antonosporea) locustae* / В.В. Долгих, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, Г.В. Безнусенко // Цитология. - 2010а. - Т. 52, вып. 1. - С. 5-11.

Долгих, В.В. Влияние заражения микроспоридией *Nosema grylli* и кокцидией *Adelina* sp. на активность и состав изоферментов

лактатдегидрогеназы в жировом теле сверчков *Gryllus bimaculatus* / В.В. Долгих, М.В. Григорьев, Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. - 1995. - Т. 29, вып. 6. - С. 520-524.

Долгих, В.В. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 в изучении секретома 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.

Долгих, В.В. Особенности катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *Nosema grylli* / В.В. Долгих, П.Б. Семенов // Паразитология. - 2003. - Т. 37, вып. 4. - С. 372-377.

Долгих, В.В. Особенности углеводного и энергетического обмена микроспоридий *Nosema grylli* и их патогенного воздействия на организм насекомого-хозяина: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 / Долгих Вячеслав Васильевич. - СПб., 1997. - 143 с.

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.

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. - 2010б. - N 1. - С. 48-51.

Долгих, В.В. Сравнительное изучение влияния микроспоридии *Nosema grylli* и кокцидии *Adelina* sp. на развитие яичников и активность трех дегидрогеназ в жировом теле самок сверчков *Gryllus bimaculatus* / В.В. Долгих, М.В. Григорьев, Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. - 1996. - Т. 30, вып. 1. - С. 70-75.

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.

Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. - М.: Мир, 1991. - 544 с.

Ефименко, Т.М. Биологическое обоснование применения микроспоридий против совок самостоятельно и совместно с бактериальными препаратами: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11 / Ефименко Татьяна Михайловна. - Л., 1989. - 186 с.

Исси, И.В. Эволюция и филогения микроспоридий / И.В. Исси // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. - 1978. - Т. 78. - С. 30-43.

Исси, И.В. Микроспоридии как тип паразитических простейших / И.В. Исси // Протозоология. - 1986. - Вып. 10. - С. 6-137.

Исси, И.В. Микроспориозы насекомых фауны СССР. Перспективы использования микроспоридий в защите растений: дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.11 / Исси Ирма Викторовна. - Л., 1984. - 285 с.

Князев, А.Н. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus*, 1985 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания / А.Н. Князев // Энтомол. обозр. - 1985. - Т. 64, вып. 1. - С. 58-73.

Кудрявцева Г.В. Пентозофосфатный путь (ПФП) и его взаимосвязь с метаболизмом нуклеиновых кислот / Г.В. Кудрявцева // Успехи современной биологии. - 1978. - Т. 85, вып. 1. - С. 3-17.

Ленинджер, А. Биохимия, молекулярные основы структуры и функции клетки / А. Ленинджер. - М.: Мир, 1974. - 957 с.

Мак-Лафлин, Р.Э. Использование простейших в микробиологической борьбе с насекомыми / Р.Э. Мак-Лафлин // Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами. - М.: Колос, 1976. - 584 с.

Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. - М.: Мир, 1984. - 478 с.

Метспалу, Л.Р., Хийесаар К.Р. Влияние микроспоридиоза на физиологическое состояние покоя насекомых / Л.Р. Метспалу, К.Р. Хийесаар // Сб. Паразито-хозяйные отношения. - Л.: Наука, 1984. - С. 114-128.

Пушкарь, Е.Н. Влияние микроспоридий на линьку и обменные процессы у личинок мошек / Е.Н. Пушкарь // Современные проблемы протозоологии: Материалы III съезда ВОПР. - Вильнюс, 1982. - С. 298.

Северин, С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин и др. - М.: Изд-во МГУ, 1989. - 512 с.

Селезнев, К.В. Очистка различных стадий жизненного цикла микроспоридии *Nosema grylli* sp. n. из сверчков *Gryllus bimaculatus* центрифугированием в градиенте плотности Перколла / К.В. Селезнев, И.В. Исси, В.В. Долгих, Ю.Я. Соколова, Г.Б. Белостоцкая, О.А. Антонова // Паразитология. - 1994. - Т. 28, вып. 4. - С. 298-302.

Селезнев, К.В., Антонова О.А., Исси И.В. Микроспоридиоз сверчков *Gryllus bimaculatus* (Gryllidae), вызванный микроспоридией *Nosema grylli* (Nosematidae) / К.В. Селезнев, О.А. Антонова, И.В. Исси // Паразитология. - 1996. - Т. 30, вып. 3. - С. 250-262.

Соколова, Ю.Я. Ультраструктурные изменения в клетках чешуекрылых при микроспоридиозе и их роль в оценке патогенных форм: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 / Соколова Юлия Яновна. - Л., 1990. - 265 с.

Соколова, Ю.Я. Микроспоридия *Nosema grylli* n.sp. из сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, К.В. Селезнев, В.В. Долгих, И.В. Исси // Паразитология. - 1994. - Т. 28, вып. 6. - С. 488-493.

Сопрунов, Ф.Ф. Молекулярные основы паразитизма / Ф.Ф. Сопрунов. - М.: Наука, 1987. - 224 с.

Тыщенко, В.П. Основы физиологии насекомых. Ч.1 / В.П. Тыщенко. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1976. - 362 с.

Хованских, А.Е. Биохимия кокцидий и кокцидиозов / А.Е. Хованских. - Л.: Наука, 1984. - 192 с.

Четкарлова, Е.М. Физиологическая реакция некоторых чешуекрылых на заражение микроспоридиями: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.09 / Четкарлова Елена Методиевна. - Киев, 1979. - 20 с.

Abrahamsen, M.S. Complete genome sequence of the apicomplexan *Cryptosporidium parvum* / M.S. Abrahamsen, T.J. Templeton, S. Enomoto, J.E. Abrahante, G. Zhu, C.A. Lancto, M. Deng, C. Liu, G. Widmer, S. Tzipori, G.A. Buck, P. Xu, A.T. Bankier, P.H. Dear, B.A. Konfortov, H.F. Spriggs, L. Iyer, V. Anantharaman, L. Aravind, V. Kapur // Science. - 2004. - V. 304. - P. 441-445.

Akao, S. Localization of lactate, malate and succinate dehydrogenases in *Toxoplasma gondii* / S. Akao // Jap. J. Parasitol. - 1971. - V. 20, N. 5. - P. 379-385.

Akiyoshi, D.E. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi* / D.E. Akiyoshi, H.G. Morrison, S. Lei, X. Feng, Q. Zhang, N. Corradi, H. Mayanja, J.K. Tumwine, P.J. Keeling, L.M. Weiss, and S. Tzipori // PLoS Pathog. - 2009. - V. 5. - P. e1000261.

Anantharaman, V. Adhesion molecules and other secreted host-interaction determinants in Apicomplexa: insights from comparative genomics / V. Anantharaman, L.M. Iyer, S. Balaji, L. Aravind // Int. Rev. Cytol. - 2007. - V. 262. - P. 1-74.

Arrese, E.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation / E.L. Arrese, J.L. Soulages // Annu Rev Entomol. - 2010. - V. 55. - P. 207-225.

Bannykh, S.I. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface / S.I. Bannykh, W.E. Balch // J. Cell. Biol. - 1997. - V. 138, N. 1. - P. 1-4.

Bannykh, S.I. The organization of endoplasmic reticulum export complexes / S.I. Bannykh, T. Rowe, W.E. Balch // J. Cell Biol. - 1996. - V. 135, N. 1. - P. 19-35.

Becker, B. Anterograde transport of algal scales through the Golgi complex is not mediated by vesicles / B. Becker, B. Bolinger, M. Melkonian // Trends Cell. Biol. - 1995. - V. 5. - P. 305-307.

Beesley, J.E. The use of ultrathin cryosections for localization of influenza virus antigens in infected vero cell cultures / J.E. Beesley, D.A. Campbell // *Histochemistry*. - 1984. - V. 80, N. 5. - P. 497-501.

Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular 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. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, Y.Y. Sokolova, and A.A. Mironov // *J. Cell Sci.* - 2007. - V. 120. - P. 1288-1298.

