

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ “ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ” (ФГБНУ ВИЗР)

на правах рукописи

Павлова Ольга Андреевна

**Молекулярные механизмы патогенеза микроспориidioза перелетной
саранчи *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera) при заражении *Paranosema
locustae* (Microsporidia)**

Шифр и наименование специальности

03.02.05 - энтомология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат
биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории
Микробиологической защиты растений
ФГБНУ ВИЗР Долгих В.В.

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Современные представления о микроспоридиях.....	12
1.2. Жировое тело насекомых.....	27
ГЛАВА 2. Материал и методы.....	37
2.1. Работа с саранчой, ее заражение и выделение стадий жизненного цикла микроспоридий из насекомых.....	37
2.2. Выделение геномной ДНК и мРНК <i>P. locustae</i>	39
2.3. Компьютерный анализ генома <i>P. locustae</i> и подбор праймеров.....	40
2.4. Оценка уровня экспрессии генов <i>P. locustae</i> методом ОТ-ПЦР.....	41
2.5. ПЦР-амплификация и клонирование выбранных генов.....	42
2.6. Гетерологическая экспрессия генов <i>P. locustae</i> в <i>E. coli</i>	44
2.7. Выделение рекомбинантных белков и получение поликлональных антисывороток.....	44
2.8. Приготовление проб нативных белков <i>P. locustae</i> и иммуноблоттинг.....	46
2.9. Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела саранчи.....	47
ГЛАВА 3. Поиск, клонирование и гетерологическая экспрессия секреторных белков микроспоридии <i>Paranosema locustae</i>.....	49
3.1. Компьютерный анализ генов секреторных белков микроспоридии <i>P. locustae</i>	49
3.2. Анализ уровня экспрессии генов секреторных белков микроспоридии <i>P. locustae</i> в спорах и стадиях внутриклеточного развития паразита.....	55
3.3. Клонирование и гетерологическая экспрессия в бактериях <i>E. coli</i> генов секреторных белков микроспоридии <i>P. locustae</i>	57

ГЛАВА 4. Анализ содержания секреторных белков микроспоридии <i>Paranosema locustae</i> в клетках паразита и хозяина	62
4.1. Подготовка проб зараженного жирового тела саранчи.....	62
4.2. Анализ содержания секреторных белков <i>P. locustae</i> в жировом теле саранчи методом иммуноблоттинга	68
4.3. Иммунолокализация секреторных белков <i>P. locustae</i> на криосрезах зараженного жирового тела саранчи, определенная методами иммунофлюоресцентной и конфокальной микроскопии.....	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
ВЫВОДЫ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	90

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Перелетная саранча *Locusta migratoria* 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* (Henry, 1981; Bjornson, Oi, 2014). Разработка и эффективное применение микробиологических средств против вредных саранчовых, невозможно без изучения природы патогенного воздействия микроспоридий на насекомых на современном уровне. В частности, практически ничего не известно о молекулярных механизмах воздействия этих паразитов на клетку хозяина, позволяющих им управлять физиологическими процессами насекомого.

Микроспоридии - группа филогенетически близких грибам одноклеточных облигатных внутриклеточных паразитов человека и животных. Микроспоридиозы широко распространены среди представителей царства Animalia, включая других одноклеточных. Однако наибольшее распространение микроспоридиальных инфекций отмечено среди насекомых и ракообразных (Соколова, Исси, 2001). В ряде случаев эти паразиты вызывают эпизоотии важных в хозяйственной деятельности человека видов насекомых. В системе защиты растений микроспоридии рассматриваются в качестве перспективного средства, способного сдерживать вспышки массового размножения таких насекомых-вредителей, как кукурузный мотылек, саранча, непарный шелкопряд и др. (Bjornson, Oi, 2014).

Представители этой группы паразитических одноклеточных обладают единым комплексом морфо-функциональных адаптаций, свидетельствующих о глубокой специализации к внутриклеточному паразитизму. К числу таких адаптаций относятся крайняя среди эукариот степень компактизации

генетического и минимизации метаболического аппаратов. Для метаболического аппарата микроспоридий характерна утрата цикла трикарбоновых кислот, классической схемы окислительного фосфорилирования и дыхательной цепи митохондрий. Сами митохондрии микроспоридий (митосомы) в процессе эволюции группы утратили свой геном и подверглись значительной редукции (Dolgikh et al., 2009).

В то же время внутриклеточные стадии развития этих паразитов приобрели способность удовлетворять свои энергетические потребности непосредственно за счет АТФ зараженной клетки хозяина с помощью уникальных АТФ/АДФ-переносчиков (Williams et al, 2008, Tsaousis et al, 2008). Другой важнейшей адаптацией микроспоридий к внутриклеточному паразитизму можно считать уникальный в морфологическом и функциональном плане аппарат экструзии споры. С помощью этого аппарата микроспоридии заражают своих хозяев путем протыкания клеточной мембраны полярной трубкой и передаче по ней зародыша паразита прямо в цитоплазму клетки хозяина (Исси, 1986; Weidner, 1999).

Микроспоридии, паразитируя в клетках различных тканей насекомого хозяина, вызывают сходные патологические процессы (Исси и др., 2005). Так для патогенеза микроспоридиоза характерны дисфункция инвазированных клеток, на ранних этапах заболевания усиление процессов обмена веществ, на поздних - недостаточность энергетических субстратов, нарушения таких процессов как рост, линьки, метаморфоз, созревания половой продукции, миграции, зимовки. Наблюдается дисбаланс ювенильного гормона и экдизона, угнетение защитных реакций. В целом патогенез микроспоридиоза насекомых обусловлен полной зависимостью паразитов от метаболической активности клетки хозяина (Исси и др., 2005). Такая зависимость предполагает наличие единого комплекса молекулярно-биологических механизмов регуляции паразито-хозяинной системы. Один из механизмов такой регуляции, возможно, реализуется через белки, секретируемые паразитом в клетку хозяина.

Роль секреторных белков в паразито-хозяинных отношениях в настоящее время показана для внутриклеточных паразитов, представителей групп

Apicomplexa и Kinetoplastida, где они, по всей видимости, принимают участие в регуляции клеточного цикла и, в частности, блокировании процесса апоптоза, накапливаясь в ядре зараженной клетки (Carmen, Sinai, 2007; Gilbert et al., 2007; Schmuckli-Maurer et al., 2009; Lambertz et al., 2012). Секреторные белки микроспоридий остаются на сегодня неизученными, также как не определена их роль в проявлении факторов патогенности этих паразитов. Принимая во внимание тот факт, что микроспоридии прошли наиболее длительный среди эукариот путь адаптации к внутриклеточному паразитизму можно предположить наличие именно у представителей этой группы уникальных инструментов воздействия на организм хозяина в том числе опосредованных секреторными белками.

В данной работе планировалось на основании анализа генома микроспоридии *P. locustae* выявить гены, кодирующие белки, содержащие сигнальные последовательности секреторного пути, которые могут принимать участие в патогенном воздействии на насекомое-хозяина. Дальнейшее выделение и клонирование белок-кодирующих последовательностей позволило бы осуществить их гетерологичную экспрессию и приступить к анализу соответствующих белков микроспоридий. Наибольший интерес для такого исследования представляли секретируемые гидролитические ферменты паразита, токсины белковой природы, ингибиторы ферментов, углеводов-распознающие лектиноподобные молекулы, белки потенциально вовлеченные в регуляцию внутриклеточных процессов (секретируемые шапероны, протеинкиназы, фосфатазы).

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 запасющих тканей насекомых и других животных в норме и при патологии, вызываемой инфекционными агентами.

Степень разработанности темы исследования. Молекулярные механизмы воздействия внутриклеточных паразитов на зараженную клетку хозяина интенсивно изучаются у представителей двух групп паразитических простейших - Apicomplexa и Kinetoplastida (Nandan et al., 2002; Carmen, Sinai, 2007; Gilbert et al., 2007; Ravindran, Boothroyd, 2008; Schmuckli-Maurer et al., 2009; Lambertz et al., 2012). Так эти паразиты способны блокировать процессы апоптоза и иммунных реакций зараженных клеток путем ингибирования соответствующих сигнальных каскадов и регуляции экспрессии генов клетки хозяина на уровне транскрипции. При этом сигнальные молекулы могут располагаться на поверхности паразита, мембране паразитофорной вакуоли или представлять собой секреторные белки, специфично накапливающиеся в различных компартментах клетки хозяина и свободно взаимодействующие с молекулами-мишенями зараженной клетки.

Например, секреторные белки развивающихся в непосредственном контакте с цитоплазмой лейкоцитов пироплазм рода *Theileria* вызывают обратимую трансформацию (иммортализацию) зараженных клеток. В секретоме *T. annulata* обнаружено уникальное семейство, состоящее из 5 белков, обладающих ДНК-связывающим доменом и транспортируемых в цитоплазму и далее в ядро клетки хозяина (Swan et al., 2001), где, по всей видимости, участвуют в регуляции транскрипционной активности генов хозяина. Кроме того, анализ субтеломерных регионов генома этих паразитов позволил выявить еще одно обширное семейство (85 генов) вариабельных секреторных белков (Schmuckli-Maurer et al., 2009).

Для *Toxoplasma gondii* - другого представителя Apicomplexa, развивающегося в отличие от пироплазм в паразитофорной вакуоли, также показано наличие секреторных белков, транспортируемых в ядро клетки хозяина (Gilbert et al., 2007; Saeij et al., 2007).

Представитель группы Kinetoplastida, возбудитель висцерального лейшманиоза *Leishmania donovani* способен препятствовать активации

зараженных макрофагов используя ряд секреторных факторов белковой природы таких как кислая фосфатаза, регулятор “молчащей” информации 2 (SIR2), фактор элонгации-1 α (EF-1 α) и др. (Lambertz et al., 2012).

В случае микроспоридий, паразитирующих непосредственно в цитоплазме клетки хозяина, есть все основания полагать об исключительной роли секреторных белков паразита в регуляции паразито-хозяинных взаимоотношений. Тем не менее, несмотря на возрастающий интерес исследователей к этой теме, изучение молекулярных механизмов воздействия на хозяина со стороны микроспоридий - самых древних, совершенных и уникальных внутриклеточных паразитов среди эукариот только начинается (Долгих и др., 2010; Cuomo et al., 2012).

Отсутствие данных о белках микроспоридий, секретируемых в зараженную клетку, во многом связано с трудностями, возникающими при работе с этими строго облигатными внутриклеточными паразитами. Такой образ жизни микроспоридий обуславливает невозможность их культивирования вне клетки хозяина и каких-либо манипуляций с паразитическим геномом. Микроспоридий невозможно культивировать на искусственных питательных средах и основным объектом исследования особенностей внутриклеточного развития паразитов остаются зараженная ткань и культуры клеток хозяина.

Жировое тело насекомых, которое является местом поселения микроспоридии *P. locustae*, привлекает пристальное внимание ученых. Во многом это связано с глубокой гомологией метаболических процессов, происходящих в жировой ткани беспозвоночных и позвоночных (человека в том числе) животных (Azeez et al., 2014). В настоящее время в литературе присутствует значительное количество информации о закономерностях запасаания и мобилизации запасных питательных веществ, а также о молекулярных регуляторных механизмах этих процессов (Arrese, Soulages, 2010; Bickel et al., 2009).

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.

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.

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 микроспориidioзов. 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 *Paranosema locustae* на первом этапе проводили при помощи открытых баз данных генетической информации, а также серверов, разработанных для анализа нуклеотидных последовательностей в сети Internet. В ходе дальнейшего выполнения исследования были использованы стандартные методы молекулярной биологии (выделение геномной ДНК, ПЦР-амплификация, клонирование в плазмидном векторе), микробиологии (трансформация бактерий и гетерологическая экспрессия), иммунологии (получение поликлональных антисывороток, очистка антител) и иммунохимии (Вестерн блот гибридизация). Накопление секреторных молекул *Paranosema locustae* в зараженных клетках и тканях саранчи изучалось иммунологически на материале соответствующих белковых фракций и срезах органов.

Степень достоверности и опробация 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), конференции “Инфекционная патология членистоногих” (Санкт-Петербург, 2012).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Современные представления о микроспоридиях

Микроспоридии - одноклеточные эукариоты, представленные облигатными внутриклеточными паразитами животных и человека. В современной систематике микроспоридии *Microsporidia* Balbiani, 1882 в ранге типа отнесены к супергруппе эукариот *Opisthokonta* Cavalier-Smith, 1987 (куда относятся также животные, грибы и многие одноклеточные) и надтипу *Opisthosporidia* sensu Karpov et al. 2014 (вместе с *Aphelidea* и *Cryptomicota*) (Karpov et al., 2014; Исси, Воронин, 2007).

Микроспоридии паразитируют практически у всех представителей крупных таксонов царства *Animalia*, включая других одноклеточных. Наибольшее видовое разнообразие наблюдается у членистоногих - насекомых и ракообразных. В настоящее время насчитывается более 1500 видов, распределенных по 187 родам (Karpov et al., 2014).

Эти паразиты представляют определенный интерес для хозяйственной деятельности человека как возбудители болезней экономически важных видов насекомых (пембрина шелковичного червя, нозематоз медоносной пчелы) (Besnel, 1999), ракообразных (фарфоровая болезнь речных раков и хлопковая болезнь креветок) (Stentiford et al., 2013), а также микроспориidioзов моллюсков (устрицы) (Bower et al., 1994), рыб (тихоокеанский лосось) (Dyková, 1995) и оппортунистических инфекций самого человека (Тимофеев, 2015). Вызывая заболевания насекомых-вредителей, микроспоридии рассматриваются как перспективные агенты биологической защиты, применяемые в сельском и лесном хозяйстве (Henry, 1981).

Микроспоридии обладают целым рядом уникальных признаков, отражающих их глубокую специализацию к внутриклеточному паразитизму. Так все известные представители этого типа обладают единым планом строения споры – расселительной стадии жизненного цикла, в которой, наряду со сложноустроенной оболочкой и генеративным материалом, находится уникальный в морфологическом и функциональном плане аппарат экстррузии (Исси, Воронин, 2007). С помощью этого аппарата микроспоридии заражают клетки своих хозяев путем прокола клеточной мембраны полярной трубкой и вбрасывания по её каналу зародыша паразита прямо в цитоплазму клетки хозяина (Исси, 1986; Weidner, 1999).

В процессе адаптации к внутриклеточному паразитизму микроспоридии прошли один из самых длинных среди эукариот путей компактизации генетического и минимизации метаболического аппаратов. Так размер геномов микроспоридий рода *Encephalitozoon* вполне сопоставим с бактериальным и составляет всего 2 - 3 Mbp (*E. intestinalis* 2,3 Mbp, *E. cuniculi* 2,9 Mbp), и практически лишен интронов (Corradi et al., 2010). Для метаболического аппарата микроспоридий характерна утрата цикла трикарбоновых кислот, классической схемы окислительного фосфорилирования и дыхательной цепи митохондрий. Как крайний случай, у паразита человека *Enterocytozoon biveusi* отсутствуют гены ферментов всего центрального пути метаболизма углеводов, включая гликолиз (Akiyoshi et al, 2009).

В клетке микроспоридий отсутствуют лизосомы, пероксисомы и гидрогеносомы, так же, как и гранулы запасных питательных веществ (Исси, 1986). Митохондрии микроспоридий в процессе эволюции группы утратили свой геном и подверглись значительной редукции, превратившись в митосомы (Dolgikh et al., 2009). Эти паразиты полностью лишены кинетосом и их производных - центриолей и жгутиков (James et al., 2006). Ядерные деления проходят в форме закрытого внутриядерного плевромитоза. Рибосомы не агрегированы в полирибосомы, и по своим физическим (коэффициент седиментации 70S), и молекулярно-биологическим (последовательности участков

pРНК) показателям соответствуют рибосомам прокариотов (Weidner et al., 1999). Аппарат Гольджи микроспоридий трубчатого типа, напрямую связан с ЭПР при полном отсутствии транспортных везикул (Beznoussenko et al., 2007).

Жизненный цикл микроспоридий можно условно разделить на две части: стадии внутриклеточного развития и расселительная инвазионная стадия – спора.

Спора микроспоридий обладает аппаратом экстррузии - уникальным набором органелл, известным только для этой группы одноклеточных (Исси, 1986). Он состоит из полярной трубки, поляропласта, полярного якорного диска и задней вакуоли. Полярная трубка представляет собой цилиндрическую структуру, ограниченную мембранами с содержанием умеренной электронной плотности. Она отходит от расположенного терминально на переднем полюсе споры полярного якорного диска и уложена витками по спирали под оболочкой споры. Поляропласт состоит из большого количества мембран, упакованных в ориентированные перпендикулярно длинной оси споры пластинчатые стопки, везикулы или трубки. Он примыкает к полярному якорному диску, через него проходит базальная часть полярной трубки. Задняя вакуоль представлена одной или несколькими камерами, расположенными на противоположном от поляропласта заднем полюсе позади зародыша. Иногда внутри задней вакуоли располагается постеросома – рудимент аппарата Гольджи.

Кроме аппарата экстррузии другими обязательными компонентами споры микроспоридий служат зародыш и сложно устроенная оболочка. Зародыш представляет собой ядро (одионое или диплокариотическое), окруженное узкой зоной цитоплазмы, в которой находятся свободные рибосомы. Собственной клеточной мембраны зародыш не имеет. Оболочка споры обычно трехслойная и состоит из гликопротеиновой экзоспоры, хитиновой эндоспоры и плазматической мембраны. Оболочка на переднем полюсе споры играет решающую роль в восприятии и передаче внешних стимулов (рН, ферменты хозяина, концентрация ионов и др.), вызывающих экстрезию зародыша, а сама оболочка служит прочной структурой, выдерживающей значительное давление, развиваемое внутри споры в процессе экстрезии (Исси, Воронин, 2007).

При заражении клетки хозяина происходит резкое увеличение размера задней вакуоли, выворачивание наружу полярной трубки, в процессе которого она существенно удлиняется и становится полый. Для удлинения полярной трубки, по всей видимости, используется запас мембран поляропласта. Также есть мнение, что поляропласт, наряду с задней вакуолью, участвует в создании высокого внутриспорового давления, необходимого для проталкивания зародыша по каналу полярной трубки. Зародыш на выходе приобретает собственную плазматическую мембрану (Исси, Воронин, 2007).

Споры микроспоридий, могут какое-то время находиться вне организма хозяина, но им не свойственно состояние покоя и они сохраняют постоянную готовность к заражению новых особей хозяина. Для представителей нескольких филогенетических клад микроспоридий показано накопление в спорах значительных запасов трегалозы и активность ферментов гликолиза (Dolgikh, 1997; Weiss, Becnel, 2014).

Внутриклеточное развитие паразита начинается с попадания амебоидного зародыша – спороплазмы в клетку хозяина вследствие экстррузии полярной трубки. Спороплазма представляет собой ядро, окруженное узкой зоной цитоплазмы и приобретенной в процессе экстррузии плазматической мембраной. Абсолютное большинство микроспоридий развивается в прямом контакте с цитоплазмой, или, значительно реже в перинуклеарном пространстве и ядре зараженной клетки. Некоторые виды заключаются клеткой хозяина в паразитофорные вакуоли. В процессе внутриклеточного развития у микроспоридий происходит ряд клеточных делений, в классическом случае это две мерогонии и одна спорогония, в ходе которых они последовательно проходят стадии спороплазмы, меронтов первого и второго поколений, споронта, споробласта и споры (Исси, Воронин, 2007).

Электронно-микроскопические исследования выявили относительную простоту цитологического строения всех внутриклеточных пролиферативных стадий развития по сравнению с устройством споры. Ядра этих паразитов одиночные или диплокариотические, цитоплазма содержит гладкий и

шероховатый эндоплазматический ретикулум и свободные рибосомы. Внутриклеточные стадии развития микроспоридий удовлетворяют свои энергетические потребности за счет хозяина, приобретая способность непосредственно потреблять АТФ зараженной клетки с помощью уникальных АТФ/АДФ-переносчиков, гомологичных таким переносчикам пластид растений и паразитических бактерий рода *Rickettsia* (Tsaousis et al., 2008; Долгих и др., 2011).

Заселив клетку хозяина и исчерпав ее ресурсы микроспоридии приступают к спорогонии. При переходе к спорогонии клетки микроспоридий обычно окружаются дополнительными оболочками (мембраны споронта и спорофорного пузырька) внутри которых продолжается деление ядер паразита, в результате чего образуются спорогональные плазмодии, дающие начало споробластам. Споробласт представляет собой переходный этап от плазмодимальных стадий внутриклеточного развития (то есть от споронта) к зрелой споре, в котором активно идет формирование всех цитологических структур последней (Исси, Воронин, 2007).

Микроспоридии избирают для своего развития ткани, богатые энергетическими субстратами (жировое тело, зародышевые или питательные клетки женской половой системы), или ткани с высоким уровнем метаболизма (эпителии средней кишки, слюнных и шелкоотделительных желез, мальпигиевых сосудов, часто опухолевые клетки). В большинстве случаев патогены насекомых заселяют клетки жирового тела и кишечного эпителия. Микроспоридии могут вызывать генерализованные инфекции или, в других случаях, заражать только отдельные органы и ткани. Иногда инфекция ограничивается несколькими клетками (Токарев, 2003). Одни виды микроспоридий паразитируют в насекомом на всем протяжении его развития, другие только на определенных стадиях развития (личинках, куколках, или имаго).

