

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Мордвинова Вячеслава Алексеевича
на диссертационную работу Долгих Вячеслава Васильевича
«Биохимические и структурно-функциональные адаптации
энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному
паразитизму», представленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности
03.02.11 - паразитология

Актуальность избранной темы

Микроспоридии — группа простейших, все представители которой являются облигатными внутриклеточными паразитами эукариотических организмов. Высочайшая степень адаптации микроспоридий к внутриклеточному паразитизму позволяет считать эти организмы оптимальной моделью для изучения общих вопросов внутриклеточного паразитизма и механизмов взаимодействия в системе паразит-хозяин.

С практической точки зрения, микроспоридии хорошо известны как возбудители опасных болезней медоносной пчелы, тутового шелкопряда, мидий, промысловых видов рыб, а также оппортунистических инфекций человека. Кроме того, эти паразиты являются важными регуляторами численности в природных популяциях фитофагов-вредителей и других насекомых.

Тем не менее, с точки зрения молекулярной биологии и биохимии микроспоридии остаются малоизученными организмами. Так, до начала представленных в данной диссертационной работе исследований крайне мало было известно о процессах энергетического и углеводного обмена у этих паразитов и их взаимодействия с энергетической системой клетки хозяина. Оставались открытыми и вопросы о возможном вмешательстве микроспоридий в управление физиологическими процессами зараженной клетки, а также о молекулярных механизмах их патогенного воздействия на организм хозяина.

Работа Вячеслава Васильевича нацелена на решение именно этих вопросов, лежащих в основе обширного круга фундаментальных и прикладных проблем, связанных с микроспоридиями. Таким образом, тема представленной диссертации представляется весьма актуальной и востребованной.

Основные результаты выполненной работы, их достоверность и научная новизна

Впечатляет круг задач, которые диссертант поставил перед собой и успешно решил в рамках этой работы. Вячеслав Васильевич изучил особенности энергетического обмена микроспоридий и его перестройку в ходе жизненного цикла, расшифровал молекулярные механизмы, используемые паразитами для эффективной эксплуатации энергетической системы зараженной клетки хозяина. Диссертантом обнаружены уникальные свойства секреторного аппарата микроспоридий и показана возможность целенаправленного воздействия микроспоридий на клетки хозяина с помощью секретируемых белков.

Важным условием, позволившим успешно решить поставленные задачи, следует признать удачный выбор диссертантом объектов исследования – энтомопатогенных микроспоридий *Paranosema grylli* и *Paranosema locustae*, паразитирующих в жировом теле двупятнистого сверчка и перелетной саранчи. Крупные размеры насекомых-хозяев и значительная гипертрофия зараженного жирового тела позволили получить из лабораторной культуры зараженных насекомых достаточное для биохимических исследований количество материала. Существенным подспорьем для выполнения диссертационной работы послужила и возможность использования данных проекта по расшифровке генома *P. locustae*, выполняемого американскими исследователями, для гетерологичной экспрессии различных белков паразита.

Следует отметить, что на основании биохимических данных, полученных еще до расшифровки первого генома микроспоридий,

диссертант впервые сделал вывод о способности этих внутриклеточных паразитов поглощать АТФ клетки хозяина с помощью специфичных белков-переносчиков, сходных с транслоказами внутриклеточных бактерий и пластид растений.

Подтверждающие этот вывод данные позднее были получены французскими исследователями - четыре гена, кодирующие такие белки, действительно были обнаружены в первом расшифрованном геноме микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi*. Однако обнаружение АТФ/АДФ-транслоказ пластидно-бактериального типа у одного вида, имеющего к тому же общего хозяина с хламидиями и риккетсиями, еще не означало, что все микроспоридии располагают такими белками. На следующем этапе работы Вячеславу Васильевичу удалось обнаружить два гомологичных гена в геноме микроспоридии *P. grylli*, филогенетически удаленной от *E. cuniculi*, и подтвердить что наличие таких переносчиков – универсальное свойство группы. Кроме того, он показал транскрипционную активность одного из обнаруженных генов на разных стадиях жизненного цикла паразита. Присутствие АТФ/АДФ-транслоказ пластидно-бактериального типа у различных видов микроспоридий, а также функциональная активность переносчиков позднее подтверждены зарубежными исследователями.

Важный результат был получен Вячеславом Васильевичем при сравнительном анализе содержания метаболических ферментов в спорах и стадиях внутриклеточного развития микроспоридий. Для проведения такого анализа диссертанту пришлось осуществить ПЦР-амплификацию, клонирование и гетерологичную экспрессию в бактериях десяти генов *P. locustae*, наработать соответствующие рекомбинантные белки и получить к ним поликлональные антитела. Проведенные эксперименты впервые показали, что собственный энергетический обмен необходим микроспоридиям только на стадии споры. При развитии внутри зараженной

клетки паразиты выключают свой метаболизм, поглощая готовую АТФ хозяина.

