

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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.

Диссертационная работа Вячеслава Васильевича Долгих посвящена изучению биохимических, молекулярных и ультраструктурных аспектов адаптации к внутриклеточному паразитизму микроспоридий – группы родственных грибам простейших, являющихся облигатными внутриклеточными паразитами животных и человека. Сама история открытия микроспоридий во время одной из эпизоотий тутового шелкопряда, нанесшей огромный ущерб шелководству Европы в XIX веке, свидетельствует о большом практическом значении группы. Микроспоридии широко известны как возбудители нозематозов пчел, болезней рыб, водных беспозвоночных и оппортунистических инфекций у людей с ослабленным иммунитетом. Наряду с причинением значительного вреда одними видами микроспоридий, другие представители группы являются эффективными регуляторами численности вредных насекомых. Интерес к микроспоридиям со стороны фундаментальной науки обусловлен, в первую очередь, длительной адаптацией этих паразитов к существованию внутри другой эукариотической клетки. Уже первые результаты ультраструктурного анализа спор и клеток микроспоридий с использованием электронного микроскопа показали сложное строение споры и наличие у паразитов таких структур как уникальный аппарат экстрезии полярной трубки. При этом они утратили целый ряд органелл и других структур, свойственных эукариотической клетке. В связи с тем, что дальнейшее изучение микроспоридий требовало применения новых методологических подходов, актуальность исследования, проведенного В.В. Долгих, не вызывает сомнений. Диссертант внес значительный вклад в изучение биохимии микроспоридий еще при подготовке кандидатской диссертации, впервые обнаружив гликолиз в спорах паразитов и показав, что глицерол-3-фосфатдегидрогеназа - единственный фермент, способный реокислять НАДН, образуемый в ходе гликолиза. Впоследствии, расшифровка геномов разных видов микроспоридий зарубежными научными коллективами полностью подтвердила результаты этих биохимических экспериментов. В докторской диссертации В.В. Долгих обобщены результаты дальнейшего изучения энергетического обмена микроспоридий и их взаимоотношений с метаболической системой хозяина. Кроме того, с использованием разнообразных методических подходов автором исследованы структурно-функциональные особенности секреторного аппарата этих паразитов и возможность целенаправленной секреции белков для управления зараженной клеткой хозяина.

Научная новизна диссертации также не вызывает сомнений, а по своей значимости работа соответствует достижению мирового уровня. Многие из результатов были получены диссертантом впервые и лишь через какое-то время подтверждены зарубежными исследователями. Например, В.В. Долгих впервые сделал вывод о наличии у микроспоридий АТФ/АДФ-транспортёров пластидно-бактериального типа и экспериментально подтвердил их присутствие у филогенетически удаленных видов. Он впервые показал, что собственный энергетический метаболизм функционирует у микроспоридий только на стадии споры и важную роль в нем играют митосомы - рудименты митохондрий, впервые обнаруженные диссертантом в зрелых спорах паразитов. Оригинальные данные, подтверждающие пионерский характер исследования были впервые получены автором и при изучении секреторного аппарата микроспоридий, а также поиске белков, секретлируемых паразитами в цитоплазму зараженной клетки хозяина.

С практической точки зрения значительный интерес представляют данные о метаболической инертности микроспоридий при внутриклеточном развитии и важной

роли мембранных переносчиков в эксплуатации метаболической системы хозяина. Это дает возможность осуществлять научно обоснованный поиск новых терапевтических средств против вредных видов микроспоридий. Для разработки новых подходов к использованию этих паразитов в области защиты растений интерес представляют полученные автором данные о секретлируемых белках как инструменте воздействия энтомопатогенных микроспоридий на зараженную клетку и организм насекомого-хозяина.