Пролиферативные стадии развития микроспоридий окружаются митохондриями клетки хозяина и даже образуют с ними контакты. (Соколова, Исси, 2001). Заражая такую метаболически активную ткань хозяина как жировое тело, микроспоридии вызывают ее гипертрофию. При микроспоридиозах рыб,

вызванных представителями родов *Glugea* и *Loma*, отдельные зараженные клетки достигают размеров в несколько миллиметров, с соединительнотканной оболочкой, выполняющей по отношению к пораженной клетке не столько барьерную, как, преимущественно, трофическую функцию (так называемые ксеномы) (Воронин, Юхименко, 2010).

Патогенез микроспориidioза на ранних этапах заболевания (латентный микроспориidioз) проявляется в усилении обменных процессов в зараженных тканях, совпадающим с активной пролиферацией паразитов (Исси, Онацкий, 1982, 1984). В зараженных клетках гусениц чешуекрылых отмечено резкое возрастание количества митохондрий (Соколова, 1990) и усиленное поглощение ими свободного кислорода (Бабурина и др., 1989; Lewis et al., 1971). Изменяется активность фосфатаз, например, в жировом теле и кишечнике гусениц *Barathra brassicae* и *Galleria mellonella* при заражении микроспориидией *Nosema plodiae* увеличивается активность фосфатаз по сравнению с контролем (Kucera, Weiser, 1974; Kucera, 1978). Изучение свойств кислой фосфатазы позволило установить, что при заражении синтезируется (или активируется) новая специфичная форма фермента хозяина (Kucera, 1978). Напротив, у личинок двукрылых при заражении микроспориидией *Amblyospora sp.* наблюдается снижение активности кислой фосфатазы. Наиболее выражено снижение активности в эпителии слюнных желез и жировом теле (Dvornik, Ovchinnikov, 1992). Снижение активности кислой фосфатазы отмечено также в кишечнике капустной совки при заражении микроспориидией *Vairimorpha antheraeae* (Соколова, 1990).

При этом наблюдается краткосрочная стимуляция защитных систем хозяина, что, однако, не может привести к элиминации патогена. Так для гусениц озимой совки *Agrotis segetum*, зараженных микроспориидией *Vairimorpha antheraeae*, показано, что в период пролиферации паразитов суммарная активность неспецифических эстераз увеличивалась (Yefimenko et al., 2001). Повышение суммарной эстеразной активности и появление индуцибельных изоформ наблюдалось и при микроспориидиозе *Galleria mellonella*, вызванном микроспориидией *Vairimirpha ephestiae* (Лозинская, 2002). Этот эффект может

быть вызван такими проявлениями патогенеза микроспориidioза насекомых, как нарушение липидного обмена, гормонального баланса и последующего снижения репродуктивных функций.

На фоне усиления метаболизма происходит снижение содержания запасных питательных веществ. Очевидно, что основной поток метаболитов при этом направлен на развитие паразита. В зараженных клетках насекомого-хозяина полностью исчезают гранулы гликогена и липидные капли. В целом, в жировом теле зараженных сверчков количество липидов снижается в 2, а гликогена в 3 раза и более (Долгих и др., 1997; Долгих, 1998). При этом содержание различных липидных фракций изменяется по разному (Долгих и др., 2002). В то время как триглицериды, в основном восполняющие энергетические потери, практически полностью исчезают, количество структурных фосфолипидов даже возрастает, что можно объяснить образованием многочисленных мембранных структур в зараженной клетке. Микроспориidioз двупятнистого сверчка сопровождается также потерей запасных белков (Селезнев и др., 1996).

Переход микроспориидий к спорогенезу характеризуется массовым поступлением спор из зараженных клеток в гемолимфу насекомого. При этом основные механизмы клеточного и гуморального иммунитета хозяина полностью или частично блокируются и оказываются неэффективными.

Для спор некоторых микроспориидий установлена способность подавления слияния фагосом с лизосомами путем блокирования процесса закисления фагосомы. Это свойство особенно выражено при контакте спор микроспориидий с фагоцитами неспецифичных хозяев (Sibley, Weidner, 1985). Закисление фаголизосом, содержащих споры микроспориидий *Paranosema grylli* и *P. locustae* в активированных гемоцитах специфичных насекомых-хозяев происходит в 100% случаев как *in vivo*, так и *in vitro* (Токарев, 2003). Это говорит об определенных ограничениях механизма подавления слияния фагосом с лизосомами, направленного на выживание спор микроспориидий при их фагоцитировании. Тем не менее, часть спор, попадающих в фаголизосомы гемоцитов или заключенных в

меланизированные капсулы, остается способной выбросить полярные трубки и заразить другие клетки хозяина. У гусениц капустной белянки *Pieris brassicae*, зараженной микроспоридией *Vairimorpha mesnili*, споры, захваченные одиночными гемоцитами, в массе выбрасывают полярные трубки (Соколова, Исси, 2001).

Паразит круглого червя *Caenorhabditis elegans* - *Nematocida parisii*, также как и возбудитель микроспориidioза медоносной пчелы *Nosema ceranae*, подавляют активность протеасом у своих хозяев, блокируя систему убиквитинилирования. (Yue et al., 2015; Bakowski et al., 2014).

Данные по уровню фенолоксидазной активности гемолимфы в процессе развития микроспориidioза или при инъекции спор в полость тела насекомых позволяют предположить наличие способности микроспоридий подавлять фенолоксидазную систему гемолимфы насекомых-хозяев (Соколова и др., 2000; Лозинская, 2002; Токарев, 2003). Результаты экспериментов с гемолимфой *Gryllus bimaculatus* in vitro показали, что после инкубации монослоев гемоцитов со спорами микроспоридий в течение 1-2 часов доля ФО-положительных гемоцитов резко снижается. Этот эффект наблюдается при контакте спор с гемоцитами не только специфического хозяина, но и других видов прямокрылых. Гемолимфа зараженных *Nosema bombycis* шелковичных червей также имеет более низкий уровень меланизации по сравнению с гемолимфой незараженных. По всей видимости, это связано с секрецией серпинов, которые подавляют сериновую протеиназу каскада меланизации (Ma et al., 2013). Также сериновая протеаза каскада меланизации подавляется в случае инфекции *Nosema ceranae* медоносной пчелы (Aufauvre et al., 2014). В жировом теле сверчка *Gryllus bimaculatus* в очагах массового образования спор микроспоридии *P. grylli* отмечено интенсивное отложение меланина (Токарев, 2003). Однако у большинства описанных в литературе случаев микроспориidioза насекомых даже в острой фазе заболевания не наблюдалось ни меланизации, ни гемоцитарной инфильтрации тканей.

Эффективная агглютинирующая активность гемолимфы насекомых свидетельствует о достаточном уровне соединений, способных связывать чужеродные клетки. Роль агглютининов, в том числе аполипофоринов, в распознавании чужого и активации гемоцитов и фенолоксидазной системы достаточно хорошо изучена у насекомых и других беспозвоночных (Halwani et al., 2000). Для гемолимфы двупятнистого сверчка показан сравнительно высокий уровень агглютинации эритроцитов человека и спор *P. grylli* (Токарев, 2003). На всем протяжении развития микроспориidioза титр агглютинации у сверчка остается на исходном уровне, и только на острой фазе заболевания, сопровождающейся накоплением большого количества меланизированных капсул и гранул, агглютинирующая активность гемолимфы заметно снижена (Токарев, 2003). Вероятно, происходит связывание агглютининов с поверхностью зараженных клеток или меланизированных капсул при реализации защитных реакций. Снижение агглютинирующей активности в гемолимфе сильно зараженных насекомых может быть дополнительным фактором снижения иммунного статуса насекомых-хозяев; однако это не может иметь широкого распространения, так как высокий уровень меланизации при микроспориidioзе известен только для отдельных паразито-хозяинных систем (Токарев, 2003).

Активность фракций неспецифических эстераз с началом спорогенеза также резко снижается и даже полностью подавляется. Изучение эстеразной активности в жировом теле и гемоцитах двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus*, зараженного микроспориидией *Paranosema grylli*, выявило подавление активности на заключительном этапе микроспориidioза при массовом накоплении зрелых спор (Соколова, Сундуков, 1999; Соколова и др., 2000).

Потребляя значительную часть энергетических ресурсов хозяина, паразиты в первую очередь воздействуют на наиболее энергоемкие процессы у насекомых, такие как рост личинок, линьки и созревание половых продуктов. Это приводит к удлинению сроков развития и нарушениям метаморфоза зараженных

микроспоридиями насекомых, в результате которых инфицированные особи погибают (Селезнев и др., 1996).

Заражение микроспоридиями обычно приводит к частичной или полной кастрации своего хозяина, причем у самок яичники либо не развиваются совсем, либо содержат небольшое число развившихся яиц. Снижение плодовитости или тотальная паразитарная кастрация в ряде случаев вызываются патологическими изменениями в самих гонадах, ткани которых заселяются паразитами (Соколова, Исси, 2001). В случае паразитарной кастрации самок двупятнистого сверчка не происходит развитие яичников, но в их гемолимфе возрастает количество вителлогенинов (Селезнев и др., 1997). Вероятно, вителлогенины продуцируются клетками жирового тела, но остаются неостребованными недоразвитыми яичниками. Вообще заселение микроспоридиями тканей или органов и, как результат, их дисфункция, может привести в ряде случаев к отравлению организма продуктами метаболизма, неостребованными этой тканью или органом. Так, известно, что при заражении микроспоридиями *Nosema bombycis* шелкоотделительных желез гусениц тутового шелкопряда *Bombyx mori* насекомые погибали от интоксикации аминокислотами, идущими на построение шелковой нити, но не поступающими в результате болезни в производящие шелк клетки (Исси и др., 2005).

Нарушения процессов линьки и развития гонад может быть обусловлено не только дефицитом питательных веществ. Возможно, эти процессы вызваны целенаправленным воздействием, оказываемым микроспоридиями на эндокринную систему своего хозяина. Действительно, во многих случаях действие патогенов оказывается аналогичным действию ювенильного гормона (Исси, Токарев, 2002). В этой связи можно отметить, что одним из проявлений патологического процесса при микроспоридиозах является ингибирование активности множественных молекулярных форм неспецифических эстераз (Соколова, Сундуков, 1999). Эстеразы в организме насекомых участвуют во многих физиологических процессах. Наиболее существенно их участие в

липидном обмене, в расщеплении ювенильного гормона на последних стадиях личинок при подготовке организма к метаморфозу, в процессах эмбриогенеза и детоксикации организма.

Гормональный дисбаланс ювенильного гормона у многих видов насекомых с полным превращением при микроспоририозах вызывает патологические отклонения, напоминающие картину, вызванную трансплантацией насекомым прилежащих тел *согрома allatae*. Она выражается в сохранении насекомыми при линьках признаков предшествующих стадий и в запрете для зараженных насекомых на метаморфоз и диапаузу (Исси, Токарев, 2002). Основываясь на том, что эстеразы участвуют в снижении титра ЮГ в последних возрастах насекомых, что служит сигналом начала метаморфоза, а активность ряда форм этих ферментов под влиянием микроспориридий резко снижается, можно с достаточно высокой степенью уверенности утверждать о наличии взаимосвязи между падением активности ряда форм эстераз и эффектом избыточности ювенильного гормона у насекомых, зараженных микроспориридиями. В то же время анализ транскриптома *Bombyx mori* при заражении *Nosema bombycis* выявил изменения экспрессии генов, участвующих в синтезе и метаболизме ювенильного гормона (Ma et al., 2013).

Ювенильный гормон также накапливается в больных нозематозом медоносных пчелах, что приводит к замедленному росту и поведенческим девиациям, таким как преждевременный переход рабочих пчел от работы в улье к сбору пищи (фуражировке) (Goblirsch et al., 2013). В целом нозематоз пчел сопровождается и другими нарушениями поведения, самым важным из которых, по всей видимости, является так называемый синдром разрушения колоний. Больные пчелы, вылетая для сбора нектара "забывают" дорогу к своему улью и присоединяются к чужому, что способствует распространению инвазии в экосистеме (Szumowski, Troemel 2015).

Микроспориридия *Paranosema locustae* влияет на поведение своего хозяина – перелетную саранчу, предотвращая появление стадной фазы. Это может

достигаться как путем подавления синтеза допамина, способствующего образованию кулиг у саранчи, так и закислением среды среднего кишечника, что подавляет рост комменсальных бактерий, вырабатывающих феромоны, вызывающие появление стадной фазы (Shi et al., 2015).

Суммируя все вышеизложенные особенности паразитохозяинных отношений можно выделить основные особенности патогенеза, наблюдаемые при микроспориidioзе. Во-первых, это общее стимулирующее действие на ранних стадиях заболевания, которое выражается в усилении процессов обмена веществ, увеличении числа клеточных органелл, и даже повышении резистентности зараженного организма к другим патогенам. Во-вторых, истощение энергетических ресурсов хозяина паразитами и развитием в ответ на заражение репаративных и компенсаторных реакций. В-третьих, это дисфункция зараженных клеток, органов и тканей, вызванная развитием паразитов. Также для микроспориidioзов насекомых характерна картина гормонального дисбаланса ювенильного гормона и экдизона, приводящего к патологиям метаморфоза и поведенческим девиациям. В результате указанных патологических процессов снижается устойчивость хозяев к любым неблагоприятным внешним биотическим (вторичные инфекции) и абиотическим (инсектициды, сублетальные температуры) факторам. Микроспориidioзы приводят к нарушению таких процессов как рост, линьки, метаморфоз, миграции, зимовка. Плодовитость зараженных особей снижается до полной половой стерильности и паразитической кастрации.

К факторам патогенности микроспоридий относят такие способности этих паразитов как то: избегание прямого взаимодействия с защитными системами хозяина, такими как агрессивная среда в кишечнике и системами клеточного и гуморального иммунитета внутренней среды при заражении, подавление фенолоксидазной и других защитных систем хозяина на следующих этапах развития микроспориidioза. А также эксплуатация метаболического аппарата клетки хозяина для обеспечения энергией процессов собственного

внутриклеточного развития и истощение углеводных и липидных резервов зараженных клеток, влияние на активность ферментов хозяина, регулирующих его развитие, избыточная стимуляция компенсаторных и репаративных реакций хозяина в период пролиферации, приводящая к износу соответствующих систем.

Таким образом, патогенез микроспориоза, по всей видимости, имеет системный характер и обусловлен наличием ряда универсальных для разных паразитохозяинных систем факторов патогенности, которые в свою очередь являются следствием морфо-функциональных особенностей паразитов. Так, например, такой фактор патогенности, как способность избегать контакта с защитными реакциями хозяина при заражении, очевидно, является следствием наличия в споре всех микроспоридий уникального аппарата экструзии. Минимизация собственного метаболического аппарата микроспоридий и неспособность самостоятельно эффективно усваивать энергетические субстраты зараженной клетки приводит к необходимости эксплуатации метаболического аппарата хозяина. В тоже время очевидная способность микроспоридий к манипулированию обменом веществ, защитными реакциями, гормональным статусом и поведением зараженных хозяев, возможно, указывает на наличие единого комплекса молекулярно-биохимических механизмов регуляции паразитохозяинной системы, выработанного в процессе эволюции группы на пути адаптации к внутриклеточному паразитизму.

Использование микроспоридиями молекулярных механизмов для манипулирования своими хозяевами подтверждается последними исследованиями паразита круглого червя *Caenorhabditis elegans* - микроспоридии *Nematocida parisii*, внутриклеточные стадии которого используют рециклируемый эндосомальный регулятор RAB-11 хозяина для выхода из зараженных клеток кишечного эпителия без их разрушения. Споры паразита накапливаются в особом мембранном компартменте, связанном с плазматической мембраной на апикальной поверхности клетки, через которую и осуществляется выход паразита в просвет кишечника. При этом происходит индуцированная паразитом перестройка цитоскелета клетки, а именно построенной из специфичной

кишечной изоформы актина АСТ-5 его части (Szumowski et al., 2014; Estes et al., 2011).

Один из молекулярных механизмов такой регуляции, возможно, реализуется через белки, секретируемые паразитом в клетку хозяина. Роль секреторных белков в паразито-хозяинных отношениях в настоящее время активно изучается на примере других одноклеточных - внутриклеточных паразитов, представителей групп Apicomplexa и Kinetoplastida. Возможность существования аналогичных механизмов у микроспоридий подтверждается свежими литературными данными наличия у микроспоридии *Spraguea lophii* рицинподобного лектина, имеющего сигнальный пептид секреторного пути и обнаруживающегося во внешней среде при выстреливании спор паразита (Campbell et al., 2013).

Длительное время исследование молекулярных основ микроспориidioза насекомых было фактически невозможно, так как микроспоридии не культивируются вне клетки хозяина. На сегодняшний день, в связи с развитием молекулярно-биологических методов, такая возможность появилась. В частности, почти завершен проект по расшифровке генома микроспоридии *P. locustae* (*Antonospora locustae* Genom Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole), что позволило приступить к постгеномному этапу исследований. Секреторные белки микроспоридий в целом остаются на сегодня неизученными, так же, как не определена их роль в проявлении факторов патогенности этих паразитов

В связи с этим представляется перспективным изучение молекулярных основ патогенеза микроспориidioза на модельной паразито-хозяинной системе *Locusta migratoria* - *Paranosema locustae*, в которой хозяин относится к опасным вредителям с/х культур. Микроспориidioз, вызываемый *P. locustae* протекает в форме хронического заболевания, выражающегося в общем ослаблении резистентности организма, замедлении развития, снижении плодовитости и повышенной смертности (Canning, 1962). Паразиты заселяют жировое тело, что приводит к его гипертрофии и значительному снижению содержания запасных питательных веществ. Споры *P. locustae* послужили основой создания

биопрепарата для борьбы с саранчовыми (Henry, 1981). Однако хронический характер микроспоридиоза не позволяет использовать этого паразита для быстрого подавления всплеск численности вредителя. В то же время существенное снижение плодовитости саранчи даже при слабом заражении, способность спор длительное время сохранять инфекционность и наличие трансовариальной передачи открывает возможность использовать *P. locustae* как средство для предотвращения всплеск массового размножения вредителя в долгосрочной (несколько лет) после обработки перспективе. Работа по интродукции этой микроспоридии в экосистемы ведутся в ряде стран (США, Китай, Аргентина) (Bjornson, Oi, 2014).

Установление молекулярных факторов патогенности этого паразита позволит с одной стороны усовершенствовать систему биологической защиты растений, а с другой стороны, учитывая определенную универсальность воздействия микроспоридий на своих хозяев, выявить фундаментальные закономерности управления паразитом обмена веществ, защитными реакциями, гормональным статусом и, отчасти, поведением насекомых. Особенный интерес представляют молекулярные механизмы, используемые паразитом для манипулирования обменом веществ зараженных клеток жирового тела насекомых, так как возможные открытия в этой области могут дополнить современные знания о физиологии запасующих тканей насекомых и других животных.

1.2. Жировое тело насекомых

Микроспоридия *Paranosema locustae* развивается в клетках жирового тела насекомого-хозяина (адипоцитах), что приводит к гипертрофии этого органа и существенному снижению в нем содержания запасных питательных веществ. При этом паразит использует в качестве основного энергетического субстрата АТФ клетки хозяина. По всей видимости, микроспоридии обладают способностью манипулировать обменными процессами в зараженной клетке, заставляя ее мобилизовать свои резервы для удовлетворения своих потребностей. В то же время процессы запасаения и мобилизации запасных питательных веществ в жировом теле насекомого имеют сложную систему регуляции как на клеточном, так и на организменном уровне. Изучение особенностей функционирования жирового тела насекомого позволит приблизиться к пониманию тех молекулярных механизмов, которые лежат в основе эксплуатации паразитом метаболического аппарата своего хозяина.

Жировое тело насекомых - орган мезодермального происхождения, расположено непосредственно в миксоцеле и морфологически представляет собой рыхлую структуру в виде отдельных лопасти или тяжей клеток. В жировом теле обычно выделяют два слоя: висцеральный, прилегающий к кишечнику и гонадам, и париетальный, расположенный под интегументом. Лопасты жирового тела омываются гемолимфой, вместе с клеточными элементами которой составляют систему тканей внутренней среды насекомых. Ткань жирового тела преимущественно состоит из заполненных липидными каплями адипоцитов (трофоцитов), основная функция которых состоит в запасаении питательных веществ. Другие клеточные элементы распространены значительно меньше и выполняют узкоспециализированные функции. Уроциты накапливают продукты обмена веществ - ураты, мицетоциты содержат одноклеточных симбионтов (Тыщенко В.П., 1976). Имеющие эктодермальное происхождение эноциты, по

всей видимости, принимают участие в синтезе молекулярных компонентов кутикулы во время линек, а также, подобно гепатоцитам млекопитающих, играют особую роль в жировом обмене во время краткосрочного голодания (Gutierrez et al. 2007).