Beznoussenko, G.V. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex / G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov // *Anat. Rec.* - 2002 - V. 268. - P. 226-238.

Bohne, W. Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi* / W. Bohne, D.J. Ferguson, K. Kohler, U. Gross // *Infect. Immunol.* - 2000. - V. 68, N. 4. - P. 2268-2275.

Bonfanti, L. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation / L. Bonfanti, A. Mironov Jr., O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, A. Mironov, A. Luini // *Cell* - 1998. - V. 95. - P. 993-1003.

Bowman, I.B.R., Grant P.T., Kermack W.O. The metabolism of *Plasmodium berghei*, the malaria parasite of rodents. I. The preparation of the erythrocytic form of *P. berghei* separated from the host cell / I.B.R. Bowman, P.T. Grant, W.O. Kermack // *Exp. Parasitol.* - 1960. - V. 9. - P. 131-136.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* - 1976. - V. 72. - P. 248-254.

Burri, L. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system / L. Burri, B.A.P. Williams, D. Bursac, T. Lithgow,

P.J. Keeling // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 2006. - V. 103, N. 43. - P. 15916-15920.

Calavati, C. Histopathological and experimental infection studies on *Pleistophora ganapatii* (Calavati) a microsporidian parasite of *Odontotermes horni* (Desn.) / C. Calavati, C.C. Narasimhamurti // Acta Protozool. - 1982. - V. 21. - P. 257-265.

Cali, A. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia / A. Cali, P.M. Takvorian // The Microsporidia and Microsporidiosis / M.Wittner, L.M. Weiss Eds. - Washington, D.C.: ASM Press, 1999. - P. 85-128.

Campbell, S.E. The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions / S.E. Campbell, T.A. Williams, A. Yousuf, D.M. Soanes, K.H. Paszkiewicz, B.A. Williams // PLoS Genet. - 2013. - V. 9. - P. e1003676.

Canning, E.U. An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control of pest / E.U. Canning // Parasitology. - 1982. - V. 84, N. 4. - P. 119-149.

Canning, E.U. A new microsporidian, *Nosema locustae* n. sp., from the fat body of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* R. & F. / E. U. Canning // Parasitology. - 1953. - V. 43, N. 3-4. - P. 287-290.

Canning, E.U. Protozoan parasites as agents for biological control of plant-parasitic nematodes / E.U. Canning // Nematologica. - 1973. - V. 19. - P. 342-348.

Canning, E.U. The pathogenicity of *Nosema locustae*, Canning / E.U. Canning // J. Insect. Pathol. - 1962. - V. 4. - P. 248-256.

Canning, E.U., The ultrastructure of three microsporidia from winter moth *Operophtera brumata* (L.) and the establishment of a new genus *Cystosporogenes* n.gen. for *Pleistophora operophterae* (Canning) / E.U. Canning, J.R. Barker, J.P. Nicholas, A.M. Page // System. Parasitol. - 1985. - V. 7. - P. 213-225.

Carmen, J. C. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites / J.C. Carmen, A.P. Sinai // *Molecular Microbiol.* - 2007. - V. 64, N. 4. - P. 904-916.

Cole, N.B. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites / N.B. Cole, N. Sciaky, A. Marotta, J. Song, J. Lippincott-Schwartz // *Mol. Biol. Cell.* - 1996. - V. 7, N. 4. - P. 631-650.

Corliss, J. An interim utilitarian ("User-friendly") hierarchical classification and characterization of the Protists / J. Corliss // *Acta Protozoologica.* - 1994. - Vol. 33. - P. 1-51.

Cornillot, E. Comparative analysis of sequences encoding ABC systems in the genome of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / E. Cornillot, G. Metenier, C.P. Vivares, E. Dassa // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2002. - V. 210, N. 1. - P. 39-47.

Cornman, R. S. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees / R. S. Cornman, Y.P. Chen, M.C. Schatz, C. Street, Y. Zhao, B. Desany, M. Egholm, S. Hutchison, J. S. Pettis, W.I. Lipkin, and J.D. Evans // *PLoS Pathog.* - 2009. - V. 5. - P. e1000466.

Corradi, N. , Haag KL, Pombert JF, Ebert D, Keeling PJ. Draft genome sequence of the Daphnia pathogen *Octospora bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions / N. Corradi, K.L. Haag, J.F. Pombert, D. Ebert, P.J. Keeling // *Genome Biol.* - 2009. - V. 10 - P. R106.

Corradi, N. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* / N. Corradi , J.F. Pombert , L. Farinelli, E.S. Didier , P.J. Keeling // *Nat. Commun.* - 2010. - V. 1. - P. 77.

Coyle, C. Polyamine metabolism as a therapeutic target for Microsporidia / C. Coyle, C.J. Bacchi, N. Yarlett, H.B. Tanowitz, M. Wittner, L.M. Weiss // J. Eukaryot. Microbiol. - 1996. - V. 43, N. 5. - P. 96S.

Cunningham, D.A. Host immunity modulates transcriptional changes in a multigene family (*yir*) of rodent malaria / D.A. Cunningham, W. Jarra, S. Koernig, J. Fonager, D. Fernandez-Reyes, J.E. Blythe, C. Waller, P.R. Preiser, J. Langhorne // Mol. Microbiol. - 2005. - V. 58, N. 3. - P. 636-647.

Cuomo, C.A. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth / C.A. Cuomo, C.A. Desjardins, M.A. Bakowski, J. Goldberg, A.T. Ma, J.J. Becnel, E.S. Didier, L. Fan, D.I. Heiman, J.Z. Levin, S. Young, Q. Zeng, E.R. Troemel // Genome Res. - 2012. - V. 22. - P. 2478-2488.

Curgy, J.J. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in microsporidia, eukaryotic organisms / J.J. Curgy, J. Vavra, C. Vivares // Biol. Cell. - 1990. - V. 38. - P. 49-52.

Dangl, J.L., Plant pathogens and integrated defence responses to infection / J.L. Dangl, J.D. Jones // Nature. - 2001. - V. 411. - P. 826-833.

Darwish, A. *Vairimorpha necatrix* in adipose cells of *Trichoplusia ni* / A. Darwish, E. Weidner, J. Fuxa // J. Protozool. - 1989. - V. 36, N. 3. - P. 308-311.

De Pablos, L.M. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity / L.M. De Pablos, A. Osuna // Infect. Immun. - V. 80, N. 7. - P. 2258-2264.

del Aguila, C. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells / C. del Aguila, F. Izquierdo, A.G. Granja, C. Hurtado, S. Fenoy, M. Fresno, Y. Revilla // Int. J. Parasitol. - 2006. - V. 36. - P. 869-876.

Delbac, F. Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of *ptp1* and *ptp2* genes in three *Encephalitozoon* species / F. Delbac, I. Peuvel, G. Metenier, E. Peyretailade, C.P. Vivares // Infect. Immun. - 2001. - V. 69, N 2. - P. 1016-1024.

Delbac, F. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi* / F. Delbac, P. Peyret, G. Metenier, D. David, A. Danchin, C.P. Vivares // Mol. Microbiol. - 1998. - V. 29. - P. 825-834.

Dellibovi-Ragheb, T.A. Parasites FeS Up: Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Eukaryotic Pathogens / T.A. Dellibovi-Ragheb, J. E. Gisselberg, S.T. Prigge // PLoS Pathog. - 2013. - V. 9. P. e1003227.

Dia, N. InterB multigenic family, a gene repertoire associated with subterminal chromosome regions of *Encephalitozoon cuniculi* and conserved in several human-infecting microsporidian species / N. Dia, L. Lavie, G. Metenier, B.S. Toguebaye, C.P. Vivares, E. Cornillot // Curr. Genet. - 2007. - V. 51, N. 3. P. 171-186.

Diaz, M. Changes in chromosomes induced by microorganism infection / M. Diaz, C. Pavan // Proc. Nation. Acad. Sci. Washington. - 1965. - V.54. - P.1321-1327.

Diaz, M. Effects of a virus and a microsporidian infections in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angelae* (Nonato et Pavan, 1951) / M. Diaz, C. Pavan, R. Basile // Rev. Brasil. Biol. - 1969. - V. 29. - P. 191-206.

