

*на правах рукописи*

**ПАВЛОВА**

**Ольга Андреевна**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА  
МИКРОСПОРИДИОЗА ПЕРЕЛЕТНОЙ САРАНЧИ  
*LOCUSTA MIGRATORIA* (INSECTA: ORTHOPTERA)  
ПРИ ЗАРАЖЕНИИ *PARANOSEMA LOCUSTAE* (MICROSPORIDIA)**

Шифр и наименование специальности

03.02.05 - энтомология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении “Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений” (ФГБНУ ВИЗР)

**Научный руководитель:**

**Долгих Вячеслав Васильевич**

кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР

**Официальные оппоненты:**

**Фролов Александр Олегович**

доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник лаборатории паразитических червей и протистов ФГБУН Зоологический институт РАН

**Дубовский Иван Михайлович**

доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией патологии насекомых ФГБУН Института систематики и экологии животных СО РАН

**Ведущая организация: ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский Государственный Университет”**

Защита состоится 19 января 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по адресу:  
196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д.3.  
Факс: 8(812)4705110; e-mail: [vizr@mail333.ru](mailto:vizr@mail333.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений и на веб-сайте: [www.vizrspb.ru](http://www.vizrspb.ru)

Автореферат разослан            ноября 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук \_\_\_\_\_ Галина Анатольевна Наседкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования.**

Перелетная саранча *Locusta migratoria* L., 1758 представляет собой многоядного вредителя сельскохозяйственных культур, против которого в системе защиты растений применяются различные подходы, включая использование естественных врагов, прежде всего возбудителей заболеваний. Одним из инфекционных агентов, способных к долговременному подавлению численности саранчовых в естественных условиях, а также применяемых в качестве продуцента биопрепаратов, является микроспоридия *Paranosema locustae* Canning, 1953 (Henry, 1981; Bjornson, Oi, 2014). Разработка и эффективное применение микробиологических средств против вредных саранчовых невозможны без изучения природы патогенного воздействия микроспоридий на насекомых. В частности, практически ничего не известно о молекулярных механизмах воздействия этих паразитов на клетку хозяина, позволяющих им управлять физиологическими процессами насекомого.

Главная особенность патогенеза микроспориidioза - полная зависимость этих облигатных паразитов от метаболической активности зараженной клетки насекомого. Эта зависимость выражена в утрате паразитами цикла трикарбоновых кислот, классической схемы окислительного фосфорилирования и дыхательной цепи и в приобретении способности удовлетворять свои энергетические потребности непосредственно за счет АТФ зараженной клетки насекомого с помощью уникальных АТФ/АДФ-переносчиков (Williams et al, 2008, Tsaousis et al, 2008). Представляется очевидным, что микроспоридии способны целенаправленно управлять метаболическими процессами зараженной клетки и, прямо или косвенно, всего организма насекомого. Например, при микроспориidioзе наблюдается истощение запасных питательных веществ жирового тела насекомого и, в частности, триглицеридов липидных капель. Мобилизация липопротеиновых комплексов у здоровых насекомых происходит только в определенные периоды развития и находится под контролем центральной нервной системы, осуществляемым при помощи гуморальных факторов и внутриклеточных регуляторных каскадов (Arrese, Soulages, 2010; Bickel et al., 2009). Другие, наблюдаемые при микроспориidioзе патологические процессы, такие как увеличение смертности, снижение плодовитости, прекращение миграций от мест выплода на поля и потеря способности к полетам могут быть следствием истощения резервов питательных веществ в организме хозяина (Canning, 1962; Исси и др., 2005).

Существование комплекса молекулярно-биологических механизмов, управляющих метаболизмом зараженной клетки, показано для других

внутриклеточных паразитов, представителей групп Apicomplexa и Kinetoplastida, способных управлять физиологическими процессами хозяина при помощи секретируемых протеинкиназ и транскрипционных факторов (Carmen, Sinai, 2007; Gilbert et al., 2007; Schmuckli-Maurer et al., 2009; Lambertz et al., 2012). Один из механизмов такой регуляции реализуется через белки, секретируемые паразитом в клетку хозяина. Для микроспоридий, паразитирующих в прямом контакте с цитоплазмой зараженной клетки, есть все основания полагать исключительную роль секреторных белков в воздействии на клетку насекомого.

Изучение секреторных белков микроспоридий на лабораторной системе *P. locustae* – *L. migratoria* позволит приблизиться к пониманию природы их патогенного воздействия на метаболизм насекомых и в дальнейшем послужит основой для разработки экспериментальной модели взаимоотношений этих облигатных паразитов и их хозяев. Такая модель необходима для построения прогнозов численности природных популяций вредных саранчовых и регламентации направленных против них защитных мероприятий. Также выявление молекулярных механизмов, используемых паразитом для управления обменом веществ зараженных клеток жирового тела насекомых, дополнит современные знания о физиологии запасующих тканей насекомых и других животных в норме и при патологии, вызываемой инфекционными агентами.

**Цель работы:** выявление секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae* и оценка их участия в молекулярных механизмах патогенеза микроспоридиоза перелетной саранчи. Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. По геномному проекту *Paranosema locustae* провести анализ генетических последовательностей, кодирующих белки с сигнальной последовательностью секреторного пути, которые могут быть вовлечены в патогенез микроспоридиоза перелетной саранчи.
2. Оценить уровень экспрессии генов белков, потенциально секретируемых паразитом в зараженную клетку насекомого на разных стадиях жизненного цикла *Paranosema locustae*.
3. Определить содержание секреторных белков *Paranosema locustae* в пробах зараженного жирового тела саранчи.
4. Осуществить иммунолокализацию секреторных белков паразита на срезах зараженного жирового тела саранчи и установить их компартментализацию.

**Научная новизна.** Исследованиями выявлен один из молекулярных механизмов патогенеза микроспоридиоза у перелетной саранчи,

осуществляемый при помощи секреторных белков *P. locustae*. В геноме этой микроспоридии впервые обнаружены гены белков, обладающих сигнальной последовательностью секреторного пути, способные воздействовать на углеводный и липидный метаболизм насекомого-хозяина, а также вмешиваться в регуляторные каскады в зараженной клетке жирового тела. Показана транскрипционная активность этих генов на разных стадиях жизненного цикла паразита. Осуществлена гетерологическая экспрессия в бактериях *Escherichia coli* и получены поликлональные антитела к белкам паразита: гексокиназе, альфа/бета-гидролазе, двум LRR белкам, субтилизин-подобной протеиназе, рицин-подобному лектину, двум формам молекулярного шаперона Hsp70, трегалазе. Впервые для микроспоридий показана возможность воздействия на зараженную клетку насекомого при помощи секреторных молекул белковой природы, таких как LRR белки, гексокиназа, альфа/бета-гидролаза, которые можно оценить как молекулярные факторы патогенности паразита.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Установлена природа воздействия облигатного внутриклеточного паразита – микроспоридии *P. locustae* на насекомое–хозяина, что позволяет решить такую важную научную задачу как выявление молекулярных основ патогенности паразитов этой группы. Также, поскольку микроспоридии широко распространены в животном мире, вызывая серьезные заболевания людей с различными формами иммунодефицита, домашних животных, промысловых рыб, полезных насекомых, отработанные в рамках данного исследования подходы могут быть использованы для разработки новых современных методов диагностики и терапии микроспоридиозов. Изучение молекулярных факторов патогенности микроспоридий представляет интерес для возможной оценки вирулентности продуцентов биопрепаратов или для создания принципиально новых методов борьбы с вредными видами насекомых.