При построении диссертации автор несколько отступил от традиционной схемы – в ней нет отдельной главы, посвященной обзору литературы. Он предпочел рассматривать положение в различных направлениях науки, связанных с микроспоридиями, в отдельных главах и переходить от обзора непосредственно к результатам своих исследований. Такой подход оправдан для данной работы и не противоречит требованиям, предъявляемым ВАК к докторским диссертациям. Первая глава – «Материалы и методы», начинается с обоснования выбора объектов – двух видов прямокрылых и двух видов микроспоридий. Среди существенных критериев выбора последних – высокая патогенность в отношении прямокрылых и значительная степень расшифрованности генома *Paranosema locustae*, открывающая большие возможности для применения молекулярно-генетических подходов к решению задач исследования. Далее дается детальное описание многочисленных и разнообразных методов, использованных в работе.

Результаты исследования, их обсуждение и сопоставление с литературными данными представлены в следующих четырех главах диссертации. Вторая глава посвящена изучению особенностей энергетического обмена микроспоридий при внутриклеточном развитии. На основании представленных в ней результатов автор делает вывод о приобретении микроспоридиями способности поглощать готовую АТФ зараженной клетки хозяина с помощью уникальных белков-переносчиков, что позволяет им выключать собственный энергетический обмен при внутриклеточном развитии. В третьей главе диссертации приводятся результаты изучения особенностей энергетического обмена в спорах микроспоридий. Полученные данные позволяют автору составить окончательную схему энергетического обмена микроспоридий, использующих альтернативную дыхательную цепь для переноса электронов на кислород, и показать, что споры паразитов, в отличие от стадий внутриклеточного развития, активно используют собственный метаболический аппарат.

Полученные результаты свидетельствуют, что углеводный обмен микроспоридий характеризуется рядом уникальных особенностей, которые отличают эти организмы как от других эукариотических клеток, в том числе от других внутриклеточных паразитов. Расщепление запасного углевода трегалозы на две молекулы глюкозы с помощью фермента трегалазы является, по всей видимости, началом пути гликолиза у микроспоридий. Интересно, что активность следующего фермента в цепи окисления глюкозы – гексокиназы не обнаруживается в спорах микроспоридий, тогда как присутствует активность следующих ферментов гликолиза. Особенно интригующим является тот факт, что активность гексокиназы внутри споры находится на очень низком уровне, тогда как сам фермент активно экспрессируется паразитом, а затем секретруется в цитоплазму хозяина. Изучение данного фермента у микроспоридий представляет значительный интерес, так как этот белок характеризуется уникальными свойствами и, по-видимому, выполняет регуляторную функцию. Конечным продуктом гликолиза у микроспоридий являются пируват и глицерол 3-фосфат. Дальнейшая судьба пирувата крайне интересна в свете данных о том, что пируватдегидрогеназный комплекс, обеспечивающий дальнейшее превращение пирувата, у микроспоридий имеет необычное строение. У микроспоридий произошла редукция части компонентов пируватдегидрогеназы, поэтому, хотя фермент сохраняет способность декарбоксилировать пируват, не известно, как происходит утилизация образующихся в процессе электронов. При этом разделение фракций гомогенатов *P. grylli* и *P. locustae* и иммуногистохимия криосрезов микроспоридий показали другую особенность фермента, а

именно то, что значительная часть пируватдегидрогеназной активности обнаруживается в цитозольной фракции, тогда как обычно в эукариотической клетке данный фермент локализован в матриксе митохондрий.