В ходе изучения особенностей энергетического обмена в спорах микроспоридий диссертантом был также получен ряд важных результатов: обоснована роль трегалозы в качестве энергетического резерва, установлена локализация альтернативной дыхательной цепи на внутренней мембране митосом, обнаружена эволюционная релокализация пируватдегидрогеназы микроспоридий и предложена оригинальная схема ее участия в активации спор. Следует отметить, что Вячеслав Васильевич первый обнаружил митосомы в спорах микроспоридий, а также у представителя обширной филогенетической клады II (класс Aquasporidia). С помощью иммунолокализации альтернативной дыхательной цепи в митосомах микроспоридий впервые показано, что несмотря на значительную редукцию, эти органеллы (в отличие от митосом *Entamoeba histolytica* и *Giardia lamblia*) сохраняют свою важную роль в энергетическом обмене паразитов.

В ходе ультраструктурного анализа секреторного аппарата микроспоридии *P. grylli* диссертантом впервые была выявлена его очень интересная особенность - отсутствие изолированных транспортных везикул в клетках паразита и непрерывность тубулярной сети, соединяющей цистерны ЭПР с другими мембранными структурами. Вячеславу Васильевичу удалось доказать, что обнаруженная непрерывная сеть тубул действительно представляет собой комплекс Гольджи микроспоридий. Он показал, что несмотря на отсутствие транспортных везикул, структурные белки спор транспортируются по этой сети и подвергаются гликозилированию. Интересно отметить, что самым гликозилированным белком не только паразита, но и жирового тела хозяина оказался основной белок полярной трубки микроспоридий, а N-гликозилированные белки практически отсутствовали в спорах *P. grylli*. Сопоставление полученных результатов с данными расшифровки генома *E. cuniculi* позволили автору заключить, что утрата ферментов N-связанного гликозилирования мембранных и

секретируемых белков - общее свойство микроспоридий. Позже полученные данные нашли подтверждение в работах зарубежных исследователей.

На заключительном этапе исследования автор попытался ответить на вопрос о возможности воздействия микроспоридий на зараженную клетку хозяина с помощью секретируемых паразитами белков. Для данного исследования Вячеслав Васильевич выбрал несколько белков микроспоридии *P. locustae*, обладающих сигнальным пептидом, ответственным за их секрецию. Гетерологичная экспрессия выбранных белков в *E. coli* и дрожжевых грибах, получение специфичных антител к наработанным в бактериях полипептидам, иммуноблоттинг и иммунофлюоресцентная микроскопия срезов жирового тела зараженной саранчи помогли диссертанту подтвердить факт секреции микроспоридиями функционально разных белков в цитоплазму зараженной клетки. Для представителя обширного семейства альфа/бета-гидролаз и гексокиназы *P. locustae* наблюдалось наиболее высокое содержание в зараженных клетках хозяина. Последний фермент (гексокиназа) оказался одним из самых интересных – он специфично накапливался в ядрах зараженных клеток жирового тела саранчи. Таким образом, диссертант впервые получил данные, указывающие на возможность прямого влияния микроспоридий на транскрипционную активность генов хозяина.

Важно также отметить, что именно споры микроспоридии *P. locustae* послужили основой для создания пока единственного коммерчески успешного биопрепарата для борьбы с насекомыми-фитофагами. Это, в свою очередь, позволило диссертанту поставить и успешно решить дополнительную задачу – попытаться обнаружить биохимические особенности микроспоридий рода *Paranosema*, способные определять эффективность паразитов этой группы в качестве агентов для биоконтроля.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Вячеслава Васильевича построена по необычной для оппонента схеме. Она состоит из введения, главы

«Материалы и методы», глав, содержащих результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Обзор литературы не вынесен отдельно, однако все главы, содержащие результаты собственных исследований, начинаются с раздела «Состояние проблемы к началу исследований».

В целом диссертация изложена на 294 страницах машинописного текста, включает 11 таблиц и 56 рисунков.

Раздел «**Введение**» содержит все необходимые подразделы, написан убедительно, все положения хорошо обоснованы.