Жировое тело играет главную роль в хранении и утилизации запасных питательных веществ. Также оно участвует в продукции большинства белков (липофорины, вителлогенины, ряд антимикробных пептидов) и других веществ гемолимфы. Большая часть промежуточного обмена липидов, углеводов и белков идет в этом органе (Arrese, Soulages, 2010). Жировое тело продуцирует переносчики аминокислот, которые выступают в качестве сенсоров голода (Cota et al. 2006).

Запасание питательных веществ в жировом теле определяет такие процессы как рост, линька, созревание половых продуктов. Для насекомых с полным превращением запасаящая функция жирового тела имеет важнейшее значение, так как насекомое должно накопить минимально необходимое количество питательных веществ, чтобы выжить в процессе метаморфоза. Накопленные личинкой ресурсы влияют на плодовитость взрослой особи.

Главными резервными веществами, запасаемыми клетками жирового тела, являются гликоген и липиды. Липиды - как главные компоненты жирового тела составляют более 50% сухого веса этого органа и 90% из них откладываются в виде триглицеридов. Триглицериды образуются из углеводов, жирных кислот и белков, получаемых с пищей. Непосредственные предшественники синтеза триглицеридов - диглицериды, образуются из фосфатидной кислоты в результате глицерофосфатного пути, моноацилглицеролового пути, катаболизма фосфолипидов и диацетилирования триглицеридов под действием липаз. Образование триглицеридов осуществляется эстерификацией диглицеридов, катализируемой диацилглицерол-ацилтрансферазой, с ацил-СоА жирных кислот. Жирные кислоты в жировом теле быстро включаются в состав триглицеридов или, в гораздо меньших количествах, в состав других глицеридов и

фосфолипидов. Жирные кислоты служат предшественниками эйкозаноидов, феромонов, фосфолипидов и восков (Arrese and Soulages, 2010).

Количество гликогена существенно ниже и варьирует в широких пределах в зависимости от краткосрочных колебаний физиологического состояния животного и факторов внешней среды. У насекомых с полным превращением запасы гликогена могут полностью истощаться во время метаморфоза. Гликоген синтезируется из UDP-глюкозы, источником которой являются углеводы и аминокислоты, получаемые с пищей. В тоже время UDP-глюкоза может использоваться и для синтеза трегалозы – основного транспортного углевода насекомых. Обычно UDP-глюкоза идет на построение гликогена, только когда концентрация трегалозы в гемолимфе достигает определенной концентрации (Arrese and Soulages, 2010).

Большая часть углеводов, поступающая с пищей, запасается в виде липидов, а не гликогена. У личинок последнего возраста шелковичного червя (Inagaki, Yamashita, 1986) и у сверчка (Anand, Lorenz, 2008) вначале откладывается жир, а потом гликоген. При этом гликоген, в отличие от липидов, постоянно расходуется при прекращении питания, во время линек и при подготовке к ним. Липиды начинают расходоваться только после исчерпания резервов гликогена.

Липиды откладываются в клетках в виде так называемых липидных капель. Эти структуры можно встретить в клетках разных тканей, однако именно адипоциты являются специализированными клетками для хранения липидов. Липидная капля представляет собой динамическую органеллу, играющую центральную роль в метаболизме жиров и энергетическом обмене (Olofsson, 2009). Она состоит из ядра нейтральных липидов (триглицеридов и холистеиновых эфиров), окруженного слоем фосфолипидов и холистеролов, с которым связаны специализированные белки. Оболочка липидной капли создает механический барьер для доступа липаз к триглицеридам ядра, как за счет низкой растворимости последних в фосфолипидах, так и за счет биохимических особенностей белков оболочки. Таким образом, оболочка липидной капли играет

важнейшую роль в регуляции липолиза. По всей видимости, эта регуляция осуществляется при помощи эволюционно консервативных белков семейства PAT (Brasaemle, 2007). Эта группа белков широко распространена среди эукариот и у грибов, и у позвоночных животных. Их объединяет гомология последовательностей и связь с липидными каплями. У позвоночных PAT белки локализованы в липидных каплях или постоянно (перелипин, ADRP), или в ответ на липогенетический или липолитический сигнал (TI47, S3-12, OXPAT и др.). Из них лучше всего изучен перелипин. Он представляет собой эффективный регулятор липолиза в адипоцитах позвоночных, где в зависимости от уровня фосфорилирования предотвращает или стимулирует липолиз. Перелипин в области N-конца белковой молекулы содержит PAT-домен, несколько сайтов фосфорилирования PKA, последовательность с отрицательно заряженными аминокислотными остатками Asp и Glu и три гидрофобных последовательности для заякоривания в неполярном ядре липидной капли (Brasaemle, 2007; Bickel et al. 2009).

В жировом теле насекомых обнаружены два PAT белка: Lsd1 и Lsd2 (lipid storage droplet) (Bickel et al. 2009). Оба эти белка ассоциированы с липидными каплями и демонстрируют сходство аминокислотных последовательностей на N-конце между собой и с белками позвоночных. Lsd2, по всей видимости, отвечает за накопление липидов (барьер для липаз), тогда как Lsd1 за активацию липолиза. Lsd2 экспрессируется на протяжении всех стадий развития и необходим для нормального запасания липидов. Гиперэкспрессия и делеция Lsd2 ведет у *Drosophila* к увеличению или уменьшению содержания триглицеридов соответственно. Кроме жирового тела Lsd2 обнаружен в крыловых имагинальных дисках и в большом количестве в яичниках. Недостаток Lsd2 также связан с уменьшением содержания липидов эмбриона, что предполагает его участие в накоплении липидов развивающегося ооцита (Teixeira, 2003). Кроме Lsd1 и Lsd2 на поверхности липидных капель насекомых обнаружены и другие ассоциированные с ней белки, по всей видимости, также вовлеченные в промежуточный обмен жиров.

Мобилизация запасных питательных веществ в жировом теле осуществляется под контролем центральной нервной системы посредством адипокинетического гормона (АКГ), синтезирующегося в кардиальных телах (*corpora cardiaca*). АКГ приводит к переводу запасенных триглицеридов и гликогена в диглицериды и трегалозу гемолимфы. У некоторых насекомых АКГ также стимулирует синтез пролина. Эффект АКГ зависит от стадии развития. Так этот гормон активирует гликогенолиз у личинок и липолиз у взрослых насекомых (Gade et al., 1997). Механизм действия АКГ связан с быстрым повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и cAMP, что приводит к активации cAMP зависимых протеинкиназ A (ПКА) (Arrese et al., 1999).

Главным фактором в активации липолиза является фосфорилирование белков семейства PAT, ассоциированных с оболочкой липидной капли и конкретно белка Lsd1 этими протеинкиназами (Arrese et al., 2008), что открывает доступ липазам к содержимому липидной капли.

Гидролиз триглицеридов липидных капель у насекомых катализируется двумя идентифицированными в настоящее время липазами: ATGL (липаза триглицеридов жирового тела) или липаза Брюммера и TGL (триглицеридлипазой). TGL обладает триглицерид- и диглицеридлипазной, а также фосфолипазной A1 активностью. Она достаточно консервативна среди насекомых и имеет значительную гомологию с фосфолипазами A1 позвоночных (семейство PA-PLA1). ATGL относится к кальций-независимым фосфолипазам A2 (семейство iPLA2), также представленным у позвоночных. Фосфолипазы A2 кроме липазной обладают и трансацилазной активностью (Arrese et al., 2006). У *Drosophila* выключение гена ATGL приводит к перенакоплению триглицеридов и появлению “толстых” мух, а его гиперэкспрессия к появлению “тощих” особей (Gronke, 2005).

В меньшей, по сравнению с фосфорилированием PAT-белков липидных капель, степени увеличение липазной активности под действием АКГ связано с изменениями в цитоплазматическом компартменте, в частности фосфорилированием TGL (Patel, 2006). Такая АКГ-зависимая активация

цитоплазматической триглицеридлипазной активности показана для чешуекрылых, жесткокрылых и прямокрылых.

Базальная, АКГ-независимая активность TGL регулируется двумя регуляторными доменами этой липазы и имеет место также в цитоплазме (Arrese et al., 2006). Изменение уровня базальной липолитической активности происходит при голодании и прямо связано с циркулирующими в гемолимфе углеводами (трегалозой и глюкозой). ATGL также может участвовать в базальной и отчасти АКГзависимой липазной активности. По всей видимости, активность ATGL насекомых регулируется белком, гомологичным белку CGI-58 млекопитающих (Gronke et al., 2007).

Наличие множественных сайтов фосфорилирования TGL и Lsd1 подразумевает существование комплекса механизмов регуляции липолиза в жировом теле насекомых.

Гликоген расщепляется под действием гликоген фосфорилазы. Этот фермент катализирует распад гликогена до глюкозо-1-фосфата, который превращается в глюкозо-6-фосфат. Последний, наряду с UDP-глюкозой, идет на синтез трегалозы или поступает в гликолиз. Гликогенфосфорилазная активность наблюдается в жировом теле насекомых во всех периодах развития и, особенно, в периоды линек и метаморфоза, когда служит источником энергии и глюкозы для синтеза хитина. Синтез трегалозы в жировом теле представляет собой энергетически затратный процесс. При этом показано, что синтез трегалозы сопровождается окислением жирных кислот у тараканов. Ингибирование β -окисления прекращает выделение трегалозы, вызванное АКГ (McDougall et al., 1988).

АКГ-зависимая мобилизация гликогена осуществляется посредством фосфорилирования гликогенфосфорилазы, при этом фермент переходит из β -формы, активируемой cAMP, в постоянно активную α -форму. β -форма активируется cAMP и ингибируется ADP, ATP и глюкозой. α -форма активна сама по себе и не ингибируется ATP. Это позволяет жировому телу расщеплять гликоген в ответ на энергетические запросы других тканей, сохраняя свой

высокий энергетический потенциал. В клетках других тканей, например летательных мышцах *Manduca sexta*, гликогенолиз останавливается при достижении физиологических концентраций АТФ (Arrese and Soulages, 2010).

Для того, чтобы направить весь образовавшийся в результате гликогенолиза глюкозо-6-фосфат на синтез трегалозы в адипоцитах должен быть исключен гликолиз. Это достигается снижением концентрации фруктозо-2,6-дифосфата (Ф-2,6-Ф2) главного аллостерического регулятора фосфофруктокиназы - ключевого регуляторного фермента гликолиза. Снижение Ф-2,6-Ф2 также вызывается АКТ, что подтверждается ингибиторным эффектом кардиальных тел на гликолиз в жировом теле (Arrese, Soulages, 2010). Также Ф-2,6-Ф2 в жировом теле прямо связан с концентрацией глюкозы в гемолимфе. Показано, что концентрация глюкозы в гемолимфе быстро и существенно меняется при голодании и возобновлении питания гусениц *Manduca sexta*. Эти изменения прямо коррелируют с содержанием Ф-2,6-Ф2 в адипоцитах. Таким образом, глюкоза гемолимфы по всей видимости играет важную роль в регуляции углеводного метаболизма жирового тела и может служить индикатором его состояния (Meyer-Fernandes et al., 2001).

Другим гуморальным фактором, приводящим к мобилизации энергетических резервов является нейрогормон октопамин. Этот гормон выделяется во время стресса. Действие этого гормона на адипоциты опосредовано рецепторами, связанными с G-белками, вызывая изменение внутриклеточной концентрации Са и сАМР (Arrese, Soulages, 2010).

Транспортные формы липидов и углеводов в гемолимфе насекомых представлены диглицеридами и трегалозой. Они задействуются для разных целей таких как обеспечение полета топливом, снабжение яичников и общего поддержания метаболической активности тканей, включая само жировое тело.

Диглицериды переносятся к другим тканям с помощью особого липопротеина – липофорина (Arrese and Soulages, 2010). Увеличение концентрации транспортных диглицеридов в гемолимфе существенно возрастает при голодании (у *Locusta migratoria* – в три раза, у *Manduca sexta* – в два раза).

При введении трегалозы концентрация липидов в гемолимфе снижается, что свидетельствует о наличии связи между концентрациями липидов и трегалозы в гемолимфе. Трегалоза оказывает ингибирующий эффект на липолиз в жировом теле (показано для упомянутых выше насекомых) (Arrese, Soulages, 2010). Концентрация липидов в гемолимфе также возрастает при иммунном ответе на некоторых внутриклеточных паразитов (*Plasmodium falciparum* – *Anopheles gambiae*). При этом происходит и увеличение уровня транскрипции гена липофорина (Mendes, 2008).

Секреция трегалозы адипоцитами осуществляется с помощью специальных мембранных транспортеров (Kikawada T. et al., 2007). Трегалоза является основным источником энергии для тканей насекомого и топливом для полета. Насекомые с коротким полетом, такие как тараканы *Periplaneta americana*, используют фактически только трегалозу, в то время как насекомые, способные находиться в воздухе часами, например, саранча, сначала расходуют трегалозу и потом переключаются на липиды. У жуков основным топливом для работы летательных мышц служит пролин, у пчел - исключительно эндогенные и поступающие с пищей углеводы (Arrese, Soulages, 2010).

Гормональная регуляция обеспечения энергией летательных мышц обеспечивается совместным действием октопамина и АКГ. У *Locusta migratoria* в начале полета увеличение концентрации диглицеридов в гемолимфе происходит в два этапа. Первый самый быстрый пик концентрации диглицеридов в первые минуты полета вызван увеличением титра октопамина, тогда как следующий (после 15 минут полета), более продолжительный этап повышения концентрации связан с действием АКГ (Orchard et al., 1993). Возможно, секреция АКГ кардиальными телами вызвана снижением концентрации трегалозы вскоре после начала полета. В то же время трегалоза и глюкоза ингибируют высвобождение АКГ из адипокинетических клеток. Уровень трегалозы и глюкозы оказывает прямое воздействие на секрецию АКГ кардиальными телами (Passier et al., 1997).

Липиды составляют 30-40% сухого веса ооцитов насекомых и являются основным источником энергии для развивающегося зародыша. Подавляющая

часть липидов транспортируется из жирового тела. Накопление липидов яичниками сопутствует существенному снижению липидных запасов в жировом теле (Ziegler, 2001). В соответствии с важностью липофорина в оогенезе, экспрессия аполипопротеиновых генов и липопротеиновых рецепторов увеличивается в процессе вителлогенеза. Кроме липофорина определенное количество липидов переносится в яичники с помощью вителлогенина, также имеющего происхождение из жирового тела (Tufail, 2009). Также в тканях яичника в значительных количествах накапливается гликоген, где синтезируется из глюкозы, поступающей из гемолимфы после гидролиза трегалозы. Возможно, накопление гликогена в яичнике находится под управлением гормона диапаузы (Arrese, Soulages, 2010).

Распространенным энергетическим транспортным субстратом гемолимфы служит пролин. Он образуется в жировом теле из ацетил-СоА и аланина и затем попадает в гемолимфу. У ряда насекомых пролин служит основным топливом для полета (*Leptinotarsa decemlineata*, *Glossina morsitans*) причем у этих насекомых синтез пролина сопровождается мобилизацией жировых запасов. Концентрация пролина и транспортных липидов в гемолимфе при полете и при стимуляции АКГ параллельно возрастают (Arrese, Soulages, 2010).

Таким образом, жировое тело представляет собой депо запасных питательных веществ, расходуемых не только для поддержания перманентного энергетического баланса организма насекомого, но также зарезервированных для строго определенных целей, таких как метаморфоз, полет и репродуктивная функция. Основой запасов второго рода служат триглицериды, накапливающиеся в особых клеточных компартментах – липидных каплях. Процессы запасаения и мобилизации триглицеридов липидных капель осуществляются через эволюционно консервативные молекулярные механизмы, во многом гомологичные тому, что показано для млекопитающих. Действие этих молекулярных механизмов опосредовано РАТ-белками, участвующими в их фосфорелировании РКА, а также гормонами (АКГ и октопамин) и их рецепторами. Очевидно, что процессы запасаения и мобилизации триглицеридов

липидных капель находятся под контролем ЦНС для предотвращения их преждевременного истощения до достижения критических стадий жизненного цикла насекомого.

Микроспоридии, паразитируя в клетках жирового тела насекомых, приводят к истощению запасных питательных веществ своего хозяина. В зараженных клетках полностью исчезают гранулы гликогена и липидные капли. При этом сами микроспоридии в период своего внутриклеточного развития удовлетворяют свои энергетические потребности непосредственно за счет АТФ клетки хозяина. Можно предположить, что эти паразиты активизируют метаболизм зараженной клетки, сдвигая энергетический баланс в свою пользу. В тоже время при микроспориidioзе очевидно происходит гидролиз содержимого липидных капель, доступ к которому ограничен РАТ-белками до достижения насекомым определенной стадии жизненного цикла. Это может свидетельствовать о способности микроспоридий преодолевать такие барьеры при помощи своих гидролитических ферментов или белков, принимающих участие в регуляции липолиза триглицеридов липидных капель. По всей видимости, эти гидролитические ферменты и регуляторные белки могут иметь секреторную природу, т. е. выделяться паразитами в цитоплазму зараженной клетки хозяина.

Глава 2. Материал и методы

2.1. Работа с саранчой, ее заражение и выделение стадий жизненного цикла микроспоридий из насекомых

Работа проводилась на лабораторной культуре бездиапаузного изолята *Locusta migratoria* из инсектария Московского зоопарка. Вся саранча относится к стадной форме. В качестве корма в летний период насекомым предлагали тростник, в зимний период – проростки пшеницы. Саранча содержалась в деревянных садках, затянутых мельничным газом, при 30-32°C. Для откладывания кубышек в садки помещали плошки с торфом.

Заражение саранчи (личинок III-IV возрастов) осуществляли стандартной дозой спор *P. locustae*, равной 10^6 спор на особь. При этом споры смешивали с мелко нарезанными листьями травы с таким расчетом, чтобы заражаемая группа съела этот корм за сутки (Vavra, Maddox, 1976). Появление первых стадий внутриклеточного развития при микроскопировании мазков жирового тела обычно наблюдали спустя две недели после заражения.

Очистку внутриклеточных стадий развития микроспоридий осуществляли по методу, разработанному Селезневым К.В. (Селезнев и др., 1994; Seleznjov et al., 1995). Отпрепарированное зараженное жировое тело саранчи гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе тефлоновым пестиком в фосфатно-солевом буфере ФСБ (138мМ NaCl, 3мМ KCl, 1.5мМ KH_2PO_4 , 8мМ Na_2HPO_4 , pH 6.8). Гомогенат фильтровали при помощи шприца и насадки через вату и бумажный фильтр для задержки грубых осадков. Полученную суспензию центрифугировали при 80 g 8 минут, верхний слой осадка, содержащий стадии внутриклеточного развития микроспоридий, аккуратно отбирали пипеткой и наслаивали на 20%-ный раствор Перколл на ФСБ. 20% Перколл заранее центрифугировали в пробирках при 17000 g 20 мин. Затем пробирки со стадиями внутриклеточного развития центрифугировали при 600 g 10 минут и отбирали вошедшее в Перколл верхнее,

содержащее паразитов, кольцо белого цвета. Стадии внутриклеточного развития отмывали 2-3 раза в ФСБ, осаждая центрифугированием в течение 10 минут при 160 g. Все операции, начиная с гомогенизации жирового тела, проводили при 4°C.

Споры микроспоридий выделяли при помощи центрифугирования после гомогенизации зараженной ткани насекомого в водном растворе. С целью получить высокоочищенные споры мы дополнительно применили следующие подходы (Долгих, 1997):

- инкубацию спор с лизоцимом для разрушения клеточной стенки бактерий, которые могут загрязнять препарат спор при хранении;

- обработку спор неионным детергентом Тритон X-100 для солюбилизации возможных примесей с последующей качественной отмывкой в воде. Ниже приведено подробное описание процедуры очистки.

Отпрепарированное жировое тело гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением воды и центрифугировали при 200 g 10 минут в узких пробирках (бакет-ротор). В осадке отбирали нижний белый слой, образованный спорами микроспоридий (Selesnev et al., 1995), ресуспендировали его в воде и повторяли центрифугирование и отбор спор несколько раз до образования чистого белого осадка. Споры наносили на 80% глицерин и центрифугировали при 800g 15 минут. Жидкость над глицерином и верхний слой глицерина (приблизительно 1/5 объема) отбирали, а оставшийся объем разводили в 3 раза водой и центрифугировали при 200 g 10 минут. Споры отмывали от глицерина центрифугированием при том же режиме, ресуспендировали осадок в 100 mM трис-HCl буфере (pH 7.8), содержащем 0.3 M сахарозу и лизоцим (5 мг/мл) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Затем к суспензии спор добавляли детергент тритон X-100 до конечной концентрации 0.1% и инкубировали 30 минут при тех же условиях. Споры тщательно отмывали в воде от растворенных веществ, центрифугируя при 200 g 10 минут несколько раз и ресуспендировали осадок в свежеприготовленном 100 mM трис-HCl буфере (pH 7.8), содержащем 0.3 M сахарозу.