Dolgikh, V., Trezeguet V., Lauquin G. Energy metabolism of microsporidia: do eukaryotic parasites use the plastidic-bacterial transporter to import host cell ATP? / V. Dolgikh, V. Trezeguet, G. Lauquin // Proc. CRDF Workshop "Cryptosporidiosis and Microsporidiosis as HIV/AIDS Co-Related Infections" (Saint Petersburg, Russia, 7-9 July, 2004). - Saint Petersburg, 2004. - C. 17.

Dolgikh, V.V. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian *Nosema grylli* / V.V. Dolgikh, J.J. Sokolova, I.V. Issi // J. Euk. Microbiol. - 1997. - V. 44, N. 3. - P. 246-249.

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

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.

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.

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.

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. - P. 324-329.

Durfort, M. Ultrastructura of merontes and spores of *Unikaryon mytilicolae* (Microspora, Unikaryonidae), hyperparasite of the Copepoda *Mytilicola intestinalis* / M. Durfort, L.Vallinitjana // Rev. Iberica Parasitol. - 1982. - V. 42, N. 2. - P. 143-160.

Dvornik, V.Y. Inhibition of acid phosphatase in the black fly immature larvae caused by microsporidia *Amblyospora* / V.Y. Dvornik, S.A. Ovchinnikov // Eur. J. Protistol. - 1992. - V. 28, N. 3. - P. 336-337.

Eis, C. Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune* / C. Eis, B. Nidetzky // Biochem. J. - 1999. - V. 341. - P. 385-393.

Fairlamb, A.H. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome / A.H. Fairlamb, F.R. Opperdoes //

Carbohydrate metabolism in cultured cells / M.J. Morgan Ed. - New York: Plenum Publishing Corporation, 1986. - P.183-224.

Farquhar, M.G. The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage / M.G. Farquhar, G.E. Palade // J. Cell. Biol. - 1981. - V. 91. - P. 77-103.

Fast, N.M. Alpha and beta subunits of pyruvate dehydrogenase E1 from the microsporidian *Nosema locustae*: mitochondrion-derived carbon metabolism in microsporidia / N.M. Fast, P.J. Keeling // Mol. Biochem. Parasitol. - 2001. - V. 117, N. 2. - P. 201-209.

Fast, N.M. Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution / N.M. Fast, J.S. Law, B.A. Williams, P.J. Keeling // Eukaryot. Cell. - 2003. - V. 2, N. 5. - P. 1069-1075.

Feinberg, A.P. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity / A.P. Feinberg, B. Vogelstein // Anal. Biochem. - 1983. - V. 132, N. 1. - P. 6-13.

Fischer, W. M. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia / W.M. Fischer, J.D. Palmer // Mol. Phylogenet. Evol. - 2005. - V. 36. - P. 606-622.

Frandsen, J.C. *Eimeria stiedae*: cytochemical identification of acid alkaline phosphatases, carboxylic ester hydrolases and succinate, lactate and glucose-6-phosphate dehydrogenases in endogenous stages from rabbit tissues / J.C. Frandsen // Exp. Parasitol. - 1968. - V. 23. - P. 398-411.

Frye, J.B. *Perezia pyraustae*: its influence on overwintering survival and spring pupation in corn borer populations / Frye J.B., Olson L.C. // N. D. Farm. Res. - 1974. - V. 32, N. 1. - P. 18-20.

Gilbert, L.A. *Toxoplasma gondii* targets a protein phosphatase 2C to the nuclei of infected host cells / L.A. Gilbert, S. Ravindran, J.M. Turetzky, J.C. Boothroyd, P.J. Bradley // Eukaryot. Cell. - 2007. - V. 6, N. 1. - P. 73-83.

Glick, B.S. A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack / B.S. Glick, T. Elston, G. Oster // FEBS Lett. - 1997. - V. 414, N. 2. - P. 177-181.

Goldberg, A.V. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins / A.V. Goldberg, S. Molik, A.D. Tsaousis, K. Neumann, G. Kuhnke, F. Delbac, C.P. Vivares, R.P. Hirt, R. Lill, T.M. Embley // Nature. - 2008. - Vol. 452. - P. 624-628.

Greub, G. History of the ADP/ATP-translocase-encoding gene, a parasitism gene transferred from a Chlamydiales ancestor to plants 1 billion years ago / G. Greub, D. Raoult // Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - V. 69. - P. 5530-5535.

Gutteridge, W.E. Biochemical aspects of the biology of *Trypanosoma cruzi* / W.E. Gutteridge, G.W. Rogerson // Biology of the Kinetoplastida. Vol.2 / W.H.R. Lumsden, D.A.Evans Eds. - New York: Academic Press, 1979. - P. 619-652.

Hacker, C. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC / C. Hacker, M. Howell, D. Bhella, J. Lucocq // Cell Microbiol. - 2014. - V. 16, N. 4. - P. 565-579.

Halle, M. The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation / M. Halle, M.A. Gomez, M. Stuble, H. Shimizu, W.R. McMaster, M. Olivier, M.L. Tremblay // J. Biol. Chem. - 2009. - V. 284, N. 11. - P. 6893-6908.

Hart, D.T. A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes / D.T. Hart, O. Misset, S. Edwards, F.R. Opperdoes // Mol. Biochem. Parasitol. - 1984. - V.12, N. 1. - P. 25-35.

Hayman, J.R. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* / J.R. Hayman, S.F.

Hayes, J. Amon, T.E. Nash // *Infect. Immun.* - 2001. - V. 69, N. 11. - P. 7057-7066.

Hazard, E.I. Identification of Microsporidia / E.I. Hazard, E.A. Ellis, D.J. Joslyn // *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1978* / H.D. Burges Ed. - London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 1981. - P. 163-182.

Heinz, E. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution / E. Heinz, T.A. Williams, S. Nakjang, C.J. Noël, D.C. Swan, A.V. Goldberg, S.R. Harris, T. Weinmaier, S. Markert, D. Becher, J. Bernhardt, T. Dagan, C. Hacker, J.M. Lucocq, T. Schweder, T. Rattei, N. Hall, R.P. Hirt, T.M. Embley // *PLoS Pathog.* - 2012. - V. 8. - P. e1002979.

Heussler, V.T. Hijacking of host cell IKK signalosomes by the transforming parasite *Theileria* / V.T. Heussler, S. Rottenberg, R. Schwab, P. Kuenzi, P.C. Fernandez, S. McKellar, B. Shiels, Z.J. Chen, K. Orth, D. Wallach, D.A. Dobbelaere // *Science.* - 2002. - V. 298. - P. 1033-1036.

Hirschberg, K. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells / K. Hirschberg, C. M. Miller, J. Ellenberg, J. F. Presley E.D. Siggia, R.D. Phair, J. Lippincott-Schwartz // *J. Cell. Biol.* - 1998. - V. 143, N. 6. - P. 1485-1503.

Hjort, K. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes / K. Hjort, A.V. Goldberg, A.D. Tsoulos, R. P. Hirt, T.M.Embley // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* - 2010. -Vol. 365. - P. 713-727.

Hoyle, J. Localization of human and mouse N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) gene: a two-domain member of the AAA family that is involved in membrane fusion / J. Hoyle, J.P. Phelan, N. Bermingham, E.M. Fisher // *Mamm. Genome.* - 1996. - V. 7, N. 11. - P. 850-852.

Hutten, S. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond / S. Hutten, R.H. Kehlenbach // *Trends. Cell. Biol.* - 2007. - Vol. 17. - P. 193-201.

Janssen, M. J. Photolabeling identifies an interaction between phosphatidylcholine and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gut2p) in yeast mitochondria / M.J. Janssen, , F. van Voorst, G.E. Ploeger, P.M. Larsen, M.R. Larsen, A.I. de Kroon, B. de Kruijff // *Biochemistry*. - 2002. - V. 41, N. 18. - P. 5702-5711.

Jarroll, E.L. Biochemistry and metabolism of *Giardia* / E.L. Jarroll, P. Manning, A. Berrada, D. Hare, D.G. Lindmark // *J. Protozool.* - 1989. - V. 36. - P. 190-197.