Судьба другого продукта окисления глюкозы глицерол 3-фосфата также была подробно рассмотрена в свете того, что по теоретическим расчетам метаболизм данного соединения должен обеспечивать конечный положительный энергетический баланс процесса расщепления глюкозы. Гипотеза об превращении глицерол 3-фосфата в глицерол с образованием одной молекулы АТФ, как это происходит у трихомонад, не нашла подтверждения. Однако открытие у микроспоридий целых специализированных органелл митосом, и обнаружение наличия сразу двух форм фермента глицерол 3-фосфат дегидрогеназы - цитозольной и митохондриальной позволили объяснить, как микроспоридии извлекают энергию для жизнеобеспечения спор. Оказалось, что митосомы представляют собой сильно редуцированные митохондрии, которые, тем не менее, сохранили на внутренней мембране ферменты способные обеспечить перенос электронов от глицерол-3-фосфата на кислород. Дыхательная цепь у *P. locustae* представлена ферментами глицерол 3-фосфат дегидрогеназой, мембранным пулом убихинонов Q и альтернативной оксидазой. Таким было показано наличие у *P. locustae* всех компонентов, позволяющего реокислять НАДН, образующийся в результате гликолиза, с образованием двух молекул АТФ. Интересно, что ферменты дыхательной цепи, такие как альтернативная оксидаза, обнаруживаются не у всех филогенетических клад паразита, что оставляет открытым вопрос об их путях обеспечения клеток энергией. Подробное изучение автором энергетического обмена микроспоридий свидетельствует, что при сохранении общих с другими эукариотическими клетками черт, практически на каждом этапе метаболизма у этих организмов обнаруживаются уникальные, ранее неизвестные особенности, причем как на уровне биохимических реакций, так и на уровне структуры белков и даже целых органелл. Данное исследование свидетельствует о существовании в природе удивительного эволюционного разнообразия биохимических механизмов обеспечения клеток энергией.

Четвертая глава диссертации посвящена изучению системы внутриклеточного транспорта и секреции белков микроспоридий. С помощью разнообразных методов ультраструктурного и биохимического анализа автор впервые показал непрерывность тубулярной сети, представляющей собой комплекс Гольджи микроспоридий и соединяющей цистерны эндоплазматического ретикулума с цитоплазматической мембраной и формирующей полярной трубкой. Самой интересной структурной особенностью секреторного пути микроспоридий, обнаруженной диссертантом, следует признать отсутствие в клетке изолированных транспортных везикул.

В заключительной пятой главе диссертации автор пытается ответить на очень интересный и важный вопрос – способны ли микроспоридии активно вмешиваться в управление физиологическими процессами зараженной клетки, например, с помощью секреторируемых белков. На примере альфа/бета-гидролазы, гексокиназы и двух белков, содержащих обогащенные лейцином повторы, микроспоридии *Paranosema locustae* диссертанту удалось подтвердить, что эти древние паразиты приобрели эффективные инструменты воздействия на зараженную клетку хозяина, в том числе на липидный и углеводный обмен для стимуляции производства энергии на нужды паразита. Особо следует отметить впервые обнаруженное накопление секреторируемого микроспоридиями фермента гексокиназы в ядрах зараженных клеток хозяина. Автор диссертации предполагает, что основная функция гексокиназы микроспоридий в ядрах хозяина может быть связана с усилением транскрипционной активности генов гексозных транспортеров для увеличения уровня поступления углеводов в зараженную клетку.

Суммируя результаты, представленные в главах 2 – 5, автор формулирует общий вывод о том, что в ходе длительной адаптации к внутриклеточному паразитизму микроспоридии приобрели ряд уникальных структурно-функциональных особенностей,

обуславливающих уникальный характер их взаимоотношений с зараженной клеткой хозяина.

Данная работа представляет собой образец решения целого ряда фундаментальных проблем биологии посредством раскрытия молекулярных механизмов, лежащих в основе приспособления организмов к их среде обитания и образу жизни. Обращает на себя внимание целесообразный выбор и умелое применение очень богатого разнообразия классических и современных биохимических, молекулярно-генетических и цитологических методов для получения надежных и информативных результатов.