2.2. Выделение геномной ДНК и мРНК *P. locustae*

Разрушение спор микроспоридий различных видов представляет собой достаточно сложную проблему для исследователей, так как споры имеют малые размеры и прочную оболочку. Для высвобождения содержимого спор часто подбирают условия экструзии спороплазмы (температура, добавление в инкубационную среду различных ионов, перекиси водорода). Кроме того, применяют сложные процедуры разрушения спор с использованием сложного оборудования и жидкого азота. Мы успешно использовали метод разрушения спор в ручном стеклянном гомогенизаторе с очень плотно притертым стеклянным пестиком (Долгих, 1997). Очищенные споры гомогенизировали в течение 30-40 минут при +4° С. При этом наблюдалось разрушение или экструзия около 50% спор, и появление в гомогенате значительного количества растворимого белка. Степень разрушения или экструзии была выше при гомогенизации густой суспензии спор.

Общую РНК спор и стадий выделяли с помощью реагента PureZOL (Bio-Rad) и очищали согласно инструкции производителя. Предварительно споры замораживали в жидком азоте в фарфоровой чашке и растирали пестиком до образования суспензии. К 200 мкл суспензии растертых спор или стадий внутриклеточного развития, содержащим 3×10^8 клеток паразита, добавляли 1 мл реагента, инкубировали 5 минут на льду и 5 минут при комнатной температуре. После добавления 0.2 мл хлороформа суспензию держали на льду еще 5 минут и центрифугировали 15 минут при 14000 g. К отобранной верхней фазе добавляли 0.5 мл изопропанола и после 5 минут инкубации на льду РНК осаждали центрифугированием при тех же условиях. Осадок тщательно отмывали 75 % этанолом и растворяли в 50 мкл воды, не содержащей примеси РНК и ДНК. Примесь ДНК разрушали в присутствии ингибитора РНКазы и очищенной от РНКазы ДНКазы I (Fermentas, Life Technologies) в течение часа при 37°С. После добавления 0,15 мл хлороформа суспензию центрифугировали при 13000 g. 10 минут. К верхней фракции добавляли 15 мкл 3М натрия ацетата и 0,3 мл 100%

этанола. Образовавшийся осадок центрифугировали 15 минут при 13000 g. и тщательно отмывали 70% этанолом. Растворяли осадок в 20 мкл воды, не содержащей примеси ДНК и РНК.

Для выделения геномной ДНК споры разрушали с помощью VORTEX в присутствии 2.5мм стеклянных шариков (BDH, Англия) в течение 30 мин. в 0,01 М ФСБ pH 7.3 в присутствии протеиназы К (100 мг/мл) и додецил сульфата натрия (ДСН) при комнатной температуре. Суспензию разрушенных спор инкубировали 1 час при 37° С и, в дальнейшем, ДНК экстрагировали по стандартной методике очистки фенол/хлороформом с последующей отмывкой 70% этанолом. РНКазную обработку (0.05 мг/мл) проводили в течение 1 часа при 37° С и последующей повторной экстракцией фенол/хлороформом и осаждением этанолом.

Концентрацию ДНК и РНК измеряли спектрофотометрическим методом в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 260 нм.

2.3. Компьютерный анализ генома *P. locustae* и подбор праймеров

Поиск потенциально секретируемых белков микроспоридий осуществляли с помощью пакета программ для молекулярной биологии DNA Star, а также серверов, доступных в сети Интернет. Наличие в составе белковой молекулы N-концевого сигнального пептида, ответственного за его секрецию, определяли с помощью сервера SignalP 3.0 и 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), а предполагаемую внутриклеточную локализацию белков оценивали с помощью сервера TargetP 1.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson et al., 2007). Также использовались такие интернет-ресурсы как SIG-Pred (http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.htm), Signal-3L (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L>) и PrediSi (<http://www.predisi.de>). Они позволяют получить информацию о вероятности наличия сигнального пептида и его длине и, следовательно, предположить с определенной степенью вероятностью молекулярную массу зрелого белка и его предшественников.

Трансмембранную топологию белков и наличие гидрофобных трансмембранных доменов изучали с помощью серверов HMMTOP (Tusnady, Simon, 1998, <http://www.enzim.hu/hmmtop/>) и TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Предполагаемую функцию белков и сходство с известными последовательностями оценивали с помощью BLAST-серверов Национального Центра Биотехнологической информации США (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Все праймеры для амплификации генов и их фрагментов подбирались согласно результатам расшифровки генома *P. locustae* (Antonospora locustae Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272 <http://www.forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01>).

2.4. Оценка уровня экспрессии генов *P. locustae* методом ОТ-ПЦР

Для ОТ-ПЦР анализа синтезировали кДНК в 20 мкл раствора, содержащего 2.5 мкг РНК, 10 mM Трис-НСl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM каждого дНТФ, 1 мкг олиго-дТ в качестве затравки, 200 Е MLV-обратной транскриптазы (ОТ) и ингибитора РНКазы в течение часа при 37°C. ОТ инактивировали 5 минут при 95°C и использовали 1.6 мкл смеси для постановки ПЦР в суммарном объеме реакции 20 мкл. Таким образом, в каждую пробирку добавляли количество кДНК, синтезированное на 200 нг суммарной РНК. Реакционная смесь помимо кДНК содержала 67 mM Трис-НСl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl₂, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль соответствующих праймеров и 2.5 Е *Taq* ДНК полимеразы (Силекс). Матрицу денатурировали 3 минуты при 94°C, и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов, каждый из которых включает денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг (58°C, 30 сек) и синтез (72°C, 30 сек). В контроле в качестве матрицы используют 1 мкг геномной ДНК (положительный контроль) или смесь для синтеза кДНК без добавления ОТ (отрицательный контроль).

2.5. ПЦР-амплификация и клонирование выбранных генов

ПЦР-амплификация полноразмерных копий и фрагментов генов проводили с помощью высокоточной *Pfu*-полимеразы (Fermentas) и специально подобранных праймеров. В качестве матрицы использовали ранее выделенную геномную ДНК паразита. Реакционная смесь (20 мкл) содержала 1 мкг геномной ДНК, 20 mM Трис-НСl (pH 8.8), 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль соответствующих праймеров и 1.25 Е *Pfu* ДНК полимеразы (Fermentas). Матрицу денатурировали 3 минуты при 94°C и амплифицировали ДНК в течение 30 циклов, каждый из которых включал денатурацию (94°C, 30 сек), отжиг (58°C, 30 сек) и синтез при 72°C.

Для рестрикции ДНК использовали ферменты рестрикции, узнающие соответствующие участки последовательностей нуклеотидов, и соответствующий буфер, специфичный для фермента.

Разделение ДНК проводили в 1% агарозном геле в буфере 1X TAE (60,5 г Трис, 4,5 г ЭДТА, pH 8.0) при постоянной силе тока 80мА на гель. Для утяжеления смешивали водные растворы проб ДНК с 50% глицерином и красителем бромфеноловым синим.

После разделения в агарозном геле фрагменты ДНК вырезали скальпелем, помещали в микроцентрифужные пробирки, плавили при 55°C, добавляли двойной объем 6M NaI и инкубировали 5 минут. Затем добавляли 5 мкл. 10% суспензии SiO_2 (Sigma-Aldrich) и в течение 5 минут перемешивали при 55°C. Осадок осаждали центрифугированием 5 секунд при 14000g и отмывали 4 раза буфером, содержащим 10mM Tris pH 7,5, 50mM NaCl, 25 mM EDTA и 50% этанол. Осадок ресуспендировали в 15 мкл воды и элюировали ДНК 5 минут при 55°C с последующим центрифугированием 1 минуту при тех же условиях.

Для встраивания фрагментов ДНК в вектор приготавливали смесь для лигирования объемом 10 мкл, содержащую: 50 - 400 нг клонируемого фрагмента ДНК, линеаризованный с помощью ферментов рестрикции вектор, взятый в соотношении 1:3 по отношению к количеству вставки, 40 mM Трис-НС (7.8), 10

мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ АТФ, 2.5 Е Т4 лигазы. Лигирующую смесь инкубировали при 22°C 1 час, либо 12 часов при 18°C, затем инактивировали лигазу при 65°C 15 минут и использовали для трансформации бактерий.

Компетентные клетки для трансформации бактерий плазмидной ДНК в присутствии CaCl_2 готовили согласно методу, описанному в литературе (Okayama, 1999). Для трансформации использовали 200 мкл подготовленных клеток *E. coli* (штамм DH5). Клетки с добавленной инактивированной после лигирования смесью инкубировали 30 минут на льду. Процедуру теплового шока проводили 30 секунд при 42°C. Затем инкубировали клетки при 37°C 1 час в растворе SOC (SOB (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl_2), 10 мМ MgSO_4 , 20 мМ глюкоза). Предварительно центрифугированные на небольшой скорости (3000 g) трансформанты высаживали на твердую среду LB (с добавлением на 200 мл. 50 mg ампицилина, 4-6 mg X-gal и 1,2-2,5 mg IPTG) и инкубировали 12 часов при 37°C.

Трансформированные клетки проверяли при помощи ПЦР-скрининга. В качестве матрицы использовали небольшое количество аккуратно собранных стеклянными палочками клеток из отдельно выросших на твердой среде LB колоний. ПЦР реакцию проводили в присутствии Taq ДНК полимеразы (от 1 до 1,5 единиц), 10X Taq буфера, dNTP с финальной концентрацией 0,2 мМ, 25 мМ MgCl_2 , прямого и обратного праймеров (10 пмоль). Выбор праймеров зависит от вектора со встроенным участком ДНК. Для вектора pBlueScript KS(+) (Stratagene) со встроенным lacZ промотером использовали M13 праймеры, для вектора pRSET (Invitrogen) - праймеры T7. Температура отжига праймеров составляет 58°C при времени экстенции 2 мин.

Колонии, давшие положительный результат при ПЦР-скрининге, выращивали в жидкой среде LB (с добавлением ампицилина) 12 часов при 37°C. Осаждали на небольшой скорости (3000g) в течение 5 минут. Ресуспендировали в равном объеме в растворе 1 (50 мМ глюкоза, 10мМ EDTA, 25 мМ Tris pH 8). К полученной суспензии добавляли 200 мкл раствора 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) и

инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Смешивали со 150 мкл раствора 3 (60 мл ацетата К 5М, 11,5 мл глицерол ацетата, 28,5 мл. воды) и инкубировали 5 минут на ледяной бане. Центрифугировали 10 минут при 14000 g. И смешивали супернатант с 1 мл изопропанола. Осаждали ДНК при 14000g и отмывали 70% этанолом. Проводили РНКазную обработку (1,5 мл ТЕ, 20 мкл РНКазы 10 mg/ml) в течение 20 мин. при 37°C.

2.6. Гетерологическая экспрессия генов *P. locustae* в *E. coli*

Аmplифицированные копии генов были клонированы и встроены с сохранением рамки считывания в экспрессирующий вектор pRSET (Invitrogen), созданный для экспрессии чужеродной ДНК в бактериях под контролем промотора РНК-полимеразы фага Т7. Гетерологическую экспрессию осуществляли в *E. coli* штамм С41, созданный для эффективной наработки белков на основе клеток BL21(DE3) (Miroux, Walker, 1996). Свежие колонии бактерий, трансформированные полученной конструкцией, инокулировали в среду LB, содержащую ампицилин (100мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C без добавления или с добавлением изопропил--D-тиогалактопиранозида (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 1мМ. Бактерии осаждали центрифугированием при 3000g 10 минут, отмывали дистиллированной водой и разрушали ультразвуком в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.3 М NaCl. Белковые включения осаждали при 1500 g 10 минут, тщательно отмывали тем же раствором в присутствии 0.5% Тритона X-100 и рекомбинантный белок экстрагировали раствором 8М мочевины, удаляя нерастворенный дебрис центрифугированием при 14000 g 5 минут.

2.7. Выделение рекомбинантных белков и получение поликлональных антисывороток

Рекомбинантные белки разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле по методу Лэмли (Laemmli, 1970). К белковым пробам добавляли 1/20 часть объема 2-меркаптоэтанола, ДСН до конечной концентрации 2%, незначительное количество водного раствора бромфенолового синего до появления синеватой окраски. Пробы инкубировали при 90° С в течение 5 минут, центрифугировали при 6000 g 10 минут и наносили в карманы геля, уравновесив по содержанию белка. Гели окрашивали на белок с использованием красителя Кумасси G-250.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали водный раствор бычьего сывороточного альбумина.

Полученные в результате гетерологической экспрессии рекомбинантные белки использовали для иммунизации животных (кролики и мыши) и получения поликлональных антисывороток. Для этого рекомбинантные белки, выделяемые из клеток *E. coli* в виде тел включения, растворяли в 8М мочеvine, разводили в 50 мМ растворе Tris-HCl pH 7,5 до необходимой концентрации и использовали в качестве иммуногена. Растворимые рекомбинантные белки очищали методом аффинной металло-хелатной хроматографии (ICAM) на Ni-колонке и также использовали для иммунизации. Предварительно иммуноген смешивали с равным объемом адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich), полным для первой инъекции и неполным для последующих. Мышей иммунизировали с помощью четырех внутрибрюшинных инъекций (около 0.07 мг белка на инъекцию) с десятидневным интервалом. Кроликов иммунизировали внутримышечно по 0.20 мг белка по той же схеме, что и для мышей. Через 10 дней после последней иммунизации осуществляли отбор крови. Для очистки специфичных антител, около 0.5 мг рекомбинантных белков разделяли с помощью ДСН-ПАГЭ в 12% геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) и окрашивали с помощью Понсо. Полоски мембраны, соответствующие перенесенному белку, аккуратно

вырезали, отмывали ТТБС (50 мМ Трис-НCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.05% Tween-20), блокировали 1 час при комнатной температуре в ТТБС в присутствии 1% БСА и инкубировали с 50 мл иммунной сыворотки, 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 (раствор без добавления Tween-20), антитела элюировали в 250 мкл 0.2 М глицин-НCl (pH 2.5), нейтрализовали добавлением 15 мкл 1М Трис (не титрованного) и 2.5 мкл 5М NaCl. Элюцию повторяли несколько раз, фракции объединяли, концентрировали с помощью концентратора Microcon (Millipore) и очищенные антитела хранили при -20°C в присутствии БСА (1мг/мл) и 50% глицерина.

2.8. Приготовление проб нативных белков *P. locustae* и иммуноблотинг

Содержание нативных белков микроспоридий изучали методом Вестерн блот при помощи полученных поликлональных антител. Для этого споры *P. locustae* были разрушены механическим способом с помощью стеклянных бус размером 425-600 мкм в ФСБ. В ходе последовательного центрифугирования гомогената при 100g и 20000g приготовлены три фракции: грубый осадок, внутриклеточные мембраны и фракция растворимых белков. Все три фракции выровнены по объему и приготовлены пробы для ДСН-ПАГЭ.

Для получения проб растворимых белков зараженной ткани хозяина жировое тело саранчи мягко разрушали в растворе Рингера для клеток насекомых с помощью стеклянного гомогенизатора и неплотно пригнутого тефлонового пестика. Споры и стадии внутриклеточного развития микроспоридий осаждали при 100 g 10 мин, супернатант дополнительно центрифугировали при 20000 g 20 мин и растворимую фракцию анализировали с помощью иммуноблотинга. В качестве контроля использовали жировое тело незараженных особей саранчи. Стадии внутриклеточного развития (меронты и споронты) *P. locustae* были очищены центрифугированием в градиенте плотности Перколла по ранее

разработанной методике (Seleznev et al., 1995). Разрушение выделенных стадий осуществляли в присутствии ФСБ при повторении 4 раза процедуры замораживания/оттаивания или с помощью двукратной обработки ультразвуком в течение 15 секунд. Препараты разрушенных стадий центрифугировали при 430000 g 30 мин, осадки ресуспендировали в ФСБ до объема супернатанта и анализировали с помощью иммуноблотинга.

Для иммуноблотинга пробы белков переносили на PVDF мембрану производителя Mini-PROTEAN[®] или нитроцеллюлозу (Bio-Rad), с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot[®] согласно инструкции. Мембраны блокировали час в присутствии ТТБС, 1% растворе БСА и инкубировали в таком же растворе с очищенными антителами в течение ночи при 4°C. После отмывки ТТБС, мембраны инкубировали 2 часа при комнатной температуре с разведенными ТТБС антивидовыми вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad). После очередной отмывки ТТБС мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции, содержащем ТБС, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich), 0.02% H₂O₂.

2.9. Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела саранчи

Зараженное *P. locustae* жировое тело перелетной саранчи препарировали и фиксировали 4% параформальдегидом на PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,76mM KH₂PO₄, pH 7,4). Затем образцы ткани инкубировали в 50mM глицерине на PBS, осуществляли криопротекцию в 30% сахарозе и замораживали в жидком азоте. Криосрезы толщиной 10 мкм изготавливали на криотоме Microm HM 520 и помещали на предметные стекла.

В дальнейшем криосрезы блокировали в 1% растворе БСА на ТТБС, инкубировали с первыми антителами ночь при температуре 4°C, отмывали ТТБС и инкубировали с антивидовыми флюоресцентными конъюгатами AF 488 и AF 546 (Life Technologies). Первые и вторые антитела использовали в разведении

1:50. Для визуализации ядер срезы дополнительно окрашивали ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол). Готовые препараты просматривали на флюоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioImager M1.

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

3.1. Компьютерный анализ генов секреторных белков микроспоридии *P. locustae*

С целью выявления генов, кодирующих секреторные белки, потенциально вовлеченные в паразито-хозяинные отношения, проведен компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей микроспоридии *P. locustae*. Эти последовательности стали доступны в результате расшифровки генома этого паразита и выложены в открытый доступ в сети интернет (Antonosporea locustae Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272). С помощью сервера SignalP и TargetP проведен поиск последовательностей, кодирующих белки с N-концевым сигнальным пептидом, ответственным за их поступление в секреторный путь. При этом в первую очередь интерес представляли секретируемые белки, у которых отсутствуют трансмембранные домены и сайты, ответственные за связь с мембранами, что позволяло предположить их транспортировку за пределы клетки паразита. Такие трансмембранные белки и белки, локализованные на внешней поверхности цитоплазматической мембраны паразита, также могут играть важную роль во взаимоотношениях с зараженной клеткой хозяина, однако их изучение выходит за рамки этого исследования. Чтобы исключить последние, мембранную топологию и наличие гидрофобных трансмембранных доменов проверяли с помощью серверов HMMTOP и TMHMM Server v. 2.0. Предполагаемую функцию белков и сходство с известными последовательностями оценивали с помощью BLAST-серверов Национального Центра Биотехнологической информации США (NCBI).

В результате проделанной работы выявлено несколько генов, кодирующих секреторные белки, потенциально вовлеченные в паразито-хозяинные отношения. У всех найденных белков с определенной долей вероятности был предсказан N-

терминальный сигнальный пептид и исключено наличие трансмембранных доменов, что в полной мере соответствует критериям поисков (Таблица 1).

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
α/β -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

Из обнаруженных последовательностей наибольший интерес представляет группа, кодирующая секреторные гидролитические ферменты. В эту группу входят последовательности, кодирующие 3 гидролазы (субтилизин-подобную протеиназу, альфа/бета гидролазу, трегалазу) и одну киназу (гексокиназа). Эти ферменты, возможно, могут принимать участие в паразито-хозяинных отношениях микроспоридий с зараженной клеткой жирового тела насекомого. Так, показано, что различные гидролитические ферменты (протеиназы, липазы, хитиназы) играют важную роль в патогенезе, вызванном энтомопатогенными грибами *Metarhizium anisopliae* (Leger et al., 1986). Протеолитические ферменты и, в частности, субтилизин-подобная протеиназа секретируются такими паразитами

как *Trypanosoma brucei* (Bossard et al., 2013) и *Plasmodium falciparum* (Tawk et al., 2013; Agarwal et al, 2013).

Ген субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*, представленный в геномном проекте (orf 939) не имеет выраженного сигнального пептида. Однако анализ 5'-фланкирующей области гена выявил в той же рамке считывания еще два стартовых кодона, кодирующих метионин, что позволило предположить, что фермент микроспоридии может иметь более удлиненный N-конец, чем это ранее предполагалось. Поскольку компьютерный анализ достоверно выявил наличие сигнального пептида у обеих удлиненных форм субтилизин-подобной протеиназы с дополнительной аминокислотной последовательностью, данный белок стал кандидатом на роль секретируемого фактора, участвующего в паразито-хозяйинных отношениях аналогично субтилизин-подобным протеиназам таких паразитов, как *Plasmodium falciparum* и *Trypanosoma brucei* (Тимофеев и др., 2014) (Рисунок 1).

Обнаруженная в геноме *P. locustae* секретируемая эстераза, представитель суперсемейства альфа/бета-гидролаз, может участвовать не только в расщеплении метаболитических субстратов хозяина, но и в регуляции уровня ювенильного гормона в гемолимфе насекомых.

Трегалаза – фермент, способный расщеплять трегалозу – основной транспортный дисахарид в гемолимфе насекомых. В тоже время этот резервный дисахарид накапливается в спорах микроспоридий, что может свидетельствовать о функциональной аналогии с филогенетически близкими дрожжевыми грибами. Однако обнаруженный у *P. locustae* ген нейтральной трегалазы не имеет гомологии с аналогичным геном дрожжей, но сходен (31% идентичности) с мембранной формой трегалазы щеточной каемки многоклеточных животных. Поскольку трегалаза *P. locustae* содержит сигнальный пептид секреторного пути, но не содержит гидрофобного домена для встраивания в цитоплазматическую мембрану, выделение фермента за пределы клетки паразита весьма вероятно.