**Методология и методы исследования.** Изучение секретома *P. locustae* на первом этапе провели при помощи открытых баз данных генетической информации, а также серверов, разработанных для анализа нуклеотидных последовательностей в сети Internet. Далее были использованы стандартные методы молекулярной биологии (экстракция геномной ДНК, ПЦР-амплификация, молекулярное клонирование и секвенирование фрагментов ДНК), микробиологии (трансформация бактерий и гетерологическая экспрессия генов), иммунологии (получение и очистка поликлональных антител) и иммунохимии (Вестерн блот гибридизация). Накопление секреторных молекул *P. locustae* в зараженных клетках и тканях саранчи изучали методами иммуногистохимического анализа с использованием криосрезов зараженных тканей и органов хозяина.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Микроспоридия *Paranosema locustae* на этапе внутриклеточного развития секретирует белки в цитоплазму зараженной клетки насекомого-хозяина.

2. Секреторные белки *Paranosema locustae* можно оценить как один из молекулярных механизмов патогенеза микроспоридиоза перелетной саранчи, участвующие в управлении метаболизмом насекомого-хозяина.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Высокая степень достоверности полученных данных определяется использованием современных методов подготовки образцов и обработки материала и воспроизводимостью результатов экспериментов в серии опытов. Методическая база, использованная для проведения исследований, соответствует поставленным задачам.

Материалы диссертации представлены на III съезде по защите растений (Санкт-Петербург, 2012), и на конференции “Инфекционная патология членистоногих” (Санкт-Петербург, 2012).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 4 статьи входят в перечень журналов, включенных в международные базы данных.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 рисунками и 3 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы из 124 источников, из них 93 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность к.б.н., ведущему научному сотруднику лаборатории микробиологической защиты растений ФГБНУ ВИЗР Долгих В.В. за руководство научной работой, а также другим сотрудникам лаборатории: д.б.н., профессору Исси И.В., д.б.н. Токареву Ю.С. и Сендерскому И.В. за помощь на всех этапах исследования. Отдельная благодарность заведующему отделом энтомологии Московского зоопарка Березину М.В. за предоставленную лабораторную культуру перелетной саранчи.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы**

В этой главе в первой части обобщена информация о микроспоридиях, их жизненном цикле и патогенезе микроспоридиоза насекомых. Приведены сведения о воздействии микроспоридий на метаболизм, гормональный статус, защитные реакции и поведение хозяина. Во второй части даны современные представления о физиологии жирового тела насекомых и механизмах регуляции процессов запасаания и мобилизации резервных веществ.

## Глава 2. Материал и методы

Основным объектом исследований стала микроспоридия *P. locustae*, паразитирующая в жировом теле перелетной саранчи *L. migratoria*. Экспериментальное заражение спорами микроспоридий проводили перорально на личинках африканского подвида перелётной саранчи *Locusta migratoria migratorioides* из лабораторной культуры инсектария Московского зоопарка. Из зараженных насекомых выделяли споры и стадии внутриклеточного развития *P. locustae*.

Отпрепарированное жировое тело заражённых и незаражённых (контрольных) особей саранчи использовали для выделения нуклеиновых кислот, приготовления белковых проб и фиксаций.

Биоинформационный поиск генов, кодирующих секретлируемые белки *P. locustae*, в базе данных геномного проекта (*Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272) проводили с помощью пакета программ для молекулярной биологии DNA Star, а также серверов, доступных в сети Интернет (SignalP 3.0 и 4.1, TargetP 1.1, SIG-Pred, Signal-3L, PrediSi, HMMTOP, TMHMM Server v. 2.0). Предполагаемую функцию белков и сходство с известными последовательностями оценивали с помощью BLAST-серверов Национального Центра Биотехнологической информации США (NCBI).

Уровень экспрессии генов *P. locustae* определяли методом полимеразной цепной реакции по кДНК матрице, полученной при помощи обратной транскриптазы (ОТ-ПЦР). При этом использовали мРНК, выделенную из разных стадий жизненного цикла паразита при помощи реагента PureZOL (Bio-Rad).

ПЦР-амплификацию генов секреторных белков провели с помощью высокоточной *Pfu*-полимеразы (Fermentas) и специально подобранных праймеров. В качестве матрицы использовали ранее выделенную из спор геномную ДНК паразита. Амплифицированные копии генов были клонированы и встроены с сохранением рамки считывания в экспрессирующий вектор pRSET (Invitrogen). Гетерологическая экспрессия осуществлена в *Escherichia coli*, штамм C41.

Рекомбинантные белки, накапливающиеся в телах включения, и растворимые белки, очищенные при помощи металлохелатной хроматографии, использовали для иммунизации мышей и кроликов с последующей очисткой иммуноглобулинов из полученных поликлональных антисывороток иммуноаффинным методом.

Содержание нативных белков микроспоридии *P. locustae* изучали методом иммуноблоттинга (Вестерн блот гибридизации) с белковыми пробами стадий жизненного цикла паразита и фракций жирового тела.

Иммунолокализацию секреторных белков *P. locustae* проводили на криосрезах фиксированного 4% параформальдегидом жирового тела саранчи при помощи антивидовых флюоресцентных конъюгатов AF 488 и AF 546 (LifeTechnologies). Криосрезы толщиной 10 мкм изготавливали на криотоме Microm HM 520. Для визуализации ядер срезы дополнительно окрашивали ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол). Готовые препараты просматривали на флюоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioImagerM1 и конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP.

### Глава 3. Поиск, клонирование и гетерологическая экспрессия секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae*

#### 3.1. Компьютерный анализ генов секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae*

В результате анализа нуклеотидных последовательностей генома *P. locustae* выявлен ряд генов, кодирующих белки с сигнальной последовательностью секреторного пути, которые могут принимать участие в патогенезе микроспоридиоза перелетной саранчи (Таблица 1). У всех найденных белков исключено наличие трансмембранных доменов и сайтов, ответственных за связь с мембранами.