Значительная часть оригинальных методических подходов была разработана лично автором и в его исследовательской группе. Работа основана на эффективных и отработанных методах культивации и очистки микроспоридий на разных стадиях развития, которые позволяют получить биологический материал в количестве достаточном для проведения качественного биохимического анализа. Классические биохимические методы качественного и количественного анализа биологических смесей, такие как анализ ферментативной активности, плоскостная хроматография, Вестерн-блоттинг, электрофорез в полиакриламидном геле, ПЦР с обратной транскрипцией и центрифугирование и др., позволили получить уникальную и достоверную информацию о составе микроспоридий и клеток их хозяев, наличии или отсутствии специфических видов ферментативной активности, экспрессии и посттрансляционных модификаций белков а также об адаптивных перестройках метаболизма. Так, анализ содержания липидов и запасных углеводов в клетках хозяина показал, что паразит конкурирует с хозяином не за субстраты для синтеза АТФ, а непосредственно за саму молекулу-переносчик энергии. Определение содержания глюкозы и трегалозы наглядно показало биологическую роль углевода трегалазы в качестве запасного источника энергии у спор *P. grylli*. Определение активности ферментов и продуктов энергетического обмена выявило усиление гликолиза при заражении клеток микроспоридиями, а также разный уровень гликолиза у внутриклеточных стадий микроспоридий по сравнению со спорами. Преимущественная экспрессия ряда ферментов углеводного и энергетического обмена (α и β субъединиц ПДГ, митохондриальной глицерол-3ФДГ, альтернативной оксидазы) и белков «домашнего хозяйства» (переносчика АТФ, Sec31 субъединицы COPII, β -COP и β' -COP, синтаксин-подобного белка, синаптобревина) в спорах микроспоридий, но не на стадиях внутриклеточного развития, была также подтверждена методом Вестерн-блот и методом ПЦР с обратной транскрипцией. Ферментативный анализ (активность лактатдегидрогеназы, НАД- и НАДФ-зависимых алкогольдегидрогеназ, НАД-зависимой малатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы, малик-энзима, глицеролкиназы, специфичной и неспецифичной фосфатазы) позволил отвергнуть гипотезу об извлечении спорами энергии за счет альтернативных путей метаболизма промежуточных и конечных продуктов гликолиза. При этом была обнаружена активность фермента глицерол-3-фосфат дегидрогеназы, компонента глицерофосфатного челнока, который обеспечивает переноса электронов с глицерол-3-фосфата на альтернативную дыхательную цепь. Тестирование активности ферментов трегалазы и фосфорилазы позволило сделать вывод о том, что основным запасующим углеводом у микроспоридий является трегалоза, а трегалаза является ключевым ферментом запускающим процесс гликолиза у этих микроорганизмов. Метаболизирование пирувата в цитозольной фракции спор подтвердило способность редуцированной пируватдегидрогеназы микроспоридий отщеплять от пирувата молекулу углекислого газа.

Применение молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР-амплификация, Саузерн-гибридизация, создание генетических конструкций и гетерологичная экспрессия генов в бактериях *E. coli* и дрожжах *Pichia pastoris*, позволили выявить и изучить специфические гены, играющие ключевую роль в метаболизме микроспоридий и наработать достаточное количество кодируемых ими белков для изучения *in vitro* (АТФ-переносчик, α - и β - субъединицы пируватдегидрогеназы, митохондриальная глицерол-3-

фосфатдегидрогеназа, Sec13 субъединица COPII, альтернативная оксидаза, митохондриальный, цитозольный и эндоплазматический шаперон Hsp70, синтаксин, α/β -гидролаза). Полученные рекомбинантные белки были использованы для иммунохимической идентификации белков в изучаемых биологических средах и на микросрезах препаратов микроспоридий.