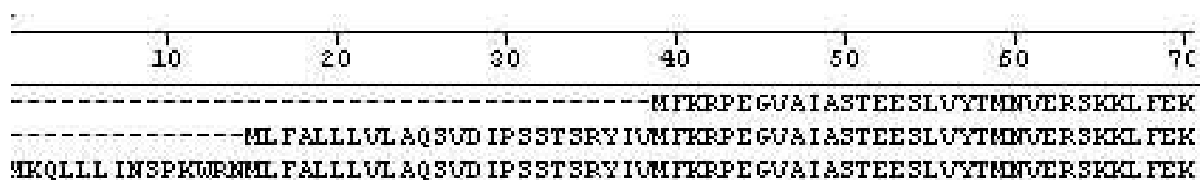


Рисунок 1. 5'-фланкирующая область гена субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae* содержит в той же рамке считывания еще два метиониновых остатка. В верхней строчке последовательность, представленная в геномном проекте; ниже формы с удлинённым N-концом (вторая и третья строчки сверху) достоверно располагающие сигнальным пептидом.

Большой интерес представляет гексокиназа – фермент, фосфорилирующий свободную глюкозу. Факт наличия сигнального пептида у гексокиназы *P. locustae* уникален для гетеротрофных организмов, поскольку ранее такая особенность была обнаружена только у гексокиназ растений, ассоциированных с внешней мембраной хлоропластов и митохондрий.

Такие ферменты как альфа/бета-гидролаза, трегалаза и гексокиназа могут непосредственно участвовать в расщеплении внутриклеточных субстратов жирового тела насекомых, направляя энергетические резервы хозяина на нужды паразита. Таким образом, секреторные гидролазы микроспоридий можно рассматривать как факторы патогенности этих паразитов, изучение которых представляет несомненный интерес.

Большая группа последовательностей кодирует белки, содержащие обогащенные остатками аминокислоты лейцин повторы (leucine rich repeats, LRR-белки). По данным компьютерного анализа 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 относятся 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. При этом внутри каждой группы идентичность последовательностей 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 orf 204 и orf 515 (номер orf из базы данных *Antonospora locustae* Genome Project) (Рисунок 2).

Два других обнаруженных в геноме *P. locustae* и обладающих сигнальным пептидом белка также возможно выполняют регуляторную функцию в системе паразит-хозяин. Это один из представителей молекулярных шаперонов семейства Hsp70 и углевод-распознающий лектин, сходный с В-цепью белкового токсина рицина. По всей видимости, последний 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 (Таблица 2). Праймеры подобраны с учетом сохранения открытой рамки считывания для дальнейшей успешной гетерологичной экспрессии соответствующих белков. Также праймеры подобраны к молекулярному шаперону семейства Hsp70 *P. locustae*, согласно данным компьютерного анализа лишённого известных сигнальных последовательностей и накапливающегося, по всей видимости, в цитоплазме паразита. Этот шаперон будет использован в качестве контроля целостности клеток паразитов при приготовлении белковых проб зараженного жирового тела и как возможный маркер цитоплазматического компартмента при иммунофлюоресцентном окрашивании срезов зараженного жирового тела.

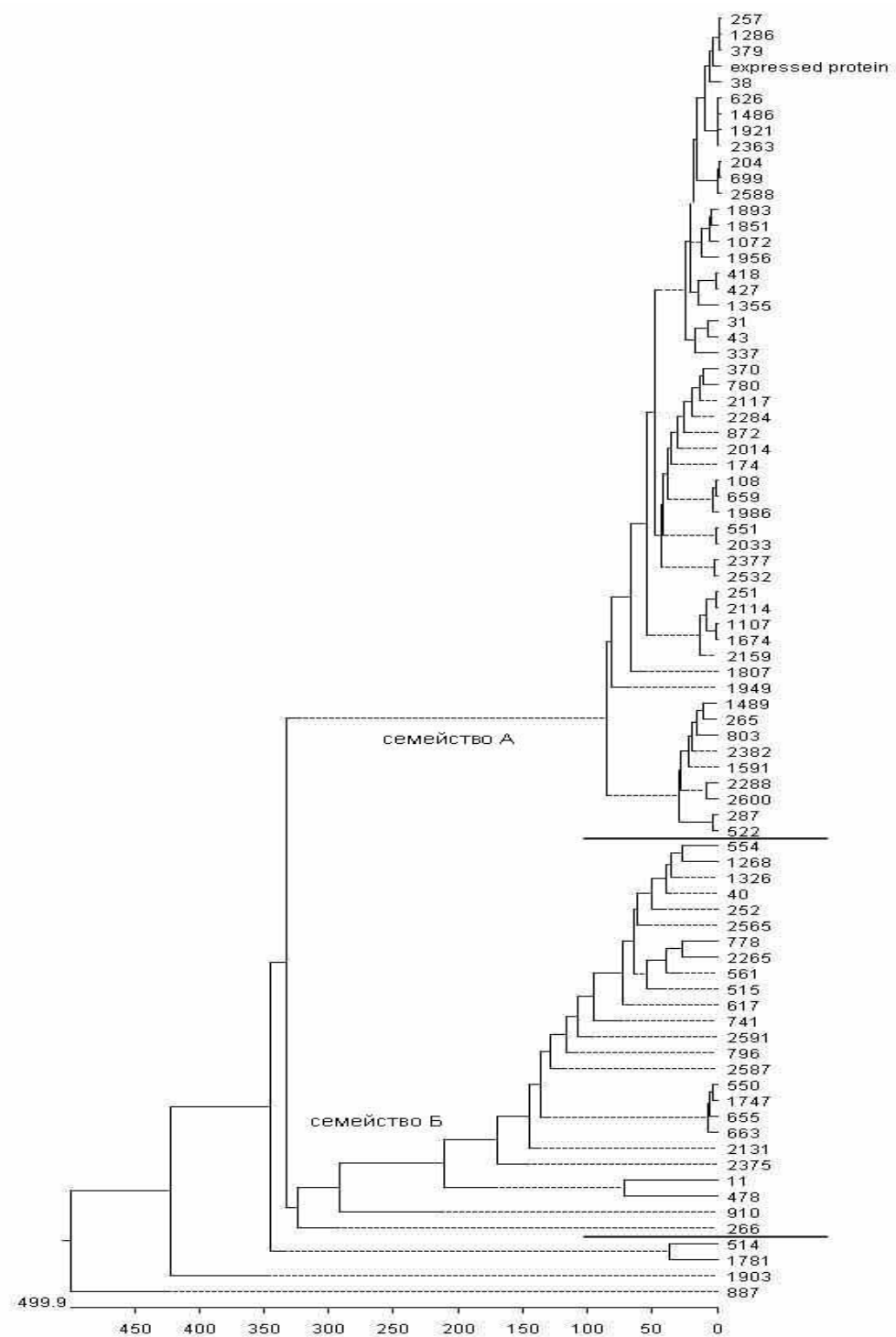


Рисунок 2. Гомология LRR-белков микроспоридии *P. locustae*. Числа соответствуют номеру orf из геномного проекта (*Antonospora locustae* Genome Project; <http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01>).

Таблица 2. Праймеры для ПЦР-амплификации соответствующих генов, рестриктазы для молекулярного клонирования в составе праймеров и полный размер нуклеотидной последовательности генов.

Ген	Праймеры (прямой/обратный)	Рестриктазы	Полный размер гена, bp
Субтилизин-подобная протеиназа	CCATGGATCCATGTTCAAAAGGCCCGAGGGCGTT GTCAGAATTCACGTATCCTCGTGAGTCTC	BamHI/EcoRI	1476
α/β -гидролаза	CCATGGATCCATGCTGCCTGAGATCATCATGAAG GTCAGAATTCTTACTCATCAAAAGCAACAACCTG	BamHI/EcoRI	1119
Трегалаза	CCATGGATCCATGACACATTTGTTGATCACAAGC GTCAGAATTCTACACCTCAAGGGGAACCAC	BamHI/EcoRI	2010
Гексокиназа	CCAACTCGAGATGAGGATGCTTTTGATCTTTGC GTCAGAATTCTACTCAACTAAGAAGGAAGC	XhoI/EcoRI	1416
Рицин-подобный лектин В	CCATGGATCCCATGCAAATATATTCTATTCTTA GTCAGAATTCTAATGTAAATTTTTTTTGCGA	BamHI/EcoRI	501
LRR-белок (orf 204)	CCATGGATCCATGATCAGAAATGCAGCATGTGT GTCAGAATTCATCTGCCTGATGCTGCTGTGCT	BamHI/EcoRI	993
LRR-белок (orf 515)	CCATGGATCCATGTATCTGCAGAGAATGATGT GTCAGAATTCTTAGTCACACACGCCATAACTT	BamHI/EcoRI	2049
Белок теплового шока Hsp70 с сигнальным пептидом	CCATGGATCCATGCTGTTCTGGTTACTAGCTCTC GTCAC <u>TGCAGT</u> CAAAGCTCTTCTCTCATTTTCT	BamHI/PstI	2040
Белок теплового шока Hsp70 без сигнального пептида	ATGCCTCGAGACCAGCAAGGAGATAGATGCA GCATGGTACCTTAAAGCTCCTCCAGCATCTTGATAC	XhoI/KpnI	1947

3.2. Анализ уровня экспрессии изучаемых генов в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*

Проверку транскрипционной активности изучаемых генов осуществили при помощи метода ОТ-ПЦР. В основе метода лежит амплификация ДНК по кДНК матрице, полученной при помощи обратной транскриптазы (ОТ). При этом в качестве отрицательного контроля на присутствие примесей геномной ДНК в пробах используется смесь для синтеза кДНК без добавления обратной

транскриптазы. РНК выделяли из двух источников: спор и стадий внутриклеточного развития, определяли концентрацию и добавляли в реакционную смесь в равных количествах в соответствующие пробы. В результате получили возможность не только оценить уровень экспрессии как таковой, но и провести его сравнение между функционально различными состояниями микроспоридий: спорами и стадиями внутриклеточного развития.

Как показал проведенный анализ, наибольший уровень транскрипции большинства изучаемых генов наблюдался в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий. В спорах паразита транскрипционная активность изучаемых генов была существенно ниже или отсутствовала (Рисунок 3).

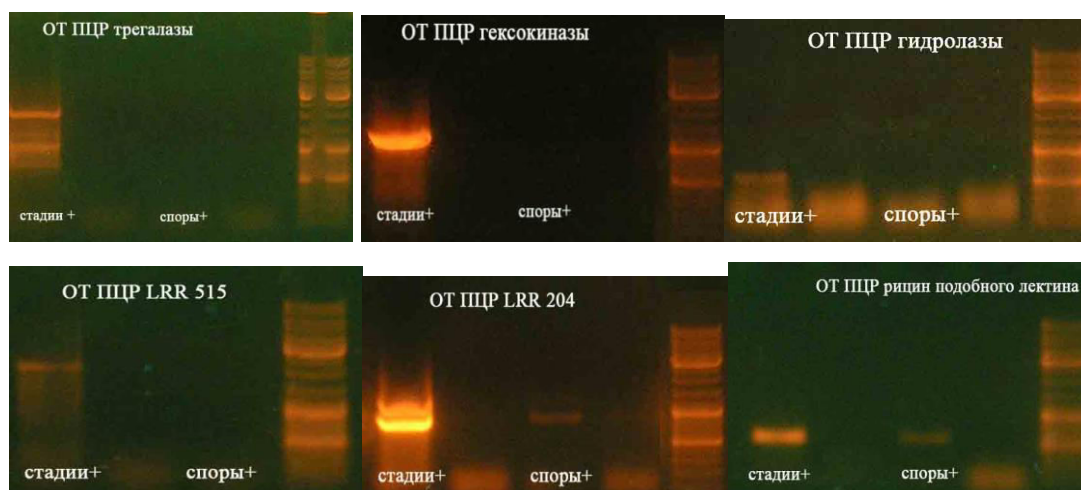


Рисунок 3. ОТ-ПЦР генов трегалазы, гексокиназы, альфа/бета -гидролазы, риксин-подобного лектина и LRR-белков *P. locustae*.

Исключение составил ген, кодирующий субтилизин-подобную протеиназу. В отличие от других изучаемых генов паразита содержание транскриптов мРНК этого гена было сравнимым на всех стадиях жизненного цикла паразита (Рисунок 4).



Рисунок 4. ОТ-ПЦР для гена субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*.

Такие результаты, по всей видимости, позволяют предположить, что субтилизин-подобная протеиназа микроспоридий выполняет какую-то роль в физиологии спор и не участвует в паразито-хозяинных отношениях при внутриклеточном развитии. 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 быть задействованы в паразито-хозяинных отношениях.

Таким образом, на данном этапе исследования нами подтверждена транскрипционная активность большинства изучаемых генов, что позволило приступить к их дальнейшему изучению.

3.3. Клонирование и гетерологичная экспрессия в бактериях *E. coli* изучаемых генов микроспоридий

Для каждого гена проведена успешная ПЦР-амплификация при помощи высокоточной Pfu-полимеразы (Рисунок 5). Амплифицированные последовательности очищены в геле и встроены в экспрессирующий вектор pRSET (Invitrogen, Life Technologies) с сохранением рамки считывания. Ген рицинподобного белка встроен в вектор pRSETB по сайтам BamHI и EcoRI, включенным в состав праймеров. Полноразмерные гены субтилизин-подобной протеазы, альфа/бета -гидролазы и LRR 204 встроены по тем же сайтам в вектор pRSETA. Последовательность, кодирующая LRR 515 – по внутренним сайтам PstI (позиция 401) и HindIII (позиция 1546) в вектор pRSETC. Полноразмерный ген

гексокиназы встроили в тот же вектор по сайтам XhoI/EcoRI. В случае секретируемой формы Hsp70 в вектор pRSETA встроена последовательность, кодирующая N-концевую часть массой 39,3 кДа (354 а/к) по сайтам рестрикции BamHI в составе прямого вектора и EcoRI (внутренний сайт белоккодирующей последовательности, позиция 949). Полноразмерную цитоплазматическую форму шаперона встроили в pRSETA по сайтам XhoI и KpnI в составе прямого и обратного праймеров (Таблица 3).

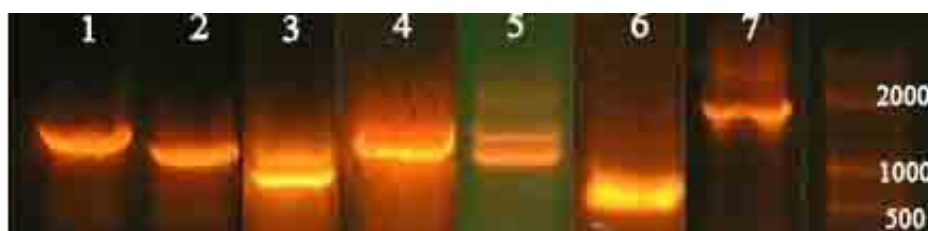


Рисунок 5. ПЦР-амплификация полноразмерных копий изучаемых генов. 1 - трегалаза, 2 – гексокиназа, 3 – LRR 204, 4 – субтилизин-подобная протеаза, 5 – альфа/бета -гидролаза, 6 – рицин-подобный лектин, 7 – LRR 515.

Таблица 3. Размер экспрессированных последовательностей генов, рестриктазы и экспрессирующие вектора.

Ген	Размер последовательности, bp	Рестриктазы	Вектор
Субтилизин-подобная протеиназа	полноразмерный, 1476	BamHI/EcoRI	pRSETA
α/β -гидролаза	полноразмерный, 1119	BamHI/EcoRI	pRSETA
Трегалаза	681	BamHI/KpnI	pRSETA
Гексокиназа	полноразмерный, 1416	XhoI/EcoRI	pRSETC
Рицин-подобный лектин В	полноразмерный, 501	BamHI/EcoRI	pRSETB
LRR-белок (orf 204)	полноразмерный, 993	BamHI/EcoRI	pRSETA
LRR-белок (orf 515)	1155	PstI/HindIII	pRSETC
Белок теплового шока Hsp70 с сигнальным пептидом	1068	BamHI/EcoRI	pRSETA
Белок теплового шока Hsp70 без сигнального пептида	полноразмерный, 1947	XhoI/KpnI	pRSETA

Анализ встроенных фрагментов с помощью секвенирования подтвердил правильность встраивания, а также идентичность клонированных копий последовательностям, обнаруженным в геноме паразита.

Исключение составили последовательности двух генов. В 3'-концевой области клонированного нами 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 (Рисунок 6).

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*.

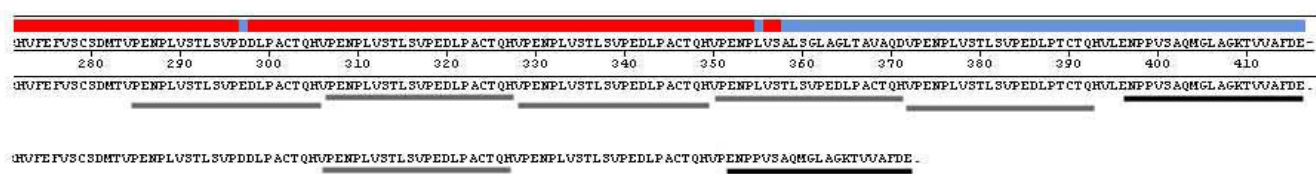


Рисунок 6. Определение нуклеотидной последовательности клонированного гена альфа/бета-гидролазы *P. locustae* (верхняя последовательность) позволило обнаружить два дополнительных повтора VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH по сравнению с данными геномного проекта (нижняя последовательность).

При секвенировании клонированных генов также обнаружен новый LRR-белок микроспоридий. Поскольку внутри каждого семейства этих белков (А и В)

идентичность последовательностей может достигать 90%, при использовании праймеров, специфичных к orf 204, наблюдалась амплификация дополнительных полос, 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 pRSET конструкции использованы для трансформации штамма C41 бактерий *E. coli*, являющегося производным штамма BL21(DE3). При этом во всех случаях наблюдалось токсичное воздействие чужеродного белка на рост бактерий. Несмотря на то, что на чашках с твердой средой LB+ампицилин вырастали колонии нормального размера, при добавлении в среду индуктора экспрессии ИПТГ развития колоний не наблюдалось. 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. При этом нерастворимый денатурированный белок полностью осаждался из гомогената разрушенных ультразвуком бактерий при низкоскоростном центрифугировании и специфично экстрагировался в присутствии 8 М мочевины. В случае гексокиназы и трегалазы рекомбинантный белок также солюбилизировали в 8 М мочеvine, но с добавлением 2 % ДСН и 5 % меркаптоэтанола, чтобы предотвратить образование осадка после размораживания. Перед иммунизацией животных детергенты удаляли путем диализа против ТБС. Молекулярный вес полученных продуктов, оцененный с помощью ДСН-ПАГЭ, соответствовал размеру, предсказанному согласно кодирующей последовательности с поправкой на N-терминальный дополнительный пептид, кодируемый последовательностью в составе вектора (4 кДа).

Для выделения альфа/бета-гидролазы и молекулярных шаперонов, накапливающихся в бактериях в растворимой форме, успешно использован метод металло-хелатной 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.

После иммунизации кроликов и получения специфичных сывороток антитела дополнительно очищали с помощью иммуноаффинных методов. В качестве специфичного сорбента использовали полоски нитроцеллюлозы с перенесенным рекомбинантным белком. Полученные к белкам микроспоридий антитела 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 хозяина

4.1. Подготовка проб зараженного жирового тела саранчи

Накопление белков паразита в зараженной клетке хозяина изучали методом иммуноблоттинга (Вестерн блот гибридизация). Для анализа использовали три типа белковых проб: (1) белки спор и стадий внутриклеточного развития, очищенных с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла, (2) белки зараженного жирового тела, полученные в результате мягкого разрушения ткани хозяина и последующего удаления клеток и спор паразита с помощью центрифугирования, (3) белки контрольного (незараженного) жирового тела, полученного таким же образом.

Оценка молекулярной массы нативных белков *P. locustae* осуществлялась по данным компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей при помощи серверов SignalP 4.1, TargetP 1.1, а также SIG-Pred, Signal-3L и PrediSi. Эти интернет-ресурсы позволяют получить информацию о вероятности наличия сигнального пептида и его длине и, следовательно, предположить с определенной степенью вероятности молекулярную массу зрелого белка и его предшественников.