Отличительной особенностью диссертации является большое разнообразие методов и методологических подходов, использованных автором (глава «**Материалы и методы**»). Для изучения микроспоридий и их взаимоотношений с зараженной клеткой хозяина диссертант использовал методы определения активности ферментов и содержания различных соединений в микроспоридиях и жировом теле насекомых, выделения ДНК и РНК, Саузерн-гибридизации, ПЦР, ПЦР с обратной транскрипцией, молекулярного клонирования, гетерологичной экспрессии паразитических генов в бактериях *Escherichia coli* и дрожжевых грибах, наработки и выделения рекомбинантных белков, получения и очистки антител, иммунохимии, иммуноэлектронной и иммунофлюоресцентной микроскопии, ультраструктурного и биохимического анализа секреторного аппарата микроспоридий. Все это помогло Вячеславу Васильевичу получить ряд принципиально новых результатов, важных для понимания особенностей адаптации микроспоридий к внутриклеточному паразитизму.

Главы 2 — 5 содержат **результаты собственных исследований**. Данный раздел диссертации хорошо иллюстрирован, рисунки и таблицы понятны и полностью соответствуют полученным результатам.

Заключение суммирует основные результаты, изложенные в предыдущих главах, наиболее важные моменты обсуждения полученных результатов и четко определяет научную значимость выполненной работы.

Выводы сделаны на основании полученных в исследовании данных и соответствуют поставленным задачам. Достоверность результатов и обоснованность выводов диссертации не вызывают сомнений.

Содержание **автореферата** соответствует материалам, представленным в диссертации, и полностью отражает суть проведенного исследования.

Экспериментальные результаты и сделанные на их основе выводы были подробно обсуждены на многочисленных научных конференциях и симпозиумах. По материалам диссертации в отечественных и международных реферируемых научных журналах опубликовано 26 статей и 3 главы международных коллективных монографиях.

Принципиальных **замечаний** по содержанию и оформлению диссертационной работы нет. Тем не менее, считаю необходимым указать на не совсем удачную формулировку 4-го вывода — «Энтомопатогенные микроспоридии приобрели способность управлять физиологическими процессами и молекулярно-генетическими программами зараженной клетки насекомого-хозяина с помощью функционально разнообразных секретлируемых белков». Строго говоря, в работе доказана способность микроспоридий секретировать в цитоплазму зараженной клетки функционально различные белки, **ПОТЕНЦИАЛЬНО** способные участвовать в управлении физиологическими и молекулярно-генетическими процессами насекомого-хозяина. Факт, что гексокиназа, секретлируемая микроспоридиями, накапливается в ядре зараженной клетки еще предстоит связать с конкретными молекулярно-генетическими механизмами взаимодействия <паразит-хозяин>.

Однако, незначительное число неудачных выражений не портит общее впечатление о работе и не может повлиять на ее окончательную оценку.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Оценивая работу в целом, можно заключить, что новизна и научная значимость полученных результатов, обоснованность и фундаментальность сформулированных на их основе положений и выводов не вызывают сомнений. Результаты работы вносят существенный вклад в понимание биохимических и молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих развитие внутриклеточных паразитов, и могут послужить важными ориентирами как при разработке новых подходов к использованию микроспоридий в защите растений от вредных насекомых, так и при создании высокоспецифичных антипаразитарных средств для ветеринарии и медицины. Данные о структурно-функциональных особенностях комплекса Гольджи микроспоридий представляют большой интерес с точки зрения изучения общих вопросов внутриклеточного транспорта. Диссертация написана хорошим литературным языком с четкими и логичными формулировками. Текст хорошо иллюстрирован, весьма информативен и при этом относительно компактен. Выводы и защищаемые положения лаконичны и вполне обоснованы. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

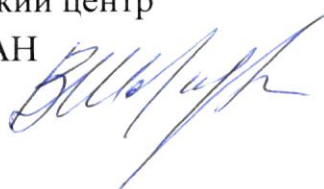
По теме диссертации В.В. Долгих опубликовал 26 статей в реферируемых отечественных и международных научных журналах из списка ВАК РФ, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Диссертант является также соавтором трех авторитетных коллективных монографий, изданных за рубежом.

В заключение следует отметить, что в результате исследований, проведенных на высоком методическом уровне, диссертантом получен обширный экспериментальный материал, который после детального анализа и сопоставления с имеющейся литературой был успешно использован для написания докторской диссертации. Считаю, что по своей актуальности, объему выполненной работы и разнообразию использованных

методологических подходов, новизне и оригинальности полученных результатов, научной значимости сформулированных выводов и защищаемых положений представленная работа соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, критериям пунктов 9-11, 13 и 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Вячеслав Васильевич Долгих, заслуживает искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 - паразитология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией молекулярных
механизмов патологических процессов,
ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН
доктор биологических наук



В.А. Мордвинов

630090, г. Новосибирск
Проспект ак. Лаврентьева, 10
mordvin@bionet.nsc.ru
8-913-909-40-67

Подпись Мордвинова В.А. заверяю

Ученый секретарь

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН
кандидат биологических наук



Г.В. Орлова