**Таблица 1.** Вероятность присутствия секреторного пептида (СП) по данным сервера SignalP 3.0 в аминокислотных (а/к) последовательностях белков *P. locustae*, потенциально вовлеченных в патогенное воздействие на саранчу.

| Белок                                            | Функция     | К-во а/к | Вероятность СП, % | Размер СП, а/к |
|--------------------------------------------------|-------------|----------|-------------------|----------------|
| Субтилизин-подобная протеиназа                   | Гидролаза   | 529      | 99                | 26             |
| Альфа/бета-гидролаза                             | Гидролаза   | 373      | 78                | 18             |
| Трегалаза                                        | Гидролаза   | 670      | 75                | 36             |
| Гексокиназа                                      | Киназа      | 472      | 80                | 18             |
| Рицин-подобный лектин В                          | Лектин      | 231      | 57                | 34             |
| LRR-белки                                        | не известна | 331-738  | 75-98             | 18-20          |
| Белок теплового шока Hsp70 с сигнальным пептидом | Шаперон     | 679      | 99                | 17             |

Наибольший интерес представляет группа генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме внутриклеточных субстратов зараженных адипоцитов, направляя энергетические резервы на нужды паразита. В эту

группу входят последовательности, кодирующие 3 гидролазы (субтилизин-подобную протеиназу, альфа/бета-гидролазу, трегалазу) и одну киназу (гексокиназа). Важная роль гидролитических ферментов (протеиназы, липазы) в патогенезе показана для энтомопатогенных грибов *Metarhizium anisopliae* (Leger et al., 1986). Протеолитические ферменты и, в частности, субтилизин-подобную протеиназу секретируют такие паразиты как *Trypanosoma brucei* и *Plasmodium falciparum* (Bossard et al., 2013; Tawk et al., 2013; Agarwal et al., 2013). Трегалаза – фермент, способный расщеплять трегалозу – основной транспортный дисахарид в гемолимфе насекомых. Ген, обнаруженный у *P. locustae*, имеет сходство на уровне 31% с мембранной формой трегалазы щеточной каемки многоклеточных животных. Поскольку трегалаза *P. locustae* не содержит гидрофобного домена для встраивания в цитоплазматическую мембрану, можно предположить, что этот фермент участвует в расщеплении трегалозы за пределами клетки паразита в цитоплазме адипоцита саранчи. Наличие сигнального пептида у гексокиназы *P. locustae* уникально для гетеротрофных организмов, поскольку ранее такая особенность обнаружена только у гексокиназ растений, ассоциированных с внешней мембраной хлоропластов и митохондрий.

Большая группа последовательностей кодирует белки, содержащие обогащенные остатками аминокислоты лейцин повторы (leucine rich repeats, LRR-белки). В геноме *P. locustae* закодировано несколько десятков таких белков. При этом у многих из них обнаруживается сигнальный пептид, ответственный за их секрецию. Таким образом, большая часть секретируемых белков микроспоридий относится именно к этой группе. Они не содержат гидрофобных доменов и демонстрируют некоторое сходство с протеинкиназами, ГТФ-связывающими белками и ингибиторами РНКаз бактерий и высших растений (Kobe, Kajava, 2001).

Все белки этой группы, за исключением четырех, формируют два больших семейства, обозначенных нами как А и Б, между которыми отсутствует какая-либо гомология нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. При этом внутри каждой группы сходство последовательностей нуклеотидов может достигать 90%. Поскольку универсальная функция LRR-белков – участие во взаимодействиях с другими белками, мы предположили, что в зараженной клетке они могут вступать в пространственную связь с компонентами регуляторных путей и сигнальных каскадов хозяина. Для дальнейшей работы мы взяли по одному представителю из каждого семейства, соответствующих открытым рамкам считывания (open reading frames, orf) номер 204 и 515 (номера согласно записям в базе данных *Antonospora locustae* Genome Project).

Два других обнаруженных в геноме *P. locustae* белка, обладающих сигнальным пептидом, по-видимому, также выполняют регуляторную функцию в системе паразит – насекомое-хозяин. Это один из представителей молекулярных шаперонов семейства Hsp70 и углевод-распознающий лектин, сходный с В-цепью белкового токсина рицина. По всей видимости, данная молекула участвует в лиганд-рецепторном взаимодействии с каким-либо внутри- или внеклеточным субстратом хозяина. Функцию микроспоридиального Hsp70 за пределами клетки паразита сложно представить.

Ко всем вышеперечисленным генам подобраны специфические праймеры для ПЦР-амплификации и встраивания в вектор с учетом сохранения открытой рамки считывания для дальнейшей успешной гетерологичной экспрессии соответствующих белков.

### **3.2. Анализ уровня экспрессии генов секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae* в спорах и стадиях внутриклеточного развития паразита**

Транскрипционную активность изучаемых генов проверяли в спорах и стадиях внутриклеточного развития паразита. Максимальный уровень транскрипции большинства изучаемых генов наблюдали в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий, в спорах паразита она была существенно ниже или отсутствовала. Исключение составил ген, кодирующий субтилизин-подобную протеиназу, содержание транскриптов мРНК этого гена было сравнимым на всех стадиях жизненного цикла паразита. Такие результаты позволяют предположить, что субтилизин-подобная протеиназа микроспоридий выполняет определенную роль в физиологических процессах, протекающих в спорах, и не участвует в патогенном воздействии на насекомое на этапе внутриклеточного развития паразита. В тоже время гены трегалазы, гексокиназы, альфа/бета-гидролазы, рицин-подобного лектина и LRR-белков активно транскрибируются именно при паразитировании в клетке хозяина и могут принимать участие в воздействии микроспоридии на нее.

### **3.3. Клонирование и гетерологичная экспрессия в бактериях *Escherichia coli* генов секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae***

Для каждого гена проведена успешная ПЦР-амплификация и встраивание в экспрессирующий вектор. Анализ встроенных фрагментов с помощью секвенирования подтвердил правильность встраивания, а также идентичность

клонированных копий последовательностям, обнаруженным в геноме паразита в рамках геномного проекта.

Исключение составили последовательности двух генов. В 3'-концевой области клонированного гена альфа/бета-гидролазы обнаружены два дополнительных обогащенных пролином аминокислотных повтора VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH, по сравнению с последовательностью, опубликованной на сайте проекта по расшифровке генома этого вида. Предсказанный размер белка, кодируемый новым геном, составлял около 46.2 кДа, в то время как доступная в Интернете последовательность кодировала белок размером 41.5 кДа. Также стоит отметить, что дополнительный анализ колоний после клонирования ПЦР-амплифицированных копий гена гидролазы в векторе pRSET позволил дополнительно обнаружить последовательность с восемью С-концевыми повторами. По всей видимости, эти находки свидетельствуют о полиморфизме генов альфа/бета-гидролазы по количеству обогащенных пролином повторов в геноме *P. locustae*.

При секвенировании клонированных генов обнаружен новый LRR- белок микроспоридий. Поскольку внутри каждого семейства этих белков (А и В) гомология последовательностей может достигать 90%, при использовании праймеров, специфичных к orf 204, наблюдалась амплификация дополнительных продуктов, соответствующих близкородственным формам. Расшифровка нуклеотидной последовательности одного из клонированных фрагментов показала, что нам удалось обнаружить ген, кодирующий новый LRR-белок *P. locustae*. Гомология обнаруженного белка с наиболее близкой родственной формой (orf 626) составила 87.8%.