Jay, G.D. Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes / G.D. Jay, D.J. Culp, M.R. Jahnke // *Anal. Biochem.* - 1990. - V. 185, N. 2. - P. 324-330.

Jurand, A. Changes in the ultrastructure of salivary gland cytoplasm in *Sciara ocellaris* (Comstock, 1882) due to microsporidian infection / A. Jurand, L.C.G. Simoes, C. Pavan // *J. Insect. Physiol.* - 1967. - V. 13. - P. 795-803.

Kabre, G. Effects of the microsporidian *Thelohania contejeani* on the metabolism of total muscular and hepatopancreatic phospholipids in the crayfish *Austropotamobius pallipes*. Le Reboulet, 1858 / G. Kabre // *Ann. Sci. Natur. Zool. Biol. Anim.* - 1992. - V. 13. - P. 97-102.

Kampfenkel, K. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants / K. Kampfenkel, T. Mohlmann, O. Batz, M. Van Montagu, D. Inze, H.E. Neuhaus // *FEBS Letters*. - 1995. - V. 374, N. 3. - P. 351-355.

Katinka, M.D. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi* / M.D. Katinka, S. Duprat, E. Cornillot, G. Metenier, F. Thomarat, G. Prensier, V. Barbe, E. Peyretaillade, P. Brottier, P. Wincker, F. Delbac, H. El Alaoui, P. Peyret, W. Saurin, M. Gouy, J. Weissenbach, C. P. Vivares // *Nature*. - 2001. - V. 414. - P. 450-453.

Kawarabata, T. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of strains of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae) / T. Kawarabata, S. Hayasaka // J. Invertebr. Pathol. - 1987. - V. 50, N. 2. - P. 118-123.

Kaya, H.K. Persistense of spores of *Pleistophora schubergi* (Cnidospora: Microsporida) in the field and their application in microbial control / H.K. Kaya // J. Invertebr. Pathol. - 1975. - V. 26. - P. 329-332.

Kedzierski, L. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions / L. Kedzierski, J. Montgomery, J. Curtis, E. Handman // Arch. Immunol. Ther. Exp. - 2004. - V. 52, N. 2. - P. 104-112.

Keeling, P.J. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism / P.J. Keeling, N. Corradi, H. Morrison, K.L. Haag, D. Ebert, L.M. Weiss, D.E. Akiyoshi, S. Tzipori // Genome. Biol. Evol. - 2010. - V. 2. - P. 304-309.

Kempa-Tomm, S. 1990. Vitellogenins and vitellins of the mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*: isolation, characterization and quantification / S. Kempa-Tomm, K. H. Hoffmann, F. Engelmann // Physiol. Entomol. - 1990. - V. 15, N. 2. - P. 167-178.

Keohane, E.M. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube / E.M. Keohane, L.M.Weiss // The Microsporidia and Microsporidiosis / M.Wittner, L.M. Weiss Eds. - Washington, D.C.: ASM Press, 1999. - P. 196-224.

Kim, J.H. Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis* / J.H. Kim, K. Ogawa, H. Wakabayashi // Dis. Aquat. Organ. - 1999. - V. 39. - P. 59-63.

Kita, K. Parasite Mitochondria as a Target for Chemotherapy / K. Kita, H. Miyadera, F. Saruta, H. Miyoshi // J. Health. Science. - 2001. - V. 47. - P. 219-239.

Koonin, E.V. Horizontal gene transfer in Prokaryotes: quantification and classification / E.V. Koonin, K.S. Makarova, L. Aravind // Annu. Rev. Microbiol. - 2001. - V. 55. P. 709-742.

Kornmann, B. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen / B. Kornmann, E. Currie, S.R. Collins, M. Schuldiner, J. Nunnari, J.S. Weissman, P. Walter // Science. - 2009. - V. 325. - P. 477-481.

Kornmann, B. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology / B. Kornmann, P. Walter // J. Cell. Sci. - 2010. - V. 123. - P. 1389-1393.

Kucera, M. Properties of acid phosphatase formed in *Galleria mellonella* larvae during microsporidian disease (Lepidoptera) / M. Kucera // Acta Entomol. Bohemoslovaca. - 1978. - V. 75. - P. 83-89.

Kucera, M. The different course of lactate and glutamate dehydrogenases activity in the larvae of *Barathra brassicae* (Lepidoptera) during microsporidian infection / M. Kucera // Acta. Entomol. Bohemoslovaca. - 1975. - V. 72. - P. 370-373.

Kucera, M. Alanine aminotransferase in the three last larval instars of *Barathra brassicae* infected by *Nosema plodiae* / M. Kucera, J. Weiser // J. Invertebr. Pathol. - 1973. - V. 21. - P. 287-292.

Kucera, M. Alkaline phosphatase in the last larval instar of *Barathra brassicae* (Lepidoptera) infected by *Nosema plodiae* / M. Kucera, J. Weiser // Acta Entomol. Bohemoslovaca. - 1974. - V.71. - P. 289-293.

Kucera, M. Further studies on enzymes of *Barathra brassicae* larvae (Lepidoptera) infected by a microsporidian *Nosema heterosporum* / M. Kucera // Acta. Entomol. Bohemoslovaca. - 1976. - V.73. - P. 367-372.

Kucera, M. Lactate dehydrogenase isoenzymes in the larvae of *Barathra brassicae* and *Galleria mellonella* during microsporidian infection / M. Kucera, J. Weiser // J. Invertebr. Pathol. - 1975. - V. 25. - P. 109-114.

Kurtti, T.J. In vitro developmental biology and spore production in *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae) / T.J. Kurtti, S.E. Ross, Y. Liu, U.G. Munderloh // J. Invertebr. Pathol. - 1994. - V. 63, N. 2. - P. 188-196.

Kweon, H.S. Golgi enzymes are enriched in perforated zones of Golgi cisternae but are depleted in COP-I vesicles / H.S. Kweon, G.V. Beznoussenko, M. Micaroni, R.S. Polishchuk, A. Trucco, O. Martella, D. Di Giandomenico, P. Marra, A. Fusella, A. Di Pentima, E.G. Berger, W.J. Geerts, A.J. Koster, K.N. Burger, A. Luini, A.A. Mironov // Mol. Biol. Cell. - 2004. - V. 15, N. 10. - P. 4710-4724.

Ladinsky, M.S. Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell / M.S. Ladinsky, D. N. Mastronarde, J.R. McIntosh, K. E. Howell, L.A. Staehelin // J. Cell. Biol. - 1999. - V. 144, N. 6. - P. 1135-1149.

Ladinsky, M.S. Structure of the Golgi and distribution of reporter molecules at 20 degrees C reveals the complexity of the exit compartments / M.S. Ladinsky, C.C.Wu, S. McIntosh, J.R. McIntosh, K.E. Howell // Mol. Biol. Cell. - 2002. - V. 13, N. 8. - P. 2810-2825.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685.

Lange, C.E. *Paranosema locustae* (Microsporidia) in grasshoppers (Orthoptera: Acridoidea) of Argentina: field host range expanded / C.E. Lange // Biocontrol. Sci. Technol. - 2010. - V. 20. - P. 1047-1054.

Lange, C.E. The host and geographical range of the grasshopper pathogen *Paranosema (Nosema) locustae* revisited / C.E. Lange // J. Orthoptera. Res. - 2005. - V. 14. - P. 137-141.

Lessard, I.A.D. Expression in *Escherichia coli* of genes encoding the E1 $\alpha$  and E1 $\beta$  subunits of the pyruvate dehydrogenase complex of *Bacillus stearothermophilus* and assembly of a functional E1 component ( $\alpha_2\beta_2$ ) *in vitro* / I.A.D. Lessard, R.N. Perham // J. Biol. Chem. - 1994. - V. 269, N. 14. - P. 10378-10383.

Lewis, L.C. Effect of *Perezia pyraustae* on oxygen consumption by the European corn borer, *Ostrinian nubilalis* / L.C. Lewis, J.A. Mutchmor, R.E. Lynch // J. Insect. Physiol. - 1971. - V. 17. - P. 2457-2468.