Приготовление проб белков цитоплазмы клеток зараженного жирового тела потребовало решения методической проблемы, которая заключается в возможности загрязнения внутренними (несекретируемыми) белками паразита. Даже при мягкой гомогенизации зараженной ткани и удалении стадий внутриклеточного развития паразитов с помощью низкоскоростного центрифугирования возможно их частичное разрушение. Маркером для контроля такого загрязнения могли бы стать растворимые цитоплазматические белки микроспоридий, накапливающиеся в высокой концентрации на ранних стадиях внутриклеточного развития паразитов (в меронтах и споронтах). Более поздние спорогональные стадии (начиная со стадии позднего споробласта) защищены от

такого разрушения формирующейся прочной оболочкой споры. Растворимые метаболические ферменты паразита не могут быть использованы для этой цели, так как ранее было показано их специфичное накопление в зрелых спорах микроспоридии *P. locustae* (Dolgikh et al., 2009; Dolgikh et al. 2011). В тоже время, ряд белков «домашнего хозяйства» паразита накапливается примерно одинаково во всех стадиях жизненного цикла *P. locustae* (Dolgikh et al. 2011; Долгих и др. 2011).

Таким образом, в качестве контроля целостности клеток паразита было предложено использовать антитела к цитоплазматической форме молекулярного шаперона Hsp70 *P. locustae*, который имеет одинаковый уровень экспрессии на всех стадиях жизненного цикла микроспоридий и относится к растворимым белкам. Однако оказалось, что этот белок постоянно присутствует в растворимой фракции гомогената зараженного тела на спорогональной стадии жизненного цикла паразита (Рисунок 7). По всей видимости, это связано с частичным повреждением стадий внутриклеточного развития формирующимися спорами (Долгих и др., 2012).

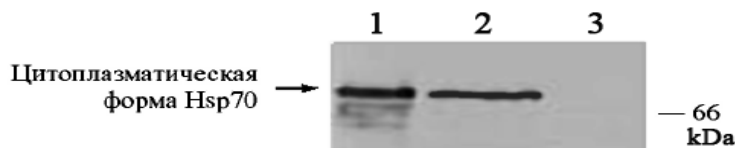


Рисунок 7. Иммуноблоттинг с антителами к цитоплазматической форме Hsp70 *P. locustae*. Дорожка 1 – белки стадий внутриклеточного развития; дорожка 2 – супернатант зараженного жирового тела саранчи; дорожка 3 – супернатант контрольного жирового тела.

В результате такие растворимые цитоплазматические белки “домашнего хозяйства” как цитоплазматическая форма Hsp70 оказались надежным инструментом контроля целостности клеток паразита, поскольку распознаваемый

белок легко высвобождался в окружающую среду при избирательном повреждении цитоплазматической мембраны микроспоридий. С другой стороны, само такое повреждение, по всей видимости, происходит естественным путем и не служит артефактом исследования. Такой вывод можно сделать на основе анализа локализации этого белка на срезах зараженной ткани (Сендерский и др., 2014). В связи с этим не представляется возможным отделить растворимые белки зараженного тела хозяина от цитоплазматических белков паразита. Однако, в нашем случае, мы имеем дело с секреторными белками, которые связаны в процессе своего синтеза, созревания и транспорта с внутриклеточными мембранными компартментами клетки паразита. Это позволяет предложить в качестве отрицательного контроля загрязнения проб антитела к растворимым ферментам таких компартментов, например, к митосомальной форме молекулярного шаперона Hsp70. Действительно, этот белок не выявляется в растворимой фракции гомогената зараженного жирового тела при мягких условиях гомогенизации. Появление митосомального Hsp70 в растворимой фракции наблюдается только после обработки клеток ультразвуком или несколькими циклами замораживания – оттаивания (Рисунок 8) (Долгих и др., 2012).

Следует отметить, что поскольку разрушенные клетки паразита подвергались ультрацентрифугированию при 430000 g 30 мин., речь идет о высвобождении в растворимую фракцию именно свободных, а не заключенных в микросомы белковых молекул. В то же время, замораживание/оттаивание и обработка ультразвуком приводят к разрушению лишь небольшой части митосом микроспоридий, так как в среду высвобождаются незначительные количества митосомального шаперона.

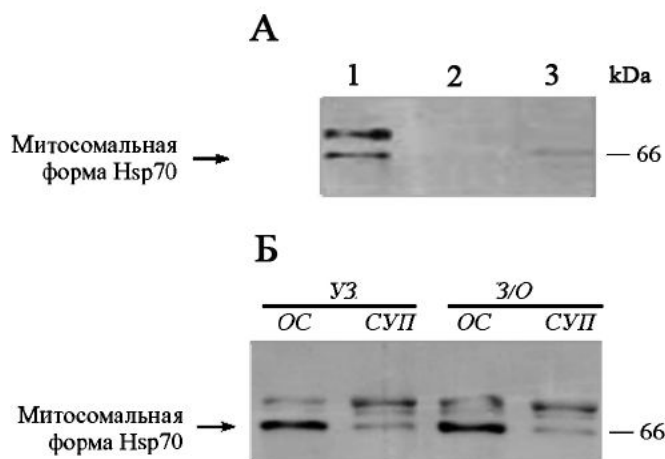


Рисунок 8. Иммуноблоттинг с антителами к цитоплазматической форме Hsp70 *P. locustae*. А: дорожка 1 – белки стадий внутриклеточного развития; дорожка 2 – супернатант зараженного жирового тела саранчи; дорожка 3 – супернатант контрольного жирового тела. Б: обработка очищенных стадий внутриклеточного развития *P. locustae* ультразвуком (УЗ) или замораживанием/оттаиванием (З/О). Осадок (ОС) и супернатант (СУП) после центрифугирования при 430000 g 30 мин.

Другим перспективным кандидатом на роль отрицательного контроля загрязнения зараженного жирового тела растворимыми белками внутриклеточных мембранных компартментов микроспоридий можно рассматривать белок теплового шока Hsp70 с сигнальным пептидом.

Молекулярный шаперон семейства Hsp70 *P. locustae*

Данный представитель семейства молекулярных шаперонов Hsp70 имеет размер 76 кДа и 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 тоже время в С-концевой области белка

обнаружена последовательность REEL, ответственная за локализацию белка в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) (Sato et al., 2006).

Как видно из результатов иммуноблоттинга (Рисунок 9), зрелый белок размером около 74 кДа накапливается в очищенных стадиях внутриклеточного развития (Ст), спорах (Сп) и осадках гомогената зараженного жирового тела. Во фракции цитоплазмы жирового тела (С), а также в контрольных пробах (Кос и Кс) данный белок отсутствует. Полученные данные подтверждают, что данный шаперон выполняет свою функцию в просвете цистерн после его транслокации внутрь органеллы с помощью данного сигнального пептида. Важная роль шаперонов Hsp70 в укладке (фолдинге) белковых молекул при их транслокации в просвет ЭПР широко известна.

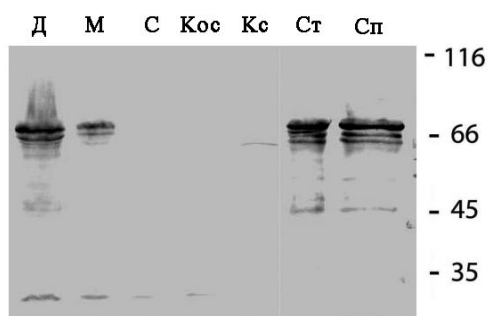


Рисунок 9. Иммуноблоттинг с антителами против ЭПР (“секретируемой”) формы Hsp70 *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела. Д – осадок после центрифугирования 100 g, М – осадок после центрифугирования 14000 g, С – конечный супернатант. Кос – осадок гомогената контрольного жирового тела 100 g; Кс – конечный супернатант ; Ст – белки стадий внутриклеточного развития; Сп – белки спор.

При использовании более жестких методов воздействия на стадии внутриклеточного развития паразитов, чем те, что были применены при

гомогенизации и очистке супернатанта зараженного тела, наблюдается нарушение целостности внутренних компартментов клетки паразита. В частности, повторение циклов замораживания – оттаивания или обработка ультразвуком клеток паразита приводит к высвобождению в растворимую фракцию примерно половины от присутствующего в клетке белка ЭПР-Hsp70 (Рисунок 10) (Долгих и др., 2012).

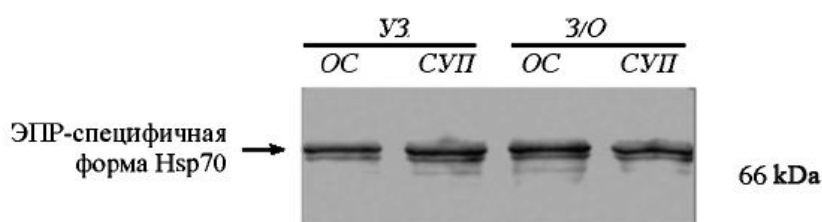


Рисунок 10. Обработка очищенных стадий внутриклеточного развития *P. locustae* ультразвуком (УЗ) или замораживанием/оттаиванием (З/О). Осадок (ОС) и супернатант (СУП) после центрифугирования при 430000 g 30 мин. Иммуноблоттинг с антителами к ЭПР Hsp70 *P. locustae*.

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 митосом и цистерн ЭПР. Секреторные белки микроспоридий, синтез и созревание которых также связано с эндоплазматическим ретикулюмом, попадают в цитоплазму хозяина без разрушения мембран паразита. Это значит, что антитела к ЭПР Hsp70 можно использовать в качестве контроля от загрязнения проб жирового тела несекреторными белками, локализующимися в эндоплазматическом ретикулюме, а также молекулярного маркера соответствующего мембранного компартмента.

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

Рицин-подобный лектин *P. locustae*

Изучаемый белок состоит из 166 аминокислот с молекулярной массой около 19.2 кДа. Наличие сигнального пептида, ответственного за секрецию белка, предсказано с помощью сервера TargetP 1.1 с вероятностью 0.555. В тоже время, другие программы (SignalP 4.1, SIG-Pred, Signal-3L, PrediSi) не подтвердили принадлежности данного белка к секретому паразита. Иммуноблоттинг с использованием полученных антител (Рисунок 11) подтвердил данные о том, что рицин-подобный лектин *P. locustae* не относится к секретируемым белкам. Нативный полипептид имеет размер около 19-20 кДа и в значительных количествах специфично накапливается в растворимой фракции гомогената спор (1). Белок практически отсутствует в стадиях внутриклеточного развития паразита (2), выделенных методом центрифугирования в градиенте плотности Перколла. 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. (3 –контроль: незараженное жировое тело).

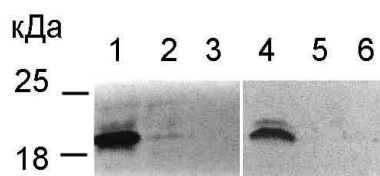


Рисунок 11. Иммуноблоттинг с антителами против рицин-подобного лектина микроспоридии *P. locustae*. дорожка 1 - растворимая фракция спор, дорожка 2 - стадии внутриклеточного развития паразита, дорожка 3 - белки контрольного (незараженного) жирового тела саранчи, дорожки 4 и 5 – осадки, полученные при разных скоростях центрифугирования (100g и 20000g

соответственно) гомогената зараженного жирового тела, дорожка 6 – супернатант гомогената.

Гексокиназа *P. locustae*

Гексокиназа *P. locustae* представляет собою белок, состоящий из 471 аминокислотного остатка размером 52.1 кДа. Наличие секреторного сигнального пептида в составе молекулы предсказано с помощью серверов TargetP 1.1 с вероятностью 0.569, SignalP 4.1 (0.536) и Signal-3L. Две другие использованные программы SIG-Pred и PrediSi показали отрицательный результат. Иммуноблоттинг с антителами к гексокиназе *P. locustae* (Рисунок 12) показал накопление значительных количеств белка с молекулярным весом около 48 кДа в цитоплазме зараженного жирового тела саранчи (С), но не во внутриклеточных стадиях, выделенных с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла (Ст). В пробах незараженного (контрольного) жирового тела саранчи данный белок также не выявлялся (Кос, Кс).

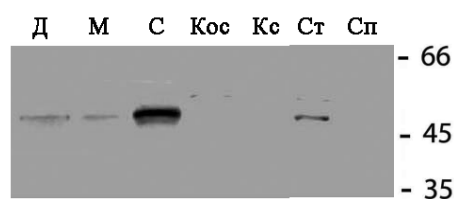


Рисунок 12. Иммуноблоттинг с антителами против гексокиназы *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела. Д – осадок после центрифугирования 100 g, М – осадок после центрифугирования 14000 g, С – конечный супернатант. Кос – осадок гомогената контрольного жирового тела 100 g; Кс – конечный супернатант ; Ст – белки стадий внутриклеточного развития; Сп – белки спор.

Размер белка, распознаваемого антителами против гексокиназы микроспоридий, приблизительно соответствует предсказанному размеру без сигнального пептида. К сожалению, мы не можем точно предсказать размер сигнального пептида, так как разные серверы дают разные значения (12, 18 и 53 аминокислотных остатка для программ TargetP 1.1, SignalP 4.1 и Signal-3L соответственно).

Трегалаза *P. locustae*

Этот фермент *P. locustae* представляет собою белок, состоящий из 669 аминокислотных остатков размером 76.6 кДа. Наличие секреторного сигнального пептида в составе молекулы предсказано с помощью всех использованных серверов за исключением программы SignalP 4.1. При этом все программы предсказали присутствие сигнального пептида протяженностью около 36-38 аминокислотных остатков. Таким образом, размер зрелой формы фермента должен составить около 72 кДа. Иммуноблоттинг с антителами к трегалазе *P. locustae* (Рисунок 13) показал накопление в цитоплазме зараженного жирового тела саранчи белка с молекулярным весом около 64 кДа. В очищенных с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколл стадиях внутриклеточного развития белок со сходной молекулярной массой также выявлялся, но в значительно меньшей концентрации. В пробах незараженного (контрольного) жирового тела саранчи данный белок отсутствовал.

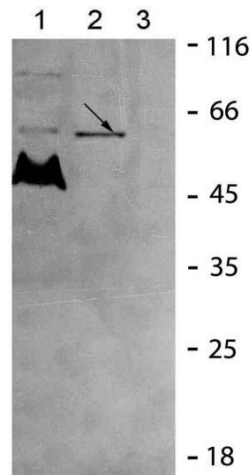


Рисунок 13. Иммуноблоттинг с антителами против трегалазы *P. locustae* показал специфичное накопление белка с мол. массой около 64 кДа в цитоплазме зараженного (дорожка 2), но не контрольного жирового тела саранчи (дорожка 3). В стадиях внутриклеточного развития паразита (дорожка 1) данный белок присутствовал в незначительном количестве. На каждую дорожку нанесено одинаковое количество (10 мкг) суммарного белка.

Поскольку обнаруженный белок по своему размеру отличался от предсказанного для трегалазы для его дальнейшей идентификации необходимо проведение протеомного анализа.

LRR-белок семейства А (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. Наличие в составе молекулы секреторного сигнального пептида выявлено с помощью четырех использованных программ за исключением сервера SIG-Pred. Иммуноблоттинг с антителами, полученными к рекомбинантному белку (Рисунок 14), показал специфичное накопление в цитоплазме зараженной ткани хозяина (С) целого ряда полос, 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) и демонстрируют гомологию с такими регуляторными белками как протеинкиназы, Ras-подобные ГТФазы, активаторы ГТФаз и ингибиторы РНКаз бактерий и высших растений. Последнее обстоятельство подразумевает их невысокое содержание в зараженной клетке, что согласуется с результатами иммуноблоттинга.

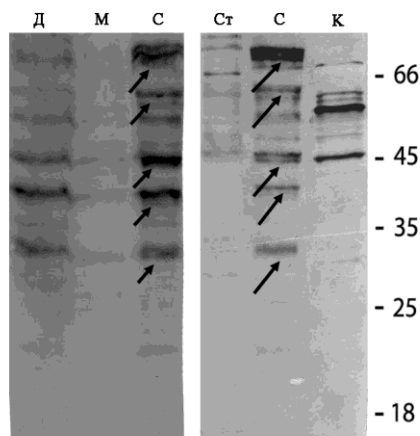


Рисунок 14. Иммуноблоттинг с антителами против LRR-белка семейства А (orf 204) *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела. Д – осадок после центрифугирования 100 g, М – осадок после центрифугирования 14000 g, С – конечный супернатант. Кос – осадок гомогената 100 g; К – конечный супернатант контрольного жирового тела; Ст – белки стадий внутриклеточного развития.

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

LRR-белок, кодируемый orf 515, как и большинство представителей семейства Б является крупным белком, состоящим из 682 аминокислот (78,8 кДа). Наличие сигнального пептида, ответственного за секрецию белка, предсказано с помощью сервера TargetP 1.1 с высокой вероятностью (0.823). Однако, все другие программы (SignalP 4.1, SIG-Pred, Signal-3L, PrediSi) не подтвердили этот результат. В тоже время, иммуноблоттинг (Рисунок 15) показал достоверное

накопление в цитоплазме зараженного жирового тела (С) трех белков размером от 60 до 80 кДа, которые, по всей видимости, соответствуют нескольким формам LRR-белков семейства В, обнаруженных в геноме паразита. В контрольной ткани хозяина эти белки отсутствовали (К), а в очищенных стадиях внутриклеточного развития присутствовали в незначительном количестве (Ст).

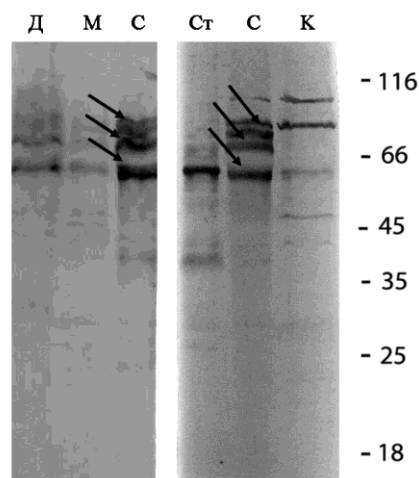


Рисунок 15. Иммуноблоттинг с антителами против LRR-белка семейства В (orf 515) *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела. Д – осадок после центрифугирования 100 g, М – осадок после центрифугирования 14000 g, С – конечный супернатант. Кос – осадок гомогената 100 g; К – конечный супернатант контрольного жирового тела; Ст – белки стадий внутриклеточного развития.

Альфа/бета-гидролаза *P. locustae*

В 3'-концевой области клонированного нами гена альфа/бета-гидролазы обнаружены два дополнительных повтора VPENPLVSTLSVPEDLPACTQH (Рисунок 6), по сравнению с последовательностью, представленной американскими коллегами на сайте геномного проекта *P. locustae*. Таким образом,

амплифицированная нами 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 отмечалась 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 (Rath et al., 2009).

Поскольку в состав фермента *P. locustae* входит 60 остатков аспартата и глутамата, что составляет 14,5% от общего содержания аминокислот, данное поведение белка было вполне предсказуемо. Иммуноблоттинг с антителами против рекомбинантной альфа/бета гидролазы (Рисунок 16) показал приблизительно одинаковое содержание фермента в очищенных стадиях внутриклеточного развития (Ст) и пробах цитоплазмы зараженного жирового тела (С). При этом антитела специфично распознают две полосы, одна из которых полностью соответствует размеру рекомбинантного белка минус концевой пептид вектора (около 61-62 кДа). Верхняя полоса, вероятно, соответствует форме фермента с дополнительным количеством обогащенных пролином повторов (восемь вместо шести). Полиморфизм гена по количеству таких повторов был показан выше.

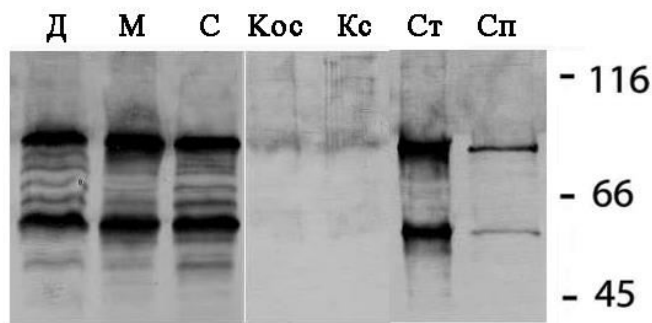


Рисунок 16. Иммуноблоттинг с антителами против альфа/бета-гидролазы *P. locustae*.

Д, М, С – фракции гомогената зараженного жирового тела. Д – осадок после центрифугирования 100 g, М – осадок после центрифугирования 14000 g, С – конечный супернатант. Кос – осадок гомогената контрольного жирового тела 100 g; Кс – конечный супернатант ; Ст – белки стадий внутриклеточного развития; Сп – белки спор.

Субтилизин-подобная протеиназа *P. locustae*

По данным геномного проекта, фермент состоит из 491 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе 54 кДа. Однако, в 5'-фланкирующей области гена в той же рамке считывания ранее были обнаружены еще два метиониновых кодона. Это позволило предположить, что фермент микроспоридий может состоять из 515 или 529 аминокислот. Поскольку сигнальный пептид, ответственный за их секрецию, достоверно выявлялся у этих удлиненных форм, мы осуществили экспрессию протеиназы и получили к белку специфичные антитела. Иммуноблоттинг белков спор и стадий внутриклеточного развития паразита с этими антителами (Рисунок 17) показал, что полоса, соответствующая предсказанному размеру (54-56 кДа), накапливается в нерастворимой фракции гомогената спор и отсутствует в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий.