Подход при котором полученные антитела использовали для мечения белков с последующей иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопией, следует признать крайне эффективным для решения поставленных в работе задач. Этот метод позволил получить ценную и наглядную информацию о локализации ранее неизученных белков микроспоридий, а также визуализировать биохимические процессы, происходящие в клетке паразита и его хозяина. Применение данного метода позволило изучить ультраструктуру клетки, в том числе идентифицировать митосомы, на внутренней мембране которых локализуются ферменты митохондриальная глицерол-3-фосфат дегидрогеназа и альтернативная оксидаза. Впервые показана релокализация пируватдегидрогеназы из митохондрий в цитоплазму спор. Методы электронной микроскопии и в особенности электронной томографии позволили сделать однозначный вывод о структуре секреторного аппарата микроспоридий. Далее, с помощью иммунохимического мечения было продемонстрировано пространственное перемещение белка оболочки споры с массой 40 кДа и белков полярной трубки во времени, при прохождении микроспоридиями фаз жизненного цикла. Таким образом, впервые была получена ценная информация о механизме образования специфических органелл микроспоридий, таких как полярная трубка и экзоспора. Было показано продвижение белков по непрерывным каналам тубулярной сети к месту образования полярной трубки при котором одновременно осуществляется их созревание (О-маннозилирование). Визуализация с помощью антител к рекомбинантным белкам оказалась незаменимым инструментом для наглядной демонстрации секреции микроспоридиями ферментов α/β -гидролазы и гексокиназы в цитоплазму зараженных клеток саранчи. Обнаружение секретированной гексокиназы в ядрах клеток хозяина подтвердила участие данного фермента в регуляции метаболизма хозяина.

Значительный объем ценной информации для обсуждения полученных результатов был получен с помощью применением методов биоинформатики. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей переносчиков АТФ бактерий, растений и микроспоридий позволил оценить гомологию этих белков у разных организмов и подтвердить предположение о горизонтальном переносе генов АТФ-переносчиков микроспоридиям от паразитических бактерий. Компьютерное моделирование структуры белков на основе их аминокислотной последовательности были использованы автором для предсказания топологии специфических белков микроспоридий и обнаружения в их составе функциональные домены, что позволило предположить особенности транспорта и биологическую роль данных полипептидов. С помощью программ обработки изображений было проведено моделирование трехмерной структуры секреторного аппарата микроспоридий из серийных срезов

Оригинальным можно назвать методический подход для изучения способности белков микроспоридий секретироваться во внешнюю среду с помощью гетерологической экспрессии в модельной эукариотической клетке дрожжей. В целом следует отметить высочайший уровень квалификации автора работы в области молекулярной биологии и биохимии, который позволил на самом современном уровне описать особенности уникального таксона древних и специализированных внутриклеточных паразитов микроспоридий.

Диссертация изложена на 294 страницах текста и включает введение, 4 защищаемых положения, 5 глав, заключение, выводы, список литературы из 291 публикации (254 на иностранных языках). Работа включает 11 таблиц и 56 рисунков, хорошо

иллюстрирующих полученные результаты. Автореферат полностью отражает содержание, защищаемые положения и выводы диссертации.

Диссертация В.В. Долгих вносит существенный вклад в познание биохимических, молекулярных и ультраструктурных аспектов адаптации микроспоридий к внутриклеточному паразитизму. Результаты исследования получены на большом экспериментальном материале, содержат значительный элемент новизны и опубликованы в виде 26 статей в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК РФ, а также трех международных коллективных монографиях.

Считаю, что по уровню и глубине решаемых задач, большому научному и практическому значению диссертация Вячеслава Васильевича Долгих "Биохимические и структурно-функциональные адаптации энтомопатогенных микроспоридий рода *Paranosema* к внутриклеточному паразитизму" соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.11 - паразитология.

Официальный оппонент
Заведующий лабораторией паразитологии
животных и растений Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии Карельского научного центра
Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН)
доктор биологических наук

Е.П. Иешко

185910, г. Петрозаводск
ул. Пушкинская, дом 11
ieshko@krc.karelia.ru
8-911-410-09-58

Подпись Иешко Е.П. заверяю
ученый секретарь ИБ КарНЦ РАН
кандидат биологических наук



Е.М. Матвеева