Lewis, L.C. *Nosema pyrausta*: its biology, history, and potential role in a landscape of transgenic insecticidal crops / L.C. Lewis, D. J. Bruck, J.R. Prasifka, E.S. Raun // Biol. Control. - 2009. - V. 48, N. 3. - P. 223-231.

Lindmark, D.G. Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* / D.G. Lindmark, B.L. Eckenrode, L.A. Halberg, I.D. Dinbergs // J. Protozool. - 1989. - V. 36. - P. 214-216.

Ling, M. A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction / M. Ling, F. Merante, B.H. Robinson // Nucleic. Acids. Res. - 1995. - V. 23, N. 23. - P. 4924-4925.

Linstead, D.J. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis* / D.J. Linstead, S. Bradley // Mol. and Biochem. Parasitol. - 1988. - V. 27. - P. 125-134.

Liu, T.P. Ultrastructural architecture and organization of the spore envelope during development in *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) after freeze-etching / T.P. Liu, D.M. Davies // J. Protozool. - 1973. - V. 20. - P. 622-630.

Liu, T.P. Ultrastructure of the cytoplasm in fat body cells of the black fly *Simulium vittatum* with microsporidian infection / T.P. Liu, D.M. Davies // J. Invertebr. Pathol. - 1972. - V. 19. - P. 208-214.

Lo, H.S. Pyruvate to ethanol pathway in *Entamoeba histolytica* / H.S.Lo, R.E. Reeves // Biochem. J. - 1978. - V. 171. - P. 225-230.

Lussier, M. The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains / M. Lussier, A.M. Sdicu, F. Bussereau, M. Jacquet, H. Bussey // J. Biol. Chem. - 1997. - V. 272, N. 24. - P. 15527-15531.

Marr J. J. Carbohydrate metabolism in *Leishmania* // Biochemistry and Physiology of Protozoa. Vol.3 / S.H. Hutner Ed. - New York: Academic Press, 1980. - P. 313-340.

Martens, S. The interferoninducible GTPases / S. Martens, J.C. Howard // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. - 2006. - V. 22. - P. 559-589.

Martins, R.R. Effects of microsporidia on the striated parietal muscle of *Rhynchosciara angelae* (Diptera: Sciaridae) / R.R. Martins, A.P. Perondini // J. Invertebr. Pathol. - 1977. - V. 30. - P. 422-428.

Mather, M. Studies of the flavin adenine dinucleotide binding region in *Escherichia coli* pyruvate oxidase / M. Mather, L.M. Schopfer, V. Massey, R.B. Gennis // J. Biol. Chem. - 1982. - V. 257, N. 21. - P. 12887-12892.

Matsushima, N. Super-Motifs of Leucine-Rich Repeats (LRRs) Proteins / N. Matsushima, M. Kamiya, N. Suzuki, T. Tanaka // Genome Informatics. - 2000. - V. 11. - P. 343-345.

McIntosh, J. R. Electron microscopy of cells: a new beginning for a new century / J. R. McIntosh // J. Cell Biol. - 2001. - V. 153, N. 6. - P. F25-32.

McLaughlin, J. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba* / J. McLaughlin, S. Aley // J. Protozool. - 1985. - V. 32. - P. 221-240.

Mironov, A. A. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae / A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko, P. Nicoziani, O. Martella, A. Trucco, H.S. Kweon, D. Di Giandomenico, R.S. Polishchuk, A. Fusella, P. Lupetti, E.G. Berger, W.J. Geerts, A.J. Koster, K.N. Burger, A. Luini // J. Cell Biol. - 2001. - V. 155, N. 7. - P. 1225-1238.

Mironov, A. Variation on the intracellular transport theme: maturing cisternae and trafficking tubules / A. Mironov, P. Weidman, A. Luini // J. Cell. Biol. - 1997. - V. 138, N. 3. - P. 481-484.

Mironov, A.A. Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? / A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko, R.S. Polishchuk, A. Trucco // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2005. - V. 1744. - P. 340-350.

Miroux, B. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels / B. Miroux, J.E. Walker // *J. Mol. Biol.* - 1996. - V. 260, N. 3. - P. 289-298.

Mogelsvang, S. Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris* / S. Mogelsvang, N. Gomez-Ospina, J. Soderholm, B.S. Glick, L.A. Staehelin // *Mol. Biol. Cell.* - 2003. - V. 14, N. 6. - P. 2277-2291.

Mogi, T. Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium* / T. Mogi, K. Kita // *Parasitol. Int.* - 2010. - V. 59, N. 3. - P. 305-312.

Molestina, R.E. Host and parasite-derived IKK activities direct distinct temporal phases of NF- $\kappa$ B activation and target gene expression following *Toxoplasma gondii* infection / R.E. Molestina, A.P. Sinai // *J. Cell Sci.* - 2005. - V. 118. - P. 5785-5796.

Monstadt, G.M. Arginine deiminase from *Halobacterium salinarium*. Purification and properties / G.M. Monstadt, A.W. Holldorf // *Biochem. J.* - 1991. - V. 273. - P. 739-745.

Moreno, F. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* / F. Moreno, P. Herrero // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2002. - V. 26. - P. 83-90.

Muller, M. Energy metabolism of protozoa without mitochondria / M. Muller // *Ann. Rev. Microbiol.* - 1988. - V. 42. - P. 465-488.

Nandan, D. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1 / D. Nandan, N.E. Reiner // *Clin. Immunol.* - 2005. - V. 114. - P. 266-277.

Nandan, D. *Leishmania* EF-1 $\alpha$  activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation / D.

Nandan, T. Yi, M. Lopez, C. Lai, N.E. Reiner // J. Biol. Chem. - 2002. - V. 277, N. 51. - P. 50190-50197.

Nardini, M. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing / M. Nardini, B.W. Dijkstra // Curr. Opin. Struct. Biol. - 1999. - V. 9. - P. 732-737.

Nathan, C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / C. Nathan, M.U. Shiloh // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - V. 97 - P. 8841-8848.

Neary, C.L. Nucleocytoplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell / C.L. Neary, J.G. Pastorino // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2010. - V. 394. - P. 1075-1081.

Nett, J.H. Characterization of the *Pichia pastoris* protein-O-mannosyltransferase gene family / J.H. Nett, W.J. Cook, M.T. Chen, R.C. Davidson, P. Bobrowicz, W. Kett, E. Brevnova, T.I. Potgieter, M.T. Mellon, B. Prinz, B.K. Choi, D. Zha, I. Burnina, J.T. Bukowski, M. Du, S. Wildt, S.R. Hamilton // PLoS One. - 2013. - V. 8. - P. e68325.

Nunes, M.C. A novel protein kinase family in *Plasmodium falciparum* is differentially transcribed and secreted to various cellular compartments of the host cell / M.C. Nunes, J.P. Goldring, C. Doerig, A. Scherf // Mol. Microbiol. - 2007. - V. 63, N. 2. - P. 391-403.

Nurnberger, T. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns / T. Nurnberger, F. Brunner // Curr. Opin. Plant Biol. - 2002. - V. 5. - P. 318-324.

Opat, A.S. Trafficking and localisation of resident Golgi glycosylation enzymes / A.S. Opat, C. van Vliet, P.A. Gleeson // Biochimie. - 2001 - V. 83, N. 8. - P. 763-773.

Opperdoes, F.R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in Trypanosomes / F.R. Opperdoes // Ann. Rev. Microbiol. - 1987. - V. 41. - P. 127-151.

Opperdoes, F.R. Localisation of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of cultured trypomastigotes of *Trypanosoma brucei* / F.R. Opperdoes, A. Markos, R.F. Steiger // Mol. Biochem. Parasitol. - 1981. - V. 4, N. 5-6. - P. 291-309.

Orci, L. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack / L. Orci, B.S. Glick, and J.E. Rothman // Cell. - 1986. - V. 46. - P. 171-184.