Созданные на основе экспрессирующего вектора конструкции использованы для трансформации бактерий *E. coli*. Во всех случаях наблюдалось токсичное воздействие чужеродного белка на рост бактерий. Наиболее эффективная экспрессия рекомбинантных белков наблюдалась при инокуляции свежих колоний в жидкую среду и культивировании в течение ночи при 37°C после добавления в среду ИПТГ. За исключением альфа/бета-гидролазы и молекулярных шаперонов все рекомбинантные продукты накапливались в бактериальных клетках в виде нерастворимых белковых включений и специфично экстрагировались в присутствии 8 М мочевины.

Для выделения альфа/бета-гидролазы и молекулярных шаперонов, накапливающихся в бактериях в растворимой форме, успешно использован метод металлохелатной хроматографии (IMAC) на Ni-колонках. Анализ очищенных белков с помощью ДСН-ПАГЭ показал, что использованные схемы выделения позволили получить препараты белков, достаточно чистые для выработки специфичных антител. Полученные в результате иммунизации

мышей и кроликов антитела к белкам микроспоридии *P. locustae* позволили приступить к анализу их содержания в клетках паразита и зараженного жирового тела саранчи с помощью иммуноблоттинга.

#### **Глава 4. Анализ содержания секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae* в клетках паразита и саранчи**

##### **4.1. Подготовка проб зараженного жирового тела саранчи**

Для анализа использовали три типа белковых проб: (1) белки спор и стадий внутриклеточного развития, (2) белки зараженного жирового тела, полученные мягким разрушением ткани насекомого с последующим удалением клеток и спор паразита центрифугированием, (3) белки незараженного жирового тела, полученного таким же образом.

При приготовлении проб белков цитоплазмы клеток зараженного жирового тела необходимо было исключить возможность их загрязнения внутренними (несекретируемыми) белками паразита. Поскольку меронты и споронты *P. locustae* легко повреждаются, растворимые цитоплазматические белки паразита попадают в гомогенат зараженного жирового тела и не могут выступать в качестве отрицательного контроля загрязнения. Однако в нашем случае секреторные белки связаны с внутриклеточными мембранными компартментами клетки паразита в процессе своего синтеза, созревания и транспорта. Это позволяет предложить в качестве отрицательного контроля загрязнения проб антитела к растворимым ферментам таких компартментов, например, к белку теплового шока Hsp70 с сигнальным пептидом.

##### *Молекулярный шаперон семейства Hsp70 P. locustae*

Данный представитель семейства молекулярных шаперонов Hsp70 размером 76 кДа состоит из 679 аминокислотных остатков. В отличие от трех других представителей семейства, обнаруженных у микроспоридий, данная форма располагает явно выраженным сигнальным пептидом, ответственным за поступление белка в секреторный путь. В С-концевой области белка обнаружена последовательность REEL, ответственная за локализацию белка в эндоплазматический ретикулум (ЭПР).

Как видно из результатов иммуноблоттинга (Рисунок 1), зрелый белок размером около 74 кДа накапливается в очищенных стадиях внутриклеточного развития (Ст), спорах (Сп) и осадках гомогената зараженного жирового тела. Во фракции супернатанта гомогената жирового тела (С), а также в контрольных пробах (Кос и Кс) исследуемый белок отсутствует. Полученные данные подтверждают, что данный шаперон находится в просвете цистерн ЭПР, где

участвует в укладке (фолдинге) белковых молекул при их транслокации в просвет органеллы.

На основании полученного результата можно заключить, что при использовании предложенной схемы приготовления проб растворимой фракции белков зараженного жирового тела не наблюдается нарушения целостности внутренних мембранных компартментов микроспоридий, поскольку в конечном супернатанте отсутствуют компоненты матрикса цистерн ЭПР. Секреторные белки микроспоридий, синтез и созревание которых также связано с ЭПР, попадают в цитоплазму хозяина без разрушения мембран паразита. Это означает, что антитела к ЭПР-Hsp70 можно использовать в качестве контроля от загрязнения проб жирового тела несекреторными белками, локализующимися в ЭПР, а также молекулярного маркера соответствующего мембранного компартмента.

#### **4.2. Анализ содержания секреторных белков *Paranosema locustae* в жировом теле саранчи методом иммуноблоттинга**

##### *Гексокиназа *P. locustae**

Гексокиназа *P. locustae* представляет собой белок, состоящий из 471 аминокислотного остатка размером 52.1 кДа. Иммуноблоттинг (Рисунок 2) показал накопление значительных количеств белка с молекулярным весом около 48 кДа в супернатанте гомогената зараженного жирового тела саранчи (С), но не во внутриклеточных стадиях (Ст). В пробах контрольного жирового тела саранчи данный белок также не выявлялся (Кос, Кс).

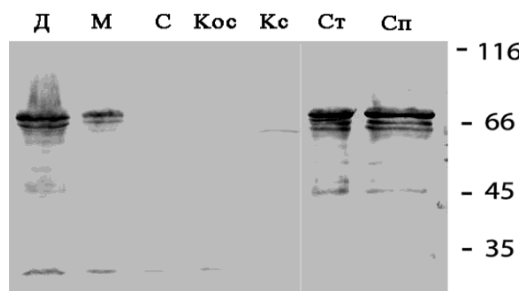
Размер белка, распознаваемого антителами против гексокиназы микроспоридий, приблизительно соответствует предсказанному размеру без сигнального пептида.

##### *Альфа/бета-гидролаза *P. locustae**

В 3'-концевой области клонированного гена альфа/бета-гидролазы по сравнению с последовательностью, представленной на сайте геномного проекта *P. locustae*, обнаружены два дополнительных обогащенных пролином аминокислотных повтора. Таким образом, амплифицированная последовательность кодирует белок, состоящий из 416 аминокислотных остатков (вместо 372) размером 46,2 кДа (вместо 41,5 кДа). Как показал ДСН-ПАГЭ, размер рекомбинантного белка, экспрессированного в *E. coli* и выделенного методом ИМАС, составил около 65 кДа, что значительно больше по сравнению с предсказанным размером. Ранее подобная особенность отмечена для некоторых эстераз. При этом низкая подвижность при ДСН-

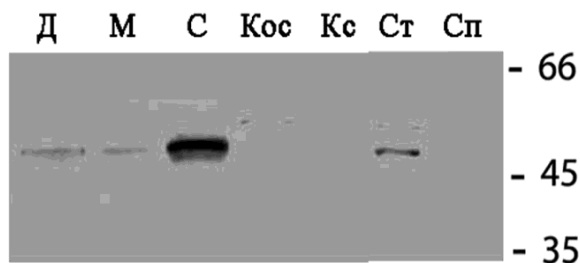
ПАГЭ объясняется низкой способностью белка связывать ионный детергент ДСН при высоком содержании отрицательно заряженных аминокислотных остатков (14,5% Asp и Glu от общего содержания аминокислот) (Rath et al., 2009).