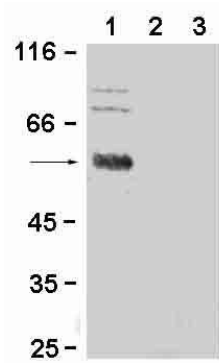


Рисунок 17. Иммуноблоттинг белков спор и стадий внутриклеточного развития *P. locustae* с антителами, полученными против субтилизин-подобной протеиназы микроспоридий, показал специфичное накопление фермента в нерастворимой фракции гомогената спор. Дорожка 1 - нерастворимый осадок после осветления гомогената; дорожка 2 - супернатант после осветления гомогената; дорожка 3 - белок стадий внутриклеточного развития микроспоридий выделенных в градиенте плотности Перколла.

Анализ белков зараженного жирового тела саранчи также показал присутствие субтилизин-подобной протеиназы паразита лишь в осадке после низкоскоростного центрифугирования гомогената ткани хозяина, содержащего стадии внутриклеточного развития и споры паразита, но не в цитоплазме инвазированных клеток (Рисунок 18).

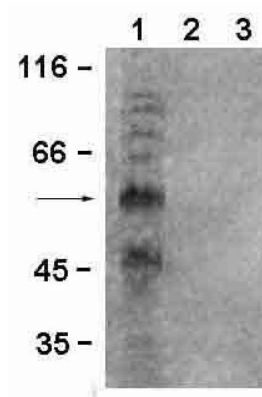


Рисунок 18. Иммуноблоттинг с антителами против субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*. Дорожка 1 – осадок гомогената зараженного тела после центрифугирования при 100 g; дорожка 2 - осадок после дополнительного центрифугирования при 14000 g; дорожка 3 – растворимая фракция гомогената жирового тела.

Полученные данные позволили нам подтвердить данные 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 экстрезии).

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 белков *P. locustae* на криосрезах зараженного жирового тела саранчи, определённая методами иммунофлюоресцентной и конфокальной микроскопии

Иммунолокализация белков микроспоридии *P. locustae* изучалась методами иммунофлюоресцентной и конфокальной микроскопии на срезах толщиной 10 мкм зараженной ткани насекомых. Такой подход позволяет изучать молекулярные основы микроспоридиоза одновременно на клеточном и тканевом уровнях, что невозможно в случае классического иммунофлюоресцентного анализа внутриклеточных паразитов в культурах клеток насекомых или млекопитающих (Xu et al., 2006; Goldberg et al., 2008; Williams et al., 2008).

Для того, чтобы четко визуализировать клетки паразита, во множестве находящиеся в гипертрофированных зараженных адипоцитах, от цитоплазмы клеток насекомого, использовали антитела к цитоплазматической и ЭПР-специфичной формам шаперонов Hsp70 *P. locustae* в качестве маркеров, специфично окрашивающих соответствующие клеточные компартменты паразитов.

Иммуномечение криосрезов зараженного жирового тела антителами к цитоплазматической и ЭПР-специфичной формам Hsp70 позволило визуализировать стадии внутриклеточного развития микроспоридий (меронты и споронты), но не споры и споробласты, так как последние, по-видимому, обладают непроницаемой для иммуноглобулинов оболочкой. Окрашивание имеет специфичный характер: флюоресценция наблюдается только в клетках паразита и не затрагивает тканевых и клеточных структур хозяина.

На первых этапах развития микроспоридиоза зараженные клетки встречаются группами по всему органу, формируя разрозненные очаги с паразитами, находящимися на разных стадиях жизненного цикла (Рисунок 19). В дальнейшем отдельные очаги сливаются, незараженные клетки жирового тела исчезают, и заражение органа становится генерализованным.

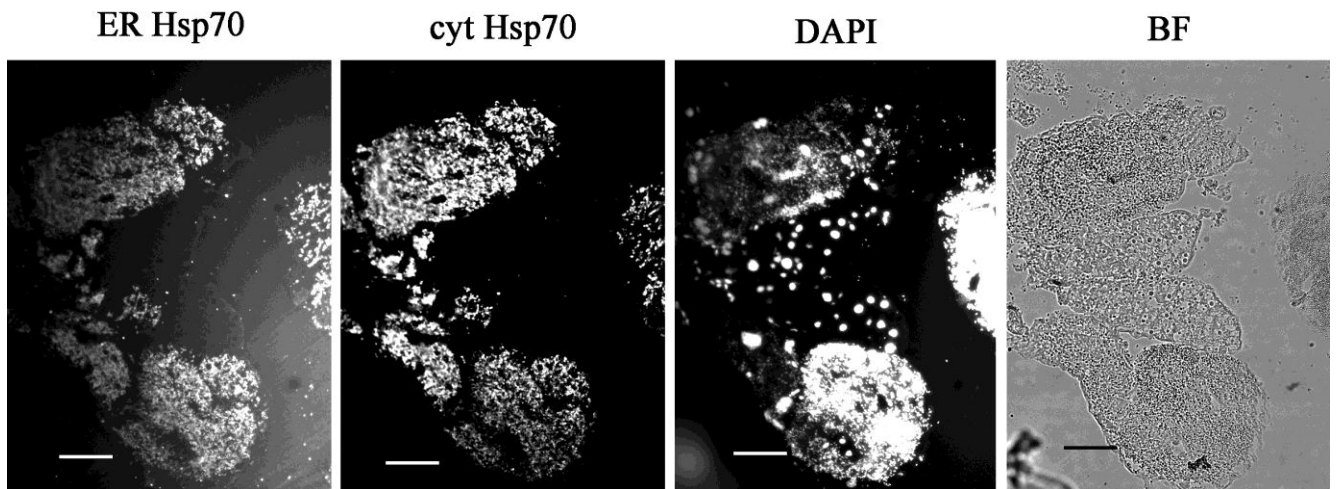


Рисунок 19. Иммулокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *P. locustae* на криосрезах зараженного жирового тела перелетной саранчи. Отдельные очаги микроспоридиоза хорошо визуализируются антителами к Hsp70, в центре незараженные лопасти жирового тела. Масштабная линейка 100 мкм.

На срезах жирового тела внутриклеточные стадии жизненного цикла *P. locustae* встречаются только внутри клеток саранчи, в их цитоплазме, обычно целиком ее заполняя. Остается свободной от микроспоридий только область ядра. Количество клеток паразита варьирует в широких пределах и зависит, по всей видимости, только от размера зараженной клетки хозяина. На завершающем этапе спорогонии между зрелыми и созревающими спорами, непроницаемыми для иммуноглобулинов, встречаются одиночные неправильной формы клетки *P. locustae*, имеющие специфическую флюоресцентную окраску (Рисунок 20). Возможно, это остатки более ранних стадий жизненного цикла, задержавшихся в своем развитии из-за нехватки питательных веществ и в значительной степени поврежденных формирующимися вокруг них спорами.

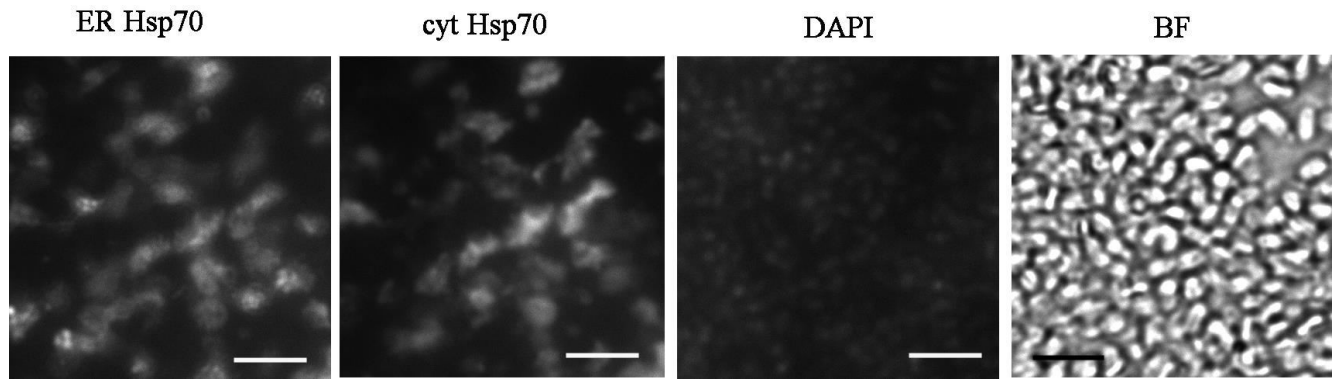


Рисунок 20. Иммулокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *P. locustae* на криосрезах зараженного жирового тела перелетной саранчи. Остатки стадий внутриклеточного развития на позднем спорогональном этапе инфекции. Цитоплазма стадий окрашивается антителами к цитоплазматической форме Hsp70 неравномерно, границы клеток неровные. Масштабная линейка 10 мкм.

Обе формы Hsp70 одновременно присутствуют в значительных количествах во всех внутриклеточных стадиях жизненного цикла (Рисунок 21). Однако распределение этих белков в клетке паразита различно. Иммуномечение антителами к ЭПР-специфичной форме создает дискретную картину окрашивания, выявляя обширную сетеподобную структуру в цитоплазме паразита. Скорее всего, эта структура действительно соответствует ЭПР клетки паразита, а возможно и аппарату Гольджи, вместе с которым представляет единый комплекс у микроспоридий (Beznoussenko et al. 2007). Локализация ЭПР-специфичной формы в таком внутреннем мембранном компартменте согласуется с полученными ранее данными о накоплении этого белка во фракции внутренних мембран гомогената зараженного тела (Долгих и др. 2012). Отсутствие рассматриваемого шаперона вне клеток паразита на криосрезах и в растворимой фракции гомогената жирового тела свидетельствует о несекретируемой природе последнего. Скорее всего, его основной функцией является транслокация и

укладка (фолдинг) белковых молекул, поступающих в очень специализированную внутриклеточную транспортную систему микроспоридий.

Антитела к цитоплазматической форме шаперона в большинстве случаев равномерно окрашивают все внутриклеточное пространство клетки паразита за исключением области диплокариона, что, по всей видимости, соответствует цитоплазматической локализации этого белка. Такое иммуномечение хорошо подчеркивает округлую, лишенную каких-либо выростов форму клеток внутриклеточных стадий развития *P. locustae* (Рисунок 21).

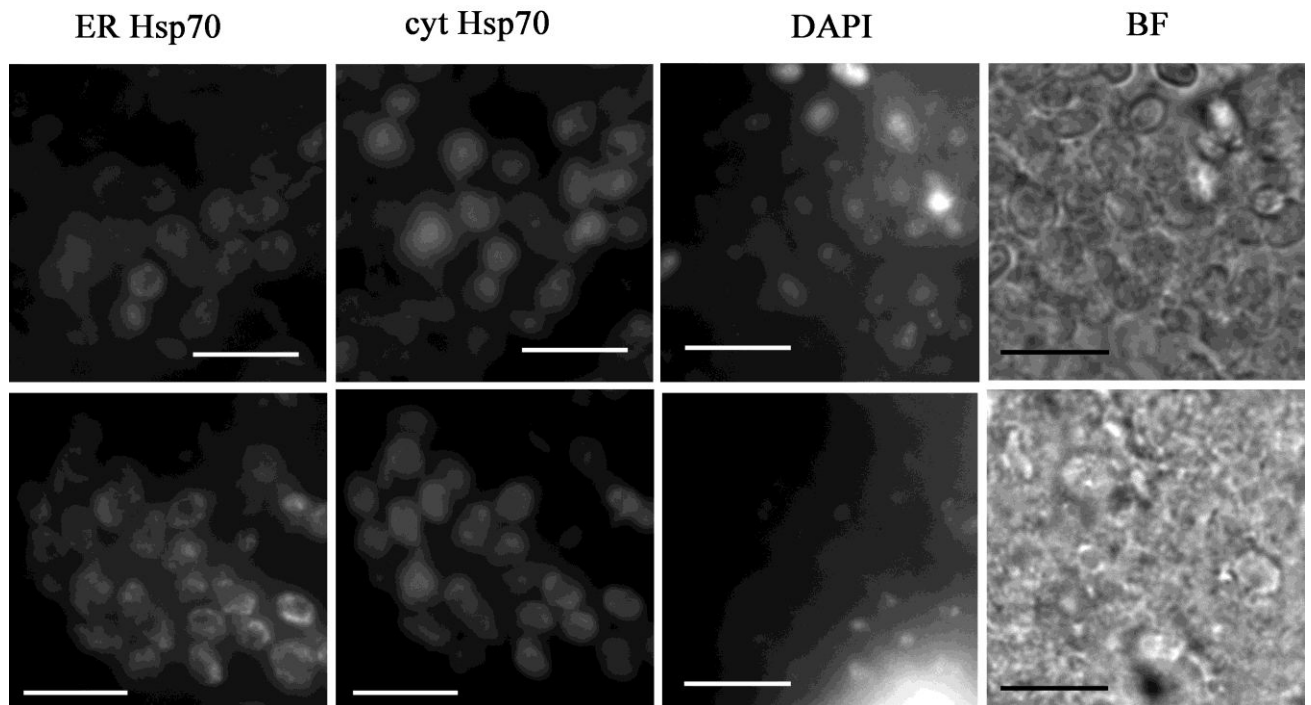


Рисунок 21. Иммунолокализация молекулярных шаперонов семейства Hsp70 микроспоридии *P. locustae* на криосрезках зараженного жирового тела перелетной саранчи. Стадии внутриклеточного развития имеют характерные картины окрашивания антителами к двум формам молекулярных шаперонов. Масштабная линейка 10 мкм.

В то же время в участках жирового тела, заполненных спорами микроспоридий, наблюдается немного иная картина (Рисунок 20). Одиночные

стадии внутриклеточного развития, располагающиеся в пространствах между спорами, имеют неравномерную окраску цитоплазмы, не позволяющую четко определить форму и границы клетки. Возможно, происходит механическое повреждение внутриклеточных стадий созревающими спорами, имеющими толстую ригидную оболочку, сопровождаемое нарушением целостности клеточной мембраны и потерей части белка - цитоплазматической формы Hsp70. Этим, вероятно, и объясняется явление контаминации этим белком растворимой фракции при разделении клеток паразита и хозяина (Долгих и др. 2012).

Секреторные белки микроспоридий, накопление которых в зараженной ткани хозяина показано методом иммуноблоттинга, изучались 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*.

Колокализация ЭПР-Hsp70 с помощью антител, полученных в мышах, и альфа/бета гидролазы с помощью антител, полученных в кроликах, на одних и тех же срезах зараженного жирового тела с использованием конфокальной микроскопии подтвердила факт секреции фермента паразита в цитоплазму зараженных клеток хозяина. При этом антитела к альфа/бета-гидролазе практически не окрашивали клетки микроспоридий на срезах зараженного жирового тела. Меронты, споронты, спорбласты и споры паразита, а также ядра хозяина выглядели на срезах как темные зоны, окруженные ярким свечением в цитоплазме зараженных клеток. Как и в случае ЭР-Hsp70, незараженные клетки хозяина не метились антителами к гидролазе (Рисунок 22).

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. При этом споры паразита и незараженные клетки хозяина не окрашивались антителами к гексокиназе. Однако наиболее интересным и значимым результатом оказалось обнаруженное нами 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 23).

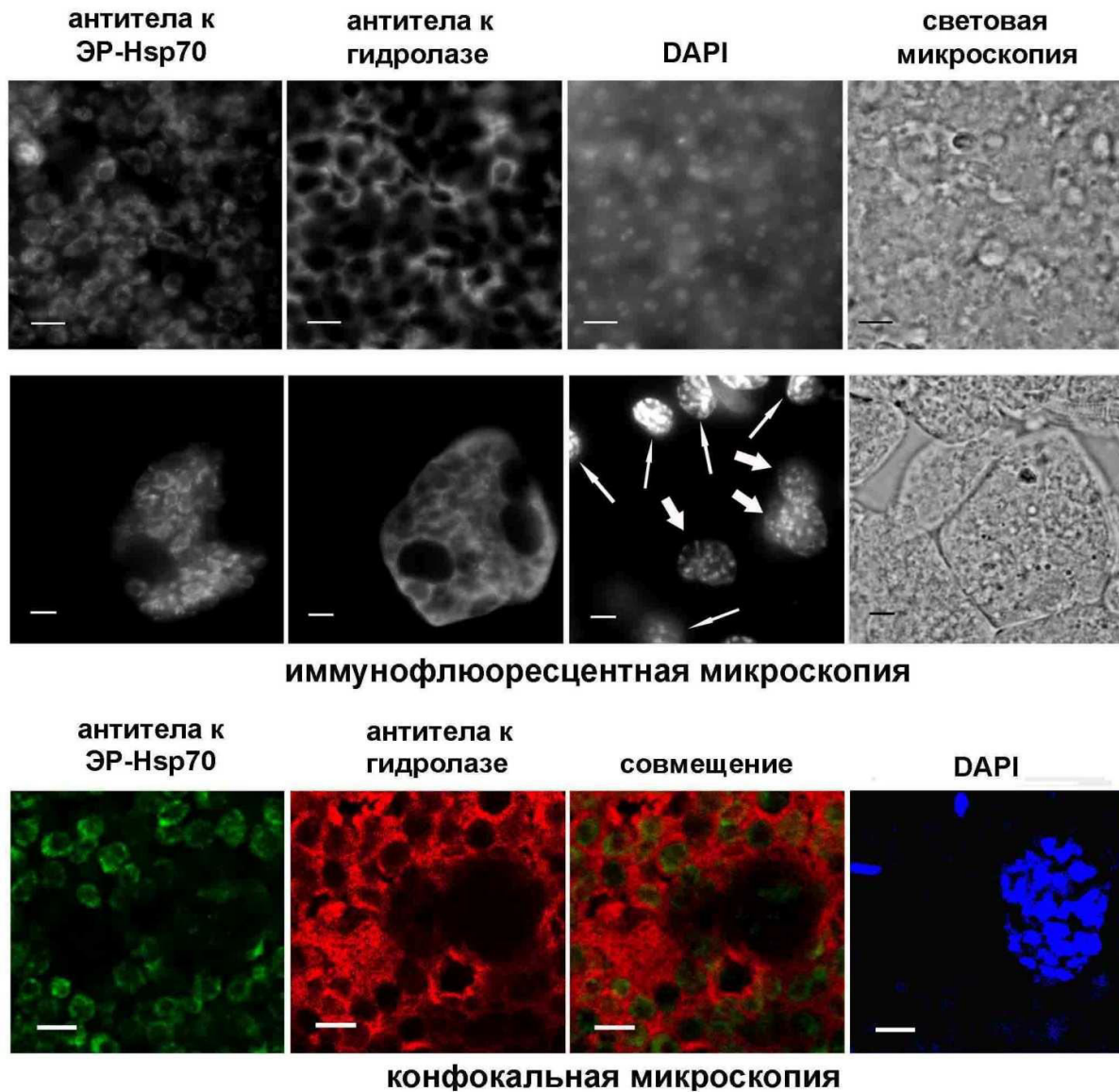


Рисунок 22. Иммунолокализация альфа/бета-гидролазы в клетках зараженного *P. locustae* жирового тела саранчи на криосреззах. Толстые и тонкие стрелки указывают на ядра зараженных и незараженных клеток соответственно. Средняя по толщине стрелка указывает на ядро клетки хозяина на периферии очага заражения.

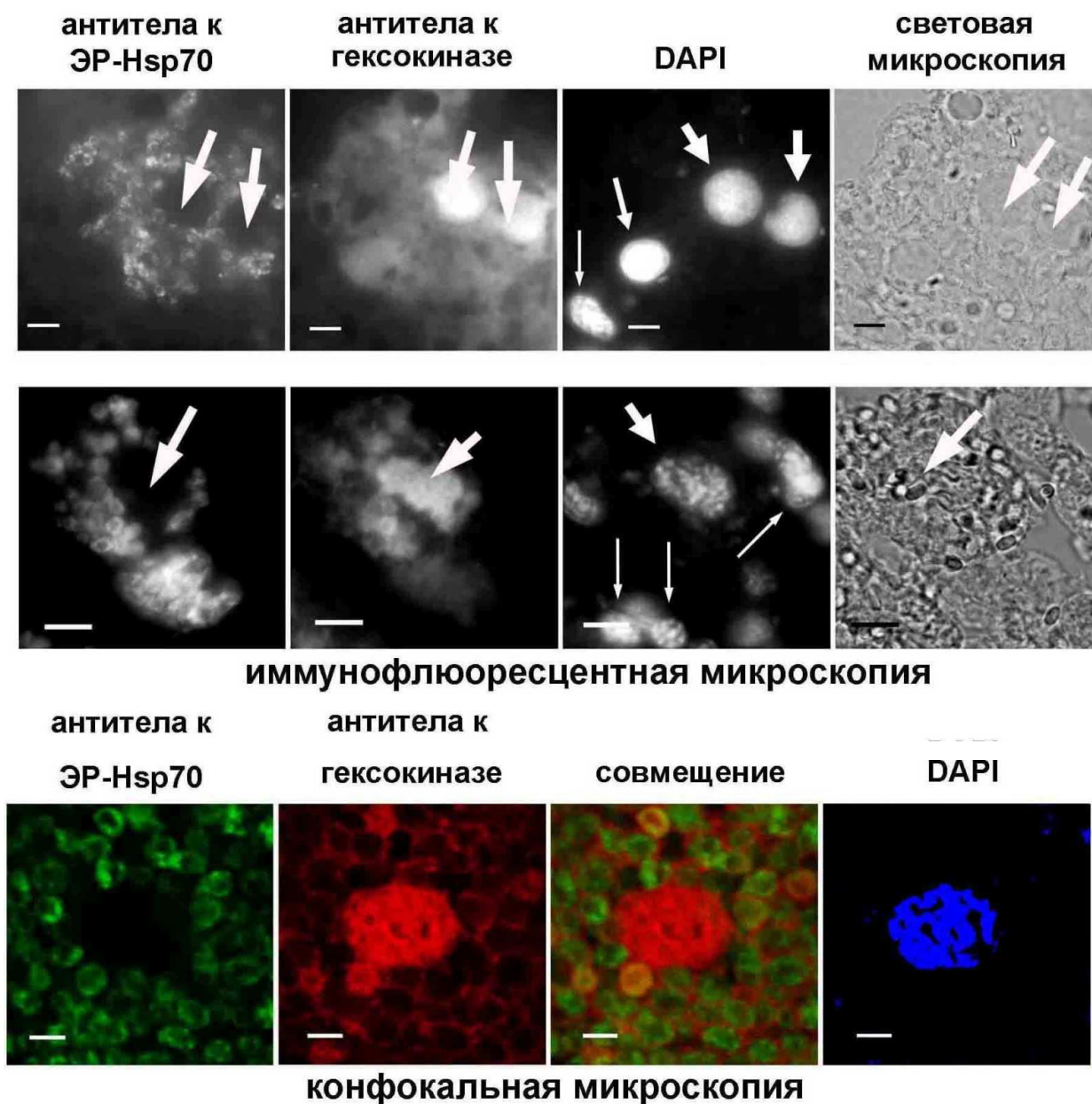


Рисунок 23. Иммунолокализация гексокиназы *P. locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи. Толстые и тонкие стрелки указывают на ядра зараженных и незараженных клеток соответственно.

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.

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. При этом максимальный уровень транскрипции большинства изучаемых генов наблюдался в стадиях внутриклеточного развития микроспоридий. В спорах паразита слабая транскрипционная активность наблюдалась только в отношении рицин-подобного лектина и LRR 204. Примерно равный уровень экспрессии на протяжении всего жизненного цикла микроспоридии показан для субтилизин-подобной протеазы.

Анализ накопления белковых продуктов в цитоплазме зараженного жирового тела и в клетках самого паразита позволил предположить, 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, возможно, попадают в окружающую среду в процессе экструзии зародыша, способствуя инфицированию клетки хозяина, что позволяет рассматривать их как один из факторов патогенности. Возможность существования таких механизмов подтверждается свежими литературными данными о наличии у микроспоридии *Spraguea lophii* рицин-подобного лектина, имеющего сигнальный пептид секреторного пути и обнаруживающегося во внешней среде при выстреливании спор паразита (Campbell et al., 2013). А также обнаружением субтилизин-подобной протеиназы в апикальной зоне споры *Nosema bombycis*, где она, по всей видимости, играет важную роль в процессе экструзии полярной трубки (Dang et al., 2013).

Другая часть секретома играет важную роль во взаимоотношении паразита и хозяина на стадии внутриклеточного развития. В этот период микроспоридии находятся в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина и удовлетворяют

свои энергетические потребности исключительно за счет ее АТФ. Подобная метаболическая зависимость не имеет аналогов среди других групп эукариотических паразитов и подразумевает наличие тонких механизмов манипуляции метаболическими процессами клетки хозяина. Возможно, такая манипуляция опосредована группой так называемых LRR белков микроспоридий, выполняющих, по всей видимости, регуляторную функцию благодаря специфической, обогащенной лейциновыми остатками последовательности, необходимой для белок-белкового взаимодействия (Kobe, Kajava, 2001). Можно предположить, что эти белки могут связываться с РАТ белками липидных капель зараженной клетки жирового тела или взаимодействовать с компонентами сигнальных каскадов, регулирующих процессы мобилизации триглицеридов в клетках жирового тела насекомого. При этом анализ белковых проб с помощью полученных к LRR белкам антител выявил наличие множественных форм этих белков в цитоплазме зараженных клеток, что полностью совпадает с данными, полученными при анализе ДНК секрета микроспоридии *P. locustae*.

Иммунофлюоресцентное окрашивание срезов зараженного жирового тела показало значительное накопление в цитоплазме клеток хозяина двух секреторных ферментов микроспоридии *P. locustae*: альфа/бета-гидролазы и гексокиназы. Для альфа/бета-гидролазы в данном исследовании показан полиморфизм количества богатых пролином последовательностей на С-конце молекулы. Наличие С-концевых пролин-богатых повторов в последовательности гидролазы *P. locustae* может свидетельствовать о ее функциональной близости к липазам позвоночных, стимулируемых солями желчи (BSSL) - мультифункциональных липолитических ферментов. При этом обнаруженные две формы фермента *P. locustae* (шесть и восемь пролин-богатых повторов) напоминают гетерогенность размера BSSL от 100 до 160 кДа в молоке человека. Как и в нашем случае, эти вариации были обусловлены наличием вставок и делеций в С-концевой области гена, кодирующей пролин-богатые повторы. Поскольку истощение запасов триглицеридов в жировом теле насекомых при

микроспориidioзе хорошо известно, секреция паразитической липазы в цитоплазму хозяина была вполне ожидаемой.

Секреторная гексокиназа *P. locustae* также, возможно, напрямую участвует в мобилизации энергетических субстратов клетки жирового тела, например глюкозы. Однако характерная особенность этого фермента - четко выраженное на срезах накопление его в ядрах клеток хозяина в центрах очагов инфекции. По всей видимости, полученный результат свидетельствует о вероятной регуляторной роли гексокиназы микроспоридий в качестве транскрипционного фактора. Такое предположение можно сделать по аналогии с данными о том, что один из двух паралогов гексокиназы *Saccharomyces cerevisiae*, а именно гексокиназа II (Hxk II) накапливается в ядрах дрожжей при избытке в среде глюкозы, участвуя в регуляции ее метаболизма (Moreno et al., 2005). В частности Hxk II *Saccharomyces cerevisiae*, по всей видимости, принимает участие в регуляции экспрессии генов мембранных гексозных транспортеров. При высокой концентрации глюкозы в среде транскрипционная активность генов высокоаффинных гексозных транспортеров снижается, а низкоаффинных повышается (Petit et al., 2000).

Кроме того, по литературным данным, ядерная локализация гексокиназы II была показана в клетках HeLa с помощью иммуноцитохимии и субклеточного фракционирования (Neary, Pastorino, 2010). Следует отметить, что в последовательности гексокиназы паразита обнаружен фрагмент MWKWVSDIIKL, ограниченный остатками 164 и 176, который соответствует консенсусу ФХ2-3ФХ2-3ФХФ (где Ф - Leu, Ile, Val, Phe, Met, а Х обозначает любую аминокислоту). Данная последовательность распознается рецептором CRM1 (Xpo1), обеспечивающим транспорт белков между ядром и цитоплазмой клетки. Таким образом, локализация гексокиназы микроспоридий в ядре зараженных клеток свидетельствует о приобретении ферментом паразита дополнительной функции, связанной с регуляцией уровня транскрипции генов хозяина.

Можно предположить, что гексокиназа *P. locustae*, по аналогии с Hxk II *S. cerevisiae*, осуществляет регуляцию экспрессии генов гексозных транспортеров в

ядре зараженной клетки хозяина, 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 хозяина, что хорошо согласуется с картиной, наблюдаемой при патогенезе микроспоридиоза.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бабурина, Г.Н. Дыхательная активность митохондрий гусениц озимой совки *Agrothis segetum* при микроспориidioзе / Г.Н. Бабурина, И.В. Исси, Т.М. Ефименко, М.С. Клянвиньш, Е.Г. Раппопорт, Ю.Я. Соколова // Бюлл. ВИЗР. – 1989. - Вып. 73. - С. 7-10.

Воронин, В.Н., Описание нового вида микроспоридии *Glugea mesocotti* sp. n. (Microsporidia: Glugeidae) из *Mesocottus haitej* (Scorpaeniformes: Cottidae) / В.Н. Воронин, С.С. Юхименко // Паразитология. - 2010. – Вып. 44 (4). - С. 351-355.

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

Долгих, В.В. Особенности углеводного и энергетического обмена микроспоридий *Nosema grylli* и их патогенного воздействия на организм насекомого-хозяина: дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н. / Долгих Вячеслав Васильевич . - Л., 1997. - 144 с.

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

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

Долгих, В.В. Энергетический обмен микроспоридии *Nosema grylli* во время внутриклеточного развития / В.В. Долгих, П.Б. Семенов, М.В. Григорьев // Паразитология. - 2002. - Т. 36. - Вып. 6. - С. 493-501.

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. – С. 147-157.

Долгих, В.В. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства Hsp70 микроспоридий 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.

Исси, И.В. Взаимоотношение микроспоридий с клеткой хозяина / И.В. Исси // Сер. Протозоология. Под ред. Ю.И. Полянского. – Л.: Наука, 1983. – Вып. 31. – С. 121-143.

Исси, И.В. Факторы патогенности микроспоридий – внутриклеточных паразитов насекомых / И.В. Исси, В.В. Долгих, Ю.Я. Соколова, Ю.С. Токарев // Вестник сельскохозяйственной науки. – 2005. – Вып. 3. – С. 17-26.

Исси, И.В. Особенности взаимоотношений микроспоридий и насекомых на ранних этапах заболевания / И.В. Исси., Н.М. Онацкий // Серия "Протозоология". – 1984. – Вып. 9. "Паразито-хозяинные отношения. Эволюция паразитизма у простейших". – С. 102-113.

Исси, И.В. Микроспоридии как тип паразитических простейших / И.В. Исси // В кн.: "Микроспоридии". Сер. "Протозоология" – Л.: Наука, 1986. – С. 6-135.

Исси, И.В. Тип *Microsporidia* Balbiani, 1987 / И.В. Исси, В.Н. Воронин // В кн. *Protista II* - Л.: Наука, 2007. – С. 1418–1532.

Исси, И.В. Микроспоридии мошек. (Определение и краткое описание видов микроспоридий мировой фауны) / И.В. Исси, М.К. Кадырова, Е.Н. Пушкарь, Л.Ф. Ходжаева, С.В. Крылова // Ташкент: ФАН, 1990. – 124 с.

Исси, И.В. Влияние микроспоридий на гормональное состояние насекомых-хозяев / И.В. Исси, Ю.С. Токарев // Паразитология. – 2002. – Т. 36. – Вып. 5. – С. 405-421.

Контримавичус, В.Л. Паразитизм и эволюция экосистем / В.Л. Контримавичус // Ж. общей биологии. – 1982. – Т.43. – № 3. – С.291-302.

Лозинская, Я.Л. Изменение активности детоксицирующих ферментов и антиоксидантного статуса личинок *Galleria mellonella* L. при микроспоридиозе: дисс. к.б.н. / Лозинская Яна Леонидовна. – Новосибирск, 2002. – 126 с.

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

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.

Селезнев, К. В. Микроспоридиоз сверчков *Gryllus bimaculatus* (Gryllidae), вызванный микроспоридией *Nosema grylli* (Nosematidae) / К. В. Селезнев, О.А. Антонова, И.В. Исси // Паразитология. - 1996. - Т. 30. - №3. - С. 250-261.

Селезнев, К.В. Микроспоридиоз сверчка *Gryllus bimaculatus*, вызываемый *Nosema grylli*: дисс. соиск. уч. ст. к. б. н. / Селезнев Константин Владимирович. - Санкт-Петербург, 1997.

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.

Соколова, Ю.Я. Ультраструктурные изменения в клетках чешуекрылых при микроспоридиозе и их роль в оценке патогенных форм: дисс. на соиск. уч. ст. к.б.н. / Соколова Юлия Яновна. - Л., 1990. - 265 с.

Соколова, Ю.Я. Энтомопатогенные простейшие / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // В кн: "Патогены насекомых: структурные функциональные аспекты" под ред. Глупова В.В. - М.: Круглый год. - 2001. - С. 76-188.

Соколова, Ю.Я. Подавление эстеразной активности как специфичная черта патогенеза микроспоридиоза сверчка *Gryllus bimaculatus* / , Ю.Я. Соколова, В.В. Сундуков // Паразитология. - 1999. - Т. 33. - С. 527-535.

Соколова, Ю.Я. Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в норме и при остром микроспоридиозе, вызываемом *Nosema grylli* / Ю.Я. Соколова, Ю.С. Токарев., Я.Л. Лозинская, В.В. Глупов // Паразитология. - 2000. - Т. 32. - С. 408-419.

Тимофеев, С.А. Современные представления о микроспориidioзе человека / С.А. Тимофеев // Вестник РАМН. - 2015. - № 2. - С. 257 – 263. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1321.

Тимофеев, С.А. Особенности экспрессии, структуры и локализации субтилизин-подобной протеиназы микроспоридии *Paranosema locustae* / С.А. Тимофеев, И.В. Сендерский, О.А. Павлова, В.В. Долгих // Паразитология. – 2014.- Т. 48.- Вып. 5. С. 337-347.

Токарев, Ю. С. Иммунные реакции гемолимфы прямокрылых насекомых при микроспориidioзе: дисс. на соиск. ст. к. б. н. / Токарев Юрий Сергеевич. - СПб., 2003.

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

Agarwal, S. Ca(2+)-mediated exocytosis of subtilisin-like protease 1: a key step in egress of *Plasmodium falciparum* merozoites / S. Agarwal, M.K. Singh, S. Garg, C.E. Chitnis, S. Singh // Cellular microbiology. – 2013. - 15 (6). – P. 910—921.

Akiyoshi, D.E. Morrison HG, Lei S, Feng X, Zhang Q, et al. (2009) Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi* / D.E. Akiyoshi, H.G. Morrison, S. Lei, X. Feng, Q. Zhang // PLoS Pathog. – 2009. 5: e1000261 doi:10.1371/journal.ppat.1000261).

Anand, A.N. Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus* / A.N. Anand, M.W. Lorenz // J. Insect Physiol. - 2008; 54:1404–12. [PubMed: 18761344]

Arrese, E.L. Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body / E.L. Arrese, M.T. Flowers, J.L. Gazard, M.A. Wells // J Lipid Res. – 1999. – 40. P. 556–64. [PubMed: 10064744].

Arrese, E.L. The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A(1): identification and characterization / E.L. Arrese, R.T. Patel, J.L. Soulages // *J Lipid Res.* – 2006. – 47 (12). – P. 2656–67. [PubMed: 17005997]

Arrese, E.L. Function and structure of lipid storage droplet protein 1 studied in lipoprotein complexes / E.L. Arrese, L. Rivera, M. Hamada, S. Mirza, S.D. Hartson // *Arch Biochem Biophys.* – 2008. – 473. – P. 42–47. [PubMed: 18342616]

Arrese, E.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation / E.L. Arrese, J.L. Soulages // *Annu Rev Entomol.* - 2010. – 55. – P. 207–225. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.

Aufauvre, J. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides / J. Aufauvre, B. Misme-Aucouturier, B. Vigues, C. Texier, F. Delbac, N. Blot // *PLoS ONE.* - 2014. 9:e91686.

Azeez, O.I. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus / O.I. Azeez, R. Meintjes, J.P. Chamunorwa // *Lipids in Health and Disease.* – 2014. 13:71

Bakowski, M.A. Ubiquitin- mediated response to microsporidia and virus infection in *C. elegans* / M.A. Bakowski, C.A. Desjardins, M.G. Smelkinson, T.A. Dunbar, I.F. Lopez- Moyado, S.A. Rifkin, C.A. Cuomo, E.R. Troemel // *PLoS Pathog.* - 2014.10:e1004200.

Becnel, J.J. Microsporidia in insects. *In: The microsporidia and microsporidiosis* (Wittner M., *Ed.*) / J.J. Becnel, T.G. Andreadis. - Wasington D.C., 1999. – P. 447-501.

Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avesicular mechanisms of function / G.V. Beznoussenko, V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D.D. 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, A.A. Mironov // *J. Cell. Sci.* - 2007. - Vol. 120. - P. 1288-1298.

Bickel, P.E. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores / P.E. Bickel, J.T. Tansey, M.A. Welted // *Biochim Biophys Acta.* - 2009. – 1791 (6). – P. 419–440. doi:10.1016/j.bbalip.2009.04.002.

Bjornson, S. Microsporidia Biological Control Agents and Pathogens of Beneficial Insects / S. Bjornson, D. Oi // *Publications from USDA-ARS UNL Faculty*. Paper 1516. – 2014.

Bossard, G. Secreted proteases of *Trypanosoma brucei gambiense*: Possible targets for sleeping sickness control? / G. Bossard, G. Cuny, A. Geiger // *Biofactors*. – 2013. - 39 (4). – P. 407—414.

Bowen, D. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens* / D. Bowen, T.A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia, R.H. Ffrench-Constant // *Science*. - 1998. – 280. – P. 2129–2132.

Bower, S.M. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish / S.M Bower, S.E. McGladdery, I.M. Price // *Annual Review of Fish Diseases*. – 1994. - Vol. 4. – P. 1-199.

Brasaemle, D.L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis / D.L. Brasaemle // *J. Lipid Res*. – 2007. – 48. – P. 2547–2559. [PubMed: 17878492]

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. 9:e1003676.

Canning, E. U. Pathogenicity of *Nosema locustae* Canning / E.U. Canning // *J. Insect Pathol*. - 1962. - 4:248–256.

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

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. - 1:77.

Cota, D. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake / D. Cota, K. Proulx, K.A. Smith, S.C. Kozma, G. Thomas, S.C. Woods, R.J. Seeley // *Science*. - 2006. – 312. – P. 927–930.

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 Research*. – 2012. – 22 (12). – P. 2478—2488.

Dang, X. Characterization of a subtilisin-like protease with apical localization from microsporidian *Nosema bombycis* / X. Dang, G. Pan, T. Li, L. Lin, Q. Ma, L. Geng, Y. He, Z. Zhou // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2013. – 112. – P. 166–174.

Dolgikh, V. Activities of Enzymes of Carbohydrate and Energy Metabolism of the Spores of the Microsporidian, *Nosema grylli* / V. Dolgikh, Y. Sokolova, I. Issi // *J. Euk. Microbiol.* - 1997. - T.44. - № 3. - P. 246-249.

Dolgikh, V. V. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema* (*Antonosporea*) *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. – 293. – P. 285–291.

Dolgikh, V.V. Immunolocalization of alternative respiratory chain in *Antonosporea* (*Paranosema*) *locustae* spores: mitosomes retain their role in microsporidia energy metabolism / V.V. Dolgikh, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, A.M. Naumov, G.V. Beznoussenko // *Eukaryot Cell*. – 2011. – 10. – P. 588-593

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. - Vol. 28. - № 3. - P.336-337.

Dyková, I. Phylum Microspora / I. Dyková // *In Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections* (ed. Woo P. T. K.). - CAB International, Cambridge, UK: 1995. - Vol. 1. - P. 149–179.

Emanuelsson, O. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools / O. Emanuelsson, S. Brunak, G. Heijne, H. Nielsen // *Nature protocols*. – 2007. – 2. P. 953-971.

Estes, K.A. Non-lytic, actin-based exit of intracellular parasites from *C. elegans* intestinal cells / K.A. Estes, S.C. Szumowski, E.R. Troemel // *PLoS Pathog.* – 2011. 7:e1002227.

Gade, G. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions / G. Gade, K.H. Hoffmann, J.H. Spring // *Physiol Rev.* – 1997. – 77. – P. 963–1032. [PubMed: 9354810].

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. - 6: 73—83.

Glibowicka, M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins / M. Glibowicka, V.G. Nadeau, G. Chen, C.M. Deber // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2009. – 106 (6). 1760-5. doi: 10.1073/pnas.0813167106. Epub 2009 Jan 30.

Goblirsch, M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection / M. Goblirsch, Z.Y. Huang, M. Spivak // *PLoS ONE.* – 2013. 8:e58165.

Gronke, S. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila* / S. Gronke, A. Mildner, S. Fellert, N. Tennagels, S. Petry // *Cell Metab.* – 2005. 1:323–30. [PubMed: 16054079].

Gronke, S. Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila* / S. Gronke, G. Muller, J. Hirsch, S. Fellert, A. Andreou // *PLoS Biol.* – 2007. 5:e137. [PubMed: 17488184].

Gutierrez, E. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism / E. Gutierrez, D. Wiggins, B. Fielding, A.P. Gould // *Nature.* - 2007. Vol 445. doi:10.1038

Halwani, A.E. Apolipophorin-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella* / A.E. Halwani, D.F. Niven, G.B. Dunphy // *J. Invertebr. Pathol.* - 2000. - Vol. 76. - P. 233-241.

Henry, J.E. Natural and applied control of insects by protozoa / J.E. Henry // *Ann. Rev. Entomol.* - 1981. - Vol. 26. - P. 49-73.

Inagaki, S. Metabolic shift from lipogenesis to glycogenesis in the last instar larval fat body of the silkworm, *