Orci, L. Anterograde flow of cargo across the golgi stack potentially mediated via bidirectional “percolating” COPI vesicles / L. Orci, M. Ravazzola, A. Volchuk, T. Engel, M. Gmachl, M. Amherdt, A. Perrelet, T.H. Sollner, J.E. Rothman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - V. 97. - P. 10400-10405.

Pan, G. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation / G. Pan, J. Xu, T. Li, Q. Xia, S. Liu, G. Zhang, S. Li, C. Li, H. Liu, L. Yang, T. Liu, X. Zhang, Z. Wu, W. Fan, X. Dang, H. Xiang, M. Tao, Y. Li, J. Hu, Z. Li, L. Lin, J. Luo, L. Geng, L. Wang, M. Long, Y. Wan, N.He, Z. Zhang, C. Lu, P.J. Keeling, J. Wang, Z. Xiang, Z. Zhou // BMC Genomics. - 2013. - V. 14. - P. 186.

Pavan, C. Chromosome changes induced by infections in tissues of *Rhynchosciara angelae* / C. Pavan, R. Basile // Science. - 1966. - V. 151. - P. 1556-1558.

Pelaez, R. Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1) - dependent pathway / R. Pelaez, P. Herrero, F. Moreno // J. Biol. Chem. - 2009. - V. 284, N. 31. - P. 20548-20555.

Perkins, N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function / N.D. Perkins // Nat. Rev. Mol.Cell Biol. - 2007. - V. 8. - P. 49-62.

Petit, T. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* / T. Petit, J.A.

Diderich, A.L. Kruckeberg, C. Gancedo, K. Van Dam // J. Bacteriol. - 2000. - V. 182, N. 23. - P. 6815-6818.

Peuvel, I. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi* / I. Peuvel, P. Peyret, G. Metenier, C.P. Vivares, F. Delbac // Mol. Biochem. Parasitol. - 2002. - V. 122, N. 1. - P. 69-80.

Peuvel-Fanget, I. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall / I. Peuvel-Fanget, V. Polonais, D. Brosseau, C. Texier, L. Kuhn, P. Peyret, C. Vivarès, F. Delbac // Int. J. Parasitol. - 2006. - V. 36, N. 3. - P. 309-318.

Plano, G.V. Identification and initial topological analysis of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase / G.V. Plano, H.H. Winkler // J. Bacteriol. - 1991. - V. 173. - P. 3389-3396.

Polonais, V. Identification of two new polar tube proteins related to polar tube protein 2 in the microsporidian *Antonospora locustae* / V. Polonais, A. Belkorchia, M. Roussel, E. Peyretailade, P. Peyret, M. Diogon, F. Delbac // FEMS Microbiol. Lett. - 2013. - V. 346, N. 1. - P. 36-44.

Polonais, V. Microsporidian polar tube proteins: highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups / V. Polonais, G. Prensier, G. Metenier, C.P. Vivares, F. Delbac // Fungal Genet. Biol. - 2005. - V. 42. - P. 791-803.

Preuss, D. Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy / D. Preuss, J. Mulholland, A. Franzusoff, N. Segev, D. Botstein // Mol. Biol. Cell. - 1992. - V. 3. - P. 789-803.

Rabouille, C. Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides / C. Rabouille, N. Hui, F. Hunte, R. Kieckbusch, E.G. Berger, G. Warren, T. Nilsson // J. Cell Sci. - 1995. - V. 108. - P. 1617-1627.

Rambourg, A. Modulation of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae* Sec7 mutants as seen by three-dimensional electron microscopy / A. Rambourg, Y. Clermont, F. Képès // Anat. Rec. - 1993. - V. 237. - P. 441-452.

Rambourg, A. Three dimensional configuration of the secretory pathway and segregation of secretion granules in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / A. Rambourg, C.L. Jackson, Y. Clermont // J. Cell. Sci. - 2001. - V. 114. - P. 2231-2239.

Ravindran, S. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites / S. Ravindran, J.C. Boothroyd // Traffic. - 2008. - V. 9. - P. 647-656.

Reeves, R.E. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase / R.E. Reeves // J. Biol. Chem. - 1968. - V. 234. - P. 3202-3204.

Reeves, R.E. Pyrophosphate: D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase / R.E. Reeves, D.J. South, H.J. Blytt, L.G. Warren // J. Biol. Chem. - 1974. - V. 249. - P. 7737-7741.

Regoes, A. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion / A.Regoes, D. Zourmpanou, G. León-Avila, M. van der Giezen, J. Tovar, A.B. Hehl. // J. Biol. Chem. - 2005. - V. 280, N. 34. - P. 30557-30563.

Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell Biol. - 1963. - V. 17. - P. 208-212.

Roberts, P.A. Response of *Rynchosciara* chromosomes to microsporidian infection: increased polyteny and generalized puffing / P.A. Roberts, R.F. Kimball, C.C. Pavan // Exp. Cell Res. - 1967. - V. 47. - P. 408-422.

Saeij, J.P. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue / J.P. Saeij, S. Coller, J.P. Boyle, M.E. Jerome, M.W. White, J.C. Boothroyd // Nature. - 2007. - V. 445. - P. 324-327.

Sato, T. Molecular cloning and characterization of a novel human beta1,3-glucosyltransferase, which is localized at the endoplasmic reticulum and

glucosylates O-linked fucosylglycan on thrombospondin type 1 repeat domain / T. Sato, M. Sato, K. Kiyohara, M. Sogabe, T. Shikanai, N. Kikuchi, A. Togayachi, H. Ishida, H. Ito, A. Kameyama, M. Gotoh, H. Narimatsu // *Glycobiology*. - 2006. - V. 16. - P. 1194-1206.

Scanlon, M. Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon* microsporidia / M. Scanlon, G.J. Leitch, G.S. Visvesvara, A.P. Shaw // *J. Eukaryot. Microbiol.* - 2004. - V. 51, N. 1. - P. 81-87.

Scanlon, M. Susceptibility to apoptosis is reduced in the Microsporidia-infected host cell / M. Scanlon, G.J. Leitch, A.P. Shaw, H. Moura, G.S. Visvesvara // *J. Eukaryot. Microbiol.* - 1999. - V. 46, N. 5. - P. 34S-35S.

Schmuckli-Maurer, J. Expression analysis of the *Theileria parva* subtelomere-encoded variable secreted protein gene family / J. Schmuckli-Maurer, C. Casanova, S. Schmied, S. Affentranger, I. Parvanova, S. Kang'a, V. Nene, F. Katzer, D. McKeever, J. Muller, R. Bishop, A. Pain, D.A.E. Dobbelaere // *PLoS One*. - 2009. - V. 4. - P. e4839.

Seleznev, K. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradient for biochemical research / K. Seleznev, I. Issi, V. Dolgikh, G. Belostotskaya, O. Antonova, J. Sokolova // *J. Euk. Microbiol.* - 1995. - V. 42, N. 3. - P. 288-292.

Seligman, A.M. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide--fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH) / A.M. Seligman, H.L. Wasserkrug, J.S. Hanker // *J. Cell Biol.* - 1966 - V. 30. - P. 424-432.

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. - P. e93585.

Sherman, I.W. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites) / I.W. Sherman // Microbiol. Rev. - 1979. - V. 43. - P. 453-495.

Shibuya, N. Binding properties of a mannose-specific lectin from the Snowdrop (*Galanthus nivalis*) Bulb. / N. Shibuya, I.J. Goldstein, E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans // J. Biol. Chem. - 1988. - V. 263. - P. 728-734.

Shiels, B.R. A *Theileria annulata* DNA binding protein localized to the host cell nucleus alters the phenotype of a bovine macrophage cell line / B.R. Shiels, S. McKellar, F. Katzer, K. Lyons, J. Kinnaird, C. Ward, J.M. Wastling, D. Swan // Eukaryot. Cell. - 2004. - V. 3, N. 2. - P. 495-505.

Shirley, M.W. Enzyme variations in *Eimeria* species of the chicken / M.W. Shirley // Parasitology. - 1975. - V. 71. - P. 369-376.

Sibley, L.D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites / L.D. Sibley // Immunol. Rev. - 2011. - V. 240. - P. 72-91.