Иммуноблоттинг с антителами против рекомбинантной альфа/бета-гидролазы (Рисунок 3) показал приблизительно одинаковое содержание фермента в очищенных стадиях внутриклеточного развития (Ст) и пробах цитоплазмы зараженного жирового тела (С). При этом антитела специфично распознают два продукта, один из которых полностью соответствует размеру рекомбинантного белка минус концевой пептид вектора (около 61-62 кДа). Другой продукт, вероятно, соответствует форме фермента с дополнительным количеством обогащенных пролином повторов (восемь вместо шести). Полиморфизм гена по количеству таких повторов был показан выше.

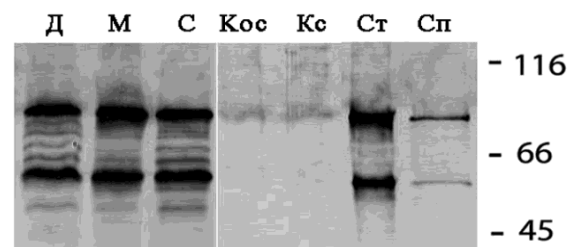


**Рисунок 1.** Иммуноблоттинг с антителами против ЭПР формы Hsp70 *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела.  
Д – осадок после центрифугирования 100 g;  
М – осадок после центрифугирования 20 000 g;  
С – конечный супернатант.  
Кос – осадок гомогената контрольного жирового тела 100 g;  
Кс – конечный супернатант;  
Ст – белки стадий внутриклеточного развития;  
Сп – белки спор.



**Рисунок 2.** Иммуноблоттинг с антителами против гексокиназы *P. locustae*.



**Рисунок 3.** Иммуноблоттинг с антителами против альфа/бета-гидролазы *P. locustae*.

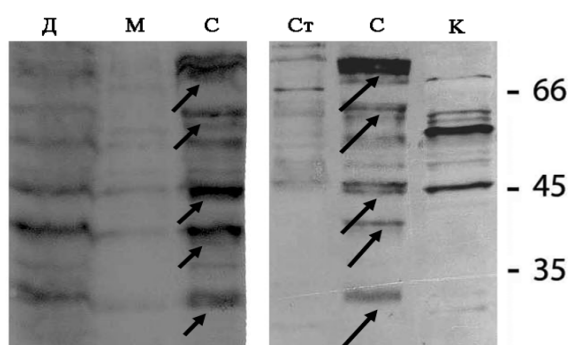
### *LRR-белок семейства A (orf 204) P. locustae*

Белок, содержащий обогащенные лейцином повторы и обнаруженный нами с помощью праймеров к orf 204, имеет размер около 41,6 кДа и состоит из 376 аминокислотных остатков. Иммуноблоттинг с антителами к рекомбинантному LRR-204 (Рисунок 4) показал специфичное накопление в супернатанте гомогената зараженной ткани саранчи (С) целого ряда продуктов, вероятнее всего, соответствующих множественным формам LRR-белков семейства А, обнаруженных в геноме паразита. Белки данной группы имеют размер от 17,2 (orf 1956) до 104,4 кДа (orf 872). Положительная реакция с

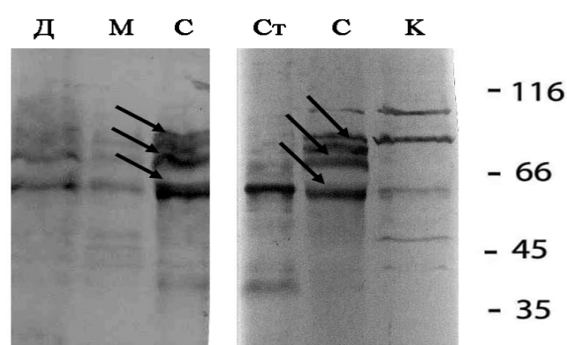
антителами в контрольной пробе объясняется высокой консервативностью LRR-белков. По всей видимости, в цитоплазме контрольного жирового тела саранчи содержатся белки с гомологичными аминокислотными последовательностями.

#### *LRR-белок семейства Б (orf 515) P. locustae*

LRR-белок, кодируемый orf 515, как и большинство представителей семейства Б, представлен крупным белком, состоящим из 682 аминокислот (78,8 кДа). Иммуноблоттинг (Рисунок 5) показал достоверное накопление в супернатанте гомогената зараженного жирового тела (С) трех белков размером от 60 до 80 кДа, которые, по всей видимости, соответствуют нескольким формам LRR-белков семейства Б, обнаруженных в геноме паразита. В ткани контрольных насекомых-хозяев эти белки отсутствовали (К), а в очищенных стадиях внутриклеточного развития присутствовали в незначительном количестве (Ст). Положительная реакция с антителами в контрольной пробе объясняется так же, как в случае с LRR-204.



**Рисунок 4.** Иммуноблоттинг с антителами против LRR-белка сем. А (orf 204) *P. locustae*.



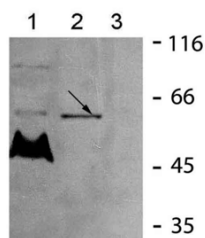
**Рисунок 5.** Иммуноблоттинг с антителами против LRR-белка сем. Б (orf 515) *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела.  
Д – осадок после центрифугирования 100 g;  
М – осадок после центрифугирования 20 000 g;  
С – конечный супернатант.  
К – конечный супернатант контрольного жирового тела;  
Ст – белки стадий внутриклеточного развития.  
Стрелками показаны множественные формы LRR-белков.

#### *Трегалаза P. locustae*

Этот белок *P. locustae*, массой 76.6 кДа, состоит из 669 аминокислотных остатков. Размер зрелой формы фермента без сигнального пептида должен составить около 72 кДа. Иммуноблоттинг (Рисунок 6) показал накопление в супернатанте гомогената зараженного жирового тела саранчи белка с молекулярным весом около 64 кДа. В стадиях внутриклеточного развития белок со сходной молекулярной массой также выявлялся, но в значительно

меньшей концентрации. В пробах незараженного жирового тела саранчи данный белок отсутствовал.



**Рисунок 6.** Иммуноблоттинг с антителами против трегалазы *P. locustae*.

1 - стадии внутриклеточного развития паразита;

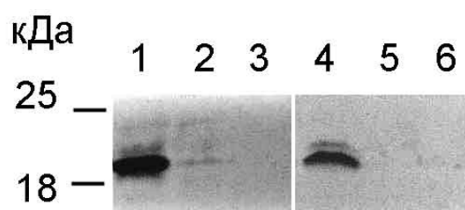
2 - супернатант гомогената зараженного жирового тела саранчи;

3 - супернатант гомогената контрольного жирового тела саранчи.

Поскольку размер обнаруженного белка отличен от предсказанного для трегалазы, для его дальнейшей идентификации необходимо проведение протеомного анализа.