Sinai, A.P. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane / A.P. Sinai, K.A. Joiner // J. Cell Biol. - 2001. - V. 154, N. 1. - P. 95-108.

Slamovits, C.H. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites / C.H. Slamovits, N.M. Fast, J.S. Law, P.J. Keeling // Curr. Biol. - 2004. - V. 14. - P. 891-896.

Slot, J.W. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry / J.W. Slot, H.J. Geuze // Eur. J. Cell Biol. - 1985. - V. 38, N. 1. - P. 87-93.

Slot, J.W. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat / J.W. Slot, H.J. Geuze, S. Gigengack, G.E. Lienhard, D.E. James // J. Cell Biol. - 1991. - V. 113. - P. 123-135.

Sokolova, J. Electronmicroscopic and electrophoretic studies of Microsporidian prespore stages, isolated from infected host cells by gradient centrifugation on Percoll / J. Sokolova, K. Selesnjov, V. Dolgikh, I. Issi // J. Euk. Microbiol. - 1994. - V. 41. - P. 62S.

Sokolova, Y.Y. An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange // Acta Protozool. - 2002. - V. 41. - P. 229-237.

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.

Solter, L.F. Control of gypsy moth, *Lymantria dispar*, in North America since 1878 / L.F. Solter, A.E. Hajek // Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods / E.A. Hajek, , T.R. Glare, M. O'Callaghan Eds, - Dordrecht: Springer Science + Business Media B.V., 2009. - P. 181-212.

Solter, L.F. Microsporidian entomopathogens / L.F. Solter, J.J. Becnel, D.H. Oi // Insect Pathology, 2nd ed. / F.E. Vega, H.K. Kaya Eds. - London: Academic Press, 2012. - P. 221-263.

Sprague, V. Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporidia, Nosematidae) with particular reference to its Golgi complex / V. Sprague, S.H. Vernick // J. Protozool. - 1969. - V.16. - P. 264-271.

Stechmann, A. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes / A. Stechmann, K. Hamblin, V. Pérez-Brocal, D. Gaston, G.S. Richmond, M. van der Giezen, C.G. Clark, A.J. Roger // Curr. Biol. - 2008. - V. 18. - P. 580-585.

Steinbuchel, A. Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes / A. Steinbuchel, M. Muller // Mol. Biochem. Parasitol. - 1986. - V. 20, N. 1. - P. 57-65.

Sterner, D.E. Acetylation of histones and transcription-related factors / D.E. Sterner, S.L. Berger // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2000. - V. 64. - P. 435-459.

Swan, D.G. TashHN, a *Theileria annulata* encoded protein transported to the host nucleus displays an association with attenuation of parasite differentiation / D.G. Swan, L. Stadler, E. Okan, M. Hoff, F. Katzer, J. Kinnaird, S. McKellar, B.R. Shiels // Cell Microbiol. - 2003. - V. 5, N. 12. - P. 947-956.

Swan, D.G. Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus / D.G. Swan, R. Stern, S. McKellar, K. Phillips, C.A. Oura, T.I. Karagenc, L. Stadler, B.R. Shiels // J. Cell Sci. - 2001. - V. 114. - P. 2747-2754.

Takahashi, H. Nucleocytoplasmic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription / H. Takahashi, J.M. McCaffery, R.A. Irizarry, J.D. Boeke // Mol. Cell. - 2006. - V. 23, N. 2. P. 207-217.

Takvorian, P. M. The multilayered interlaced network (MIN) in the sporoplasm of the microsporidium *Anncaliia algerae* is derived from Golgi / P.M. Takvorian, K.F. Buttle, D. Mankus, C.A. Mannella, L.M. Weiss, A. Cali // J. Eukaryot. Microbiol. - 2013. - V. 60, N. 2. - P. 166-178.

Tarentino, A.L. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F / A.L. Tarentino, C.M. Gomez, T.H. Plummer // Biochemistry. - 1985. - V. 24. - P. 4665-4671.

Taupin, V. Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing alpha-1,2 linkages / V. Taupin, E. Garenaux, M. Mazet, E. Maes, H. Denise, G. Prensier, C.P. Vivares, Y. Guerardel, G. Metenier // Glycobiology. - 2007. - V. 17. - P. 56-67.

Thompson, A.C. Effect of *Nosema heliothidis* on fatty and amino acid in larvae and pupae of the bollworm, *Heliothis zea* / A.C. Thompson, P.P. Sikorowski // Comp. Bioch. Physiol. - 1979. - V. 63. - P. 325-328.

Tjaden, J. Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy / J. Tjaden, H.H. Winkler, C. Schwöppe, M. Van Der Laan, T. Möhlmann, H.E. Neuhaus // J. Bacteriol. - 1999. - V. 181, N. 4. P. 1196-1202.

Toguebaye, B.S. Etude histopathologique et cytopathologique d'une microsporidose naturelle chez la coccinelle des cucurbitacees d'Afrique, *Henosepilachna elaterii* (Coleoptera, Coccinellidae) / B.S. Toguebaye, B. Marchand // Entomophaga. - 1984. - V. 29. - P.421-429.

Tovar, J. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica* / J. Tovar, A. Fischer, C.G. Clark // Mol. Microbiol. - 1999. - V. 32, N. 5. - P. 1013-1021.

Tsaousis, A.D. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi* / A.D. Tsaousis, E.R.S. Kunji, A.V. Goldberg, J.M. Lucocq, R.P. Hirt, T.M. Embley // Nature. - 2008. - V. 453. - P. 553-556.

Undeen A.H., Frixione E. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores // J. Protozool. 1990. V. 37. - P. 561-567.

Undeen, A.H. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores / A.H. Undeen // J. Theor. Biol. - 1990. - V. 142. - P. 223-235.

Undeen, A.H. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: a quantitative study / A.H. Undeen, R.K. Vander Meer // J. Euk. Microbiol. - 1994. - V. 41, N. 2. - P. 129-132.

Undeen, A.H. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination / A.H. Undeen, R.K. Vander Meer // J. Invertebr. Pathol. - 1999. - V. 73, N. 3. - P. 294-302.

Undeen, A.H. The sugar content and density of living and dead microsporidian (Protozoa; Microspora) spores / A.H. Undeen, L.F. Solter // J. Invertebr. Pathol. - 1996. - V. 67, N. 1. - P. 80-91.

Undeen, A.H. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae) / A.H.

Undeen, L.M. ElGazzar, R.K.Vander Meer, S. Narang // J. Invertebr. Pathol. - 1987. - V. 50, N. 3. - P. 230-237.

Van de Peer, Y. Microsporidia accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi / Y. Van de Peer, A. Ben Ali, A. Meyer // Gene. - 2000. - V. 246, N. 1. - P. 1-8.

Vandermeer, J.W. Some effects of sublethal heat on spores of *Nosema apis* / J.W. Vandermeer, T.A. Gochnauer // J. Invertebr. Pathol. - 1969. - V. 13. - P. 442-446.

Vandermeer, J.W. The association of lipoidal materials with spores of *Nosema apis* / J.W. Vandermeer, T.A. Gochnauer // J. Invertebr. Pathol. - 1971a. - V.17. - P.284-285.

Vandermeer, J.W. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis* / J.W. Vandermeer, T.A. Gochnauer // J. Invertebr. Pathol. - 1971b. - V. 17. - P. 38-41.

Vavra J. 1999. Structure of the microsporidia / J. Vavra, J.I.R. Larsson // The Microsporidia and Microsporidiosis / M.Wittner, L.M. Weiss Eds. - Washington, D.C.: ASM Press, 1999. - P. 7-84.

Vavra, J. "Polar vesicles" of microsporidia are mitochondrial remnants ("mitosomes")? / J. Vavra // Folia Parasitol. - 2005. - V. 52, N. 1-2. - P. 193-195.

Vavra, J. Etude au microscope electronique de la morphologie et du development de quelques microsporidies / J. Vavra // C.R.Acad. Sci. - 1965. - V. 261. - P. 3467-3470.

Vavra, J. Structure of the Microsporidia. Development of the Microsporidia / J. Vavra // Comparative Pathobiology / L.A. Bulla and T.C. Cheng Eds. - New York: Plenum Press, 1976. - P. 1-109.