#### *Рицин-подобный лектин P. locustae*

По данным геномного проекта лектин состоит из 166 аминокислот с молекулярной массой около 19.2 кДа. Это полностью соответствует значению, полученному в результате иммуноблоттинга (Рисунок 7). Нативный полипептид специфично накапливается в растворимой фракции гомогената спор (1). Белок практически отсутствует в стадиях внутриклеточного развития паразита (2). Анализ полученных осадков (4 и 5) и конечного супернатанта (6) показал, что весь изучаемый белок осаждается из гомогената зараженной ткани вместе с тяжелыми спорами и стадиями спорогонии уже при первом центрифугировании и практически отсутствует в цитоплазме зараженного жирового тела. Таким образом можно сделать вывод о том, что рицин-подобный лектин *P. locustae* не относится к секретируемым белкам.



**Рисунок 7.** Иммуноблоттинг с антителами против рицин-подобного лектина микроспоридии *P. locustae*.

1 - растворимая фракция спор, 2 - стадии внутриклеточного развития паразита,

3 - белки контрольного жирового тела саранчи,

4 и 5 – осадки, полученные при разных скоростях центрифугирования (100g и 20 000g соответственно) гомогената зараженного жирового тела,

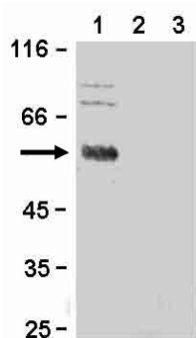
6 – супернатант гомогената зараженного жирового тела.

### Субтилизин-подобная протеиназа *P. locustae*

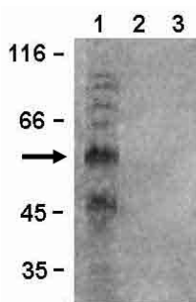
По данным геномного проекта, фермент массой 54 кДа состоит из 491 аминокислотного остатка. Однако, в 5'-фланкирующей области гена в той же рамке считывания ранее обнаружены еще два метиониновых кодона. Это позволило предположить, что фермент микроспоридий может состоять из 515 или 529 аминокислот, причем у обеих удлиненных форм достоверно выявлялся сигнальный пептид, ответственный за их секрецию. Иммуноблоттинг белков спор и стадий внутриклеточного развития паразита (Рисунок 8) показал, что продукт, соответствующий предсказанному размеру (54-56 кДа), накапливается в нерастворимой фракции гомогената спор и отсутствует во внутриклеточных стадиях микроспоридий.

Анализ белков зараженного жирового тела саранчи также показал присутствие субтилизин-подобной протеиназы паразита лишь в осадке после низкоскоростного центрифугирования гомогената ткани насекомого-хозяина, содержащего стадии внутриклеточного развития и споры паразита, но не в цитоплазме инвазированных клеток (Рисунок 9).

Полученные данные позволили подтвердить результаты ОТ-ПЦР и заключить, что изучаемая протеиназа *P. locustae* не секретируется паразитом в цитоплазму зараженной клетки, а связана с нерастворимыми структурами спор (оболочка споры или аппарат экстружии).



**Рисунок 8.** Иммуноблоттинг белков спор и стадий внутриклеточного развития с антителами против субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*.  
1 - нерастворимый осадок после осветления гомогената,  
2 - супернатант после осветления гомогената,  
3 - белок стадий внутриклеточного развития.



**Рисунок 9.** Иммуноблоттинг белков зараженного жирового тела с антителами против субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*.  
1 – осадок гомогената после центрифугирования при 100 g,  
2 - осадок после дополнительного центрифугирования при 20 000 g,  
3 – растворимая фракция гомогената жирового тела.

Таким образом, в результате проведенного нами анализа белков микроспоридии *P. locustae* установлено, что три белка (молекулярный шаперон семейства Hsp 70, рицин-подобный лектин и субтилизин-подобная протеиназа) достоверно не секретируются за пределы клетки паразита. Напротив, для

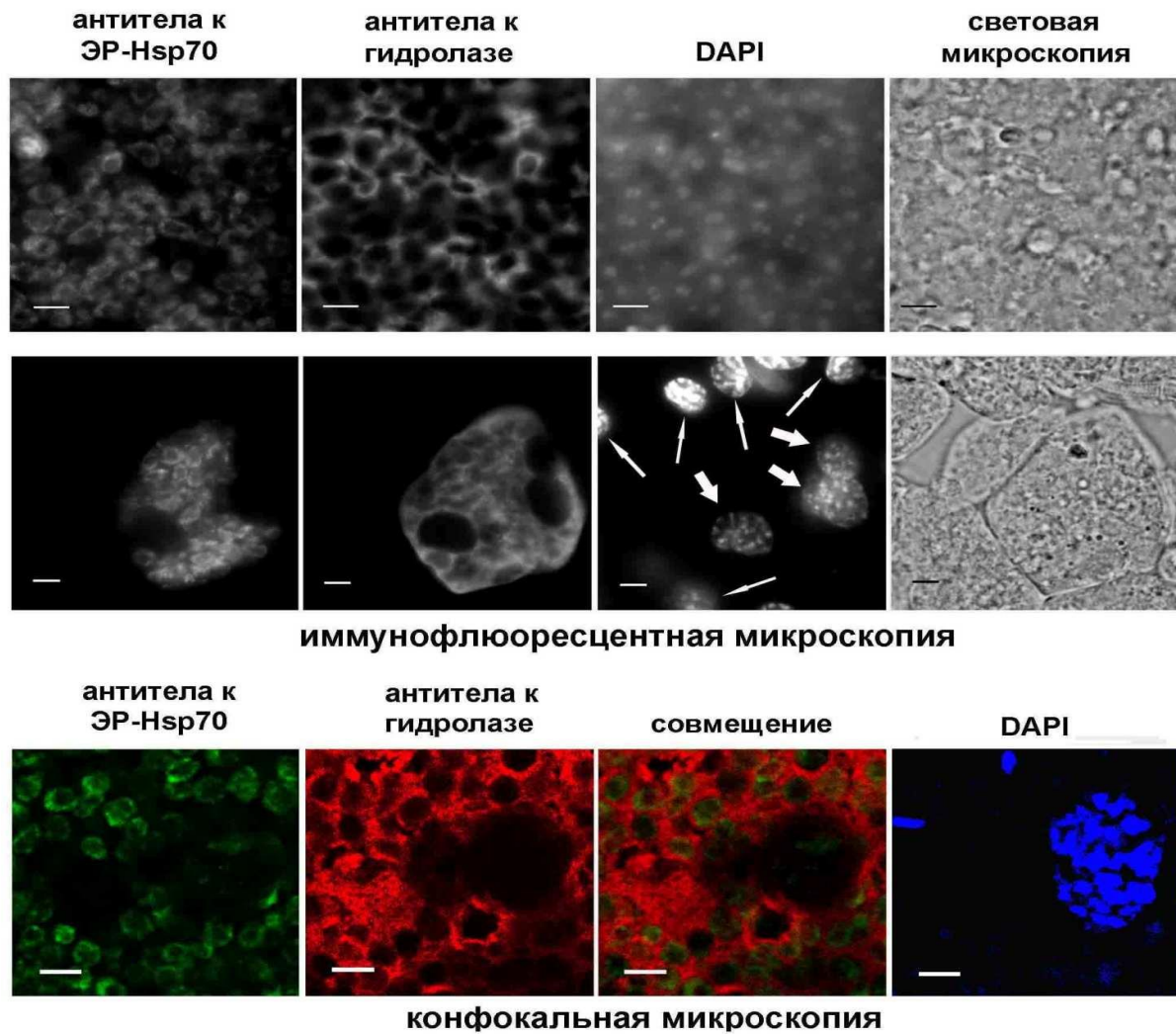
целого ряда белков, распознаваемых антителами против гексокиназы, альфа/бета-гидролазы, трегалазы и двух LRR-белков подтверждено специфичное накопление в цитоплазме зараженной клетки.

**4.3. Иммунолокализация секреторных белков *Paranosema locustae* на криосрезях зараженного жирового тела саранчи, определенная методами иммунофлюоресцентной и конфокальной микроскопии**

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела саранчи антителами к ЭПР-Hsp70 позволило визуализировать меронты и споронты микроспоридий, но не споры и споробласты, так как последние обладают непроницаемой для иммуноглобулинов оболочкой (Рисунок 10, 11). Иммуномечение выявляет обширную сетеподобную структуру в цитоплазме. Скорее всего, эта структура соответствует ЭПР клетки паразита, возможно и аппарату Гольджи, вместе с которым представляет единый комплекс у микроспоридий. Отсутствие рассматриваемого шаперона вне клеток паразита на криосрезях и в растворимой фракции гомогената жирового тела свидетельствует о несекретируемой природе последнего.

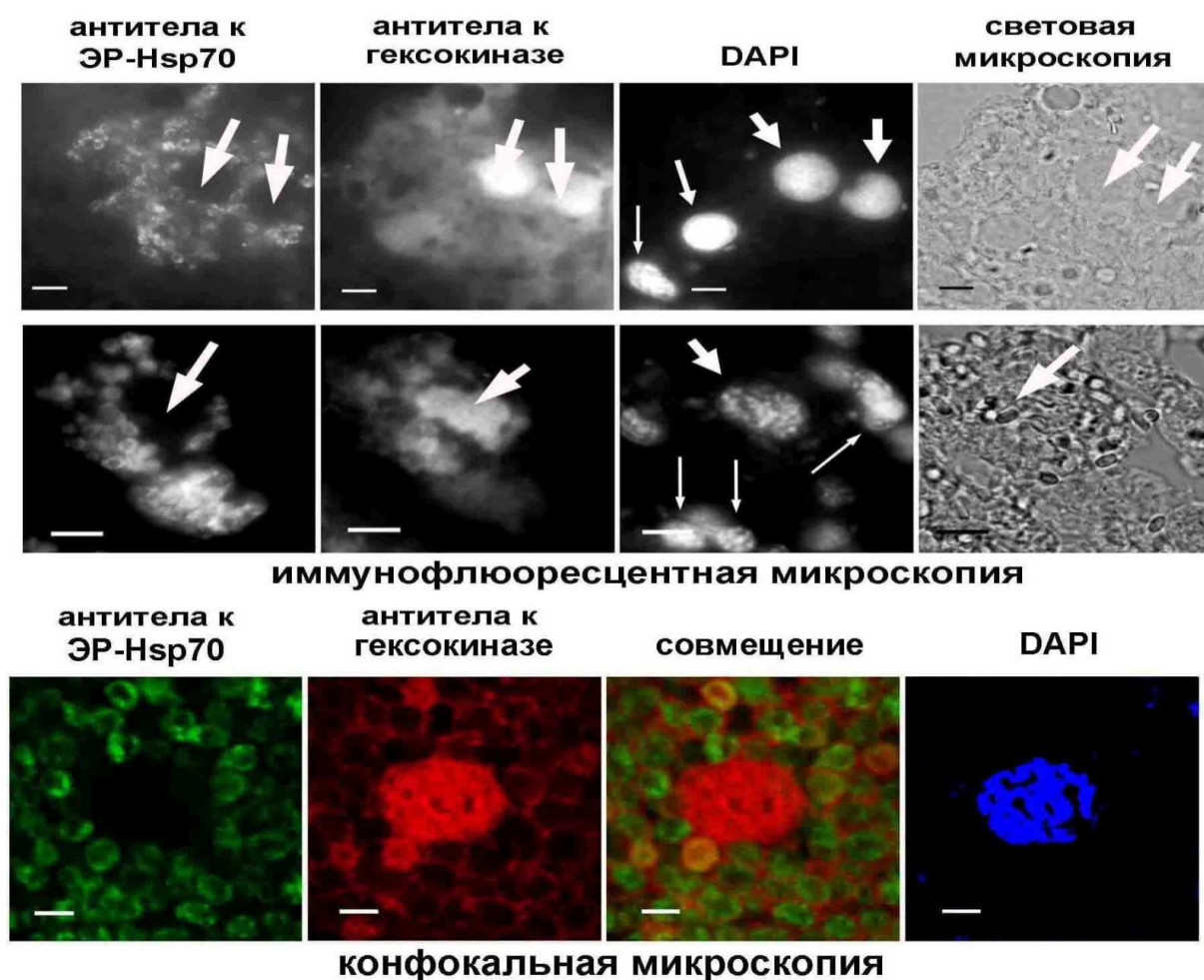
Секреторные белки микроспоридий изучали на срезах методом колокализации с описанным выше ЭПР-специфичным молекулярным шапероном семейства Hsp70. Относительно высокое содержание таких белков наблюдалось в случае гексокиназы и альфа/бета-гидролазы *P. locustae*. Попытки добиться специфического окрашивания срезов зараженного жирового тела антителами к LRR-белкам и трегалазе оказались безуспешными. По всей видимости, это связано с содержанием соответствующих секреторных белков микроспоридии в количестве ниже значений минимального порога чувствительности метода.

Колокализация ЭПР-Hsp70 и альфа/бета-гидролазы подтвердила факт секреции фермента паразита в цитоплазму зараженных клеток жирового тела саранчи. При этом антитела к альфа/бета-гидролазе практически не окрашивали клетки микроспоридий на срезах зараженного жирового тела насекомых. Меронты, споронты, споробласты и споры паразита, а также ядра адипоцитов выглядели на срезах как темные зоны, окруженные ярким свечением в цитоплазме зараженных клеток (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Иммунолокализация альфа/бета-гидролазы в клетках зараженного *P. locustae* жирового тела саранчи на криосрезах. Толстые и тонкие стрелки указывают на ядра зараженных и незараженных клеток соответственно. Средняя по толщине стрелка указывает на ядро клетки хозяина на периферии очага заражения.

Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* на срезах зараженного жирового тела саранчи показала, что специфичные антитела распознают фермент как в цитоплазме хозяина, так и в стадиях внутриклеточного развития паразитов. Некоторые клетки паразита светились даже более ярко, чем окружающая их цитоплазма клетки хозяина. Однако наиболее интересным и значимым результатом оказалось накопление гексокиназы микроспоридий в ядрах зараженных клеток хозяина. 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 (Рисунок 11).



**Рисунок 11.** Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи. Толстые и тонкие стрелки указывают на ядра зараженных и незараженных клеток соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований показали, что геном микроспоридии *P. locustae* содержит ряд генов белков, обладающих N-концевой сигнальной последовательностью секреторного пути, продукты которых можно оценить как факторы патогенности паразита. Причем максимальный уровень транскрипции большинства этих генов отмечен именно в период внутриклеточного развития *P. locustae*.

Анализ накопления белковых продуктов в цитоплазме зараженных клеток саранчи и в клетках микроспоридии показал, что весь комплекс секреторных молекул паразита (секретом) можно разделить на две части в зависимости от того, на какой стадии жизненного цикла паразита происходит секреция. Так, рицин-подобный лектин и субтилизин-подобная протеиназа накапливаются в спорах микроспоридий и могут попасть в окружающую среду при экстружии

зародыша, принимая участие в инфицировании клетки насекомого и развитии начальных стадий патогенеза микроспориоза

Другая часть секретома играет важную роль во взаимоотношениях внутриклеточных стадий паразита и клетки насекомого, когда микроспоридии, находясь в прямом контакте с цитоплазмой адипоцита, удовлетворяют свои энергетические потребности за счет АТФ последнего. Подобная метаболическая зависимость не имеет аналогов среди других эукариот и подразумевает наличие у микроспориций тонких механизмов управления метаболизмом клетки насекомого. Возможно участие в этом LRR белков микроспориций, выполняющих регуляторную функцию благодаря специфической, обогащенной лейциновыми остатками последовательности, необходимой для белок-белкового взаимодействия.

Иммунофлюоресцентное окрашивание срезов зараженного жирового тела саранчи показало значительное накопление в цитоплазме клеток двух секреторных ферментов микроспориции *P. locustae*: альфа/бета-гидролазы и гексокиназы. Для альфа/бета-гидролазы показан полиморфизм богатых пролином последовательностей на С-конце молекулы. Наличие С-концевых пролин-богатых повторов в последовательности гидролазы *P. locustae* свидетельствует о ее функциональной близости к одной из групп мультифункциональных липаз позвоночных. Поскольку истощение запасов триглицеридов в жировом теле насекомых при микроспориозе хорошо известно, секреция паразитической липазы в цитоплазму адипоцитов вполне ожидаема.

Характерная особенность гексокиназы *P. locustae* - четко выраженное на срезах накопление в ядрах зараженных клеток насекомого в центрах очагов инфекции, что свидетельствует о вероятной регуляторной роли гексокиназы микроспориций в качестве транскрипционного фактора. Можно предположить, что гексокиназа *P. locustae*, по аналогии с HxkII *Saccharomyces cerevisiae* (Petit et al., 2000), осуществляет регуляцию экспрессии генов гексозных транспортеров в ядре зараженной клетки, тем самым модулируя процесс поглощения глюкозы из гемолимфы. Такой механизм позволил бы паразиту привлекать для своего развития ресурсы не только отдельных зараженных клеток жирового тела, но эксплуатировать весь орган в целом, оказывая системное воздействие на организм перелетной саранчи, что хорошо согласуется с картиной, наблюдаемой при патогенезе микроспориоза.

## ВЫВОДЫ

1. Секреторные белки *P. locustae*, гены которых активно транскрибируются на различных стадиях жизненного цикла паразита,

оказывают прямое воздействие на процессы патогенеза и обеспечивают управление метаболизмом саранчи.

2. Показано накопление альфа/бета-гидролазы, гексокиназы, двух LRR-белков, трегалазы *P. locustae* в цитоплазме клеток зараженного жирового тела саранчи, что свидетельствует об их участии в воздействии на зараженную клетку саранчи и позволяет рассматривать эти белки в качестве молекулярных факторов патогенности *P. locustae*.

3. Субтилизин-подобная протеиназа и рицин-подобный лектин содержатся только в спорах паразита. Таким образом, эти белки не участвуют в паразито-хозяйинных отношениях на этапе внутриклеточного развития.

4. Секреторная альфа/бета-гидролаза *P. locustae* играет важную роль в истощении липидных резервов клетки хозяина.

5. Ядерная локализация гексокиназы *P. locustae* свидетельствует о ее роли в регуляции транскрипционной активности генов метаболизма зараженных адипоцитов саранчи.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При разработке тест-системы на основе иммуноферментного анализа для диагностики микроспоридиоза природных популяций перелетной саранчи рекомендуется использовать антитела к альфа/бета-гидролазе или гексокиназе *P. locustae*.

2. При исследовании секреторных белков микроспоридий предлагается использовать антитела к ЭПР специфичной форме HSP70 в качестве отрицательного контроля загрязнения проб внутренними белками паразита.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

*Публикации, которые входят в перечень изданий, включенных в международные базы данных*

1. Долгих, В.В. Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria* / В.В. Долгих, **О.А. Павлова**, И.В. Сендерский, Г. Пэн // Вестник Защиты растений. – 2010. – №1. - С. 48-51.

2. Долгих, В.В. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 микроспоридий в изучении секрета внутриклеточных паразитов / В.В. Долгих, И.В. Сендерский, **О.А. Павлова**, С.А. Тимофеев, А.М. Наумов // Паразитология. – 2012. – Т. 46. – Вып. 6. – С. 479-492.

3. Сендерский, И.В. Иммунолокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *Paranosema locustae* Canning в зараженном жировом теле

саранчи. И.В. Сендерский, **О.А. Павлова**, С.В. Тимофеев, В.В. Долгих // Паразитология. - 2014.- Т. 48. - № 1. – С. 63-70.

4. Senderskiy, I.V. Secretion of *Antonosporea (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, **О.А. Pavlova**, V.V. Dolgikh // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9 (4). e93585.

#### ***Публикации в других изданиях***

5. **Павлова О.А.**, Сендерский И.В., Долгих В.В. 2012. Молекулярные аспекты взаимоотношений микроспоридий с зараженной клеткой насекомого-хозяина // Материалы Международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих» Санкт-Петербург-Пушкин. 25-29 марта 2012. С.

6. Сендерский И.В., Долгих В.В., **Павлова О.А.** 2012. Иммунофлюоресцентный метод окрашивания стадий жизненного цикла микроспоридии *Paranosema locustae* // Материалы Международной молодежной конференции «Инфекционная патология членистоногих» Санкт-Петербург-Пушкин. 25-29 марта.