Vickerman, K. Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes / K. Vickerman // Nature. - 1965. - V. 208. - P. 762-766.

Vivares, C.P. Acides amines de microsporidies parasites de Crustaces Decapodes marins / C.P. Vivares, P.J. Richard, H.J. Ceccaldi // *Biochemical Systematics and Ecology*. - 1980a. - V. 8. - P. 205-209.

Vivares, C.P. Acides gras de trois microsporidies (Protozoa) et de leur hôte *Carcinus mediterraneus* (Crustacea), sain et parasite par *Thelohania maenadis* / C.P. Vivares, B.J. Martin, H.J. Ceccaldi // *Z. Parasitenkd.* - 1980b. - V. 61. - P. 99-107.

Vivares, C.P. Influence d'une microsporidiose sur les acides amines libres de *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884 soumis à diverses salinités et à des valeurs extrêmes de température / C.P. Vivares, J.L. Cuq, J.C. Hubert, J.R. Pierre // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* - 1980c. - V. 43. - P. 207-220.

Vivares, C.P. Physiological and metabolic variations in *Carcinus mediterraneus* (Crustacea: Decapoda) parasitized by *Thelohania maenadis* (Microspora: Microsporida): an ecophysiological approach / C.P. Vivares, J.L. Cuq // *J. Invertebr. Pathol.* - 1981. - V. 37. - P. 38-46.

Vogelstein, B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . - 1979. - V. 76. - P. 615-619.

Vossbrinck, C. R. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations / C.R. Vossbrinck, B.A. Debrunner-Vossbrinck // *Folia Parasitol.* - 2005. - V. 52, N. 1-2. - P. 131-142.

Walker, M.H. 1972. Ultrastructural observations of a microsporidian protozoan parasite in *Libinia dubia* (Decapoda). Early sporozoite development / M.H. Walker, G.W. Hirsch // *Z. Parasitenkd.* - 1972. - V. 39. - P. 17-26.

Wang, C.C. Inhibition of the respiration of *Eimeria tenella* by guinolone coccidiostats / C.C. Wang // *Biochem. Pharmacol.* - 1976. - V. 25. - P. 343-349.

Wang, C.S. Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme / C.S. Wang, J.A. Hartsuck // *Biochim. Biophys. Acta* - 1993. - V. 1166, N. 1. - P. 1-19.

Weber, R. Human microsporidial infections / R. Weber, R.T. Bryan, D.A. Schwartz, R.L. Owen // Clin. Microbiol. Rev. - 1994. - V. 7. - P. 426-461.

Webster, P. The production of cryosection through fixed and cryoprotected biological material and their use in immunocytochemistry / P. Webster // Methods in molecular biology: electron microscopy method and protocol. Vol. 117 / M. A. Nasser Hajibagheri Ed. - Totowa, NJ: Numana Press, 1999. - P. 49-75.

Weidner, E. Some aspects of microsporidian physiology / E. Weidner // Comparative Pathobiology / L.A. Bulla and T.C. Cheng Eds. - New York: Plenum Press, 1976a. - P. 111-126.

Weidner, E. 1982. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge / E. Weidner, W. Byrd // J. Cell Biol. - 1982. - V. 93. - P. 970-975.

Weidner, E. Adenosine triphosphate in the extracellular survival of an intracellular parasite (*Nosema michaelis*, Microsporidia) / E. Weidner, W. Trager // J. Cell Biol. - 1973. - V. 57. - P. 586-591.

Weidner, E. The microsporidian spore invasion tube. The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube / E. Weidner // J. Cell Biol. - 1976b. - V. 71. - P. 23-34.

Weidner, E., Findley A. M., Dolgikh V., Sokolova J. Microsporidian biochemistry and physiology / E. Weidner, A.M. Findley, V. Dolgikh, J. Sokolova // The Microsporidia and Microsporidiosis / M.Wittner, L.M. Weiss Eds. - Washington, D.C.: ASM Press, 1999. - P. 172-195.

Weinbach, E. *Entamoeba histolytica*. I. Aerobic metabolism / E. Weinbach, L.S. Diamond // Exp. Parasitol. - 1974. - V. 35. - P. 232-243.

Williams, B.A. Microsporidian mitochondrial proteins: expression in *Antonosporea locustae* spores and identification of genes coding for two further proteins / B.A. Williams, P.J. Keeling // J. Eukaryot. Microbiol. - 2005. - V. 52, N. 3. - P. 271-276.

Williams, B.A.P. 2008. Distinct localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / B.A.P. Williams, A.Cali, P.M. Takvorian, P.J. Keeling // J. Eukaryot. Microbiol. - 2008. - V. 55, N. 2. - P. 131-133.

Williams, B.A.P. 2010. A broad distribution of the alternative oxidase in microsporidian parasites / B.A.P. Williams, , C. Elliot, L. Burri, Y. Kido, K. Kita, A.L. Moore, P.J. Keeling // PLoS Pathogens. - 2010. - V. 6. - P. e1000761.

Williams, B.A.P. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis* / B.A.P. Williams, R.P. Hirt, J.M. Lucocq, T.M. Embley // Nature. - 2002. - V. 418. - P. 865-869.

Williams, B.A.P. Microsporidian biochemistry and physiology / B.A.P. Williams, V.V. Dolgikh, Y.Y. Sokolova // Microsporidia: Pathogens of Opportunity / L.M. Weiss, J.J. Becnel Eds. - Wiley Blackwell, 2014. - P. 245-260.

Wilson, G.G. Pathogenicity of *Nosema disstriae*, *Pleistophora schubergi* and *Vairimorpha necatrix* to larvae of the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* / G.G. Wilson // Z. Parasitenk. - 1984. - V. 70. - P. 763-767.

Windels, M.B. Effects of *Nosema pyrausta* on pupa and adult stages of european corn borer *Ostrinia nubilalis* / M.B. Windels, H.C. Chiang, B. Furgala // J. Invertebr. Pathol. - 1976. - V. 27. - P. 239-242.

Winkler, H.H. Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system / H.H. Winkler // J. Biol. Chem. - 1976. - V. 251. - P. 389-396.

Wood, P.J. Carbohydrates of *Nosema apis* spores / P.J. Wood, I.R. Siddiqui, J.W. Vandermeer, T.A. Gochnauer // Carbohydr. Res. - 1970. - V. 15. - P. 154-158.

Wu, Z. Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia) / Z. Wu, Y. Li, G. Pan, X. Tan, J. Hu, Z. Zhou, Z. Xiang // Proteomics. - 2008. - V. 8, N. 12. - P. 2447-2461.

Wu, Z. SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore / Z. Wu, Y. Li, G. Pan, Z. Zhou, Z. Xiang // J. Eukaryot. Microbiol. - 2009. - V. 56, N. 2. - P. 113-118.

Xu, P. The genome of *Cryptosporidium hominis* / P. Xu, G. Widmer, Y. Wang, L.S. Ozaki, J.M. Alves, M.G. Serrano, D. Puiu, P. Manque, D. Akiyoshi, A.J Mackey, W.R. Pearson, P.H. Dear, A.T. Bankier, D.L. Peterson, M.S. Abrahamsen, V. Kapur, S. Tzipori, G.A. Buck // Nature. - 2004. - V. 431. - P. 1107-1112.

Xu, Y. Glycosylation of the major polar the protein of *Encephalitozoon hellem*, amicrosporidian parasite that infects humans / Y. Xu, P.M.Takvorian, A. Cali, G. Orr, L.M. Weiss // Infect. Immun. - 2004. - V. 72, N. 11. - P. 6341-6350.

Xu, Y. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi* / Y. Xu, P. Takvorian, A. Cali, F. Wang, H. Zhang, G. Orr, L.M. Weiss // Infect. Immun. - 2006. - V. 74, N. 1. - P. 239-247.

Youssef, N. The fine structure of the developmental stages of the microsporidian *Nosema apis* (Zander) / N. Youssef , D.M. Hammond // Tissue Cell. - 1971. - V. 3. - P. 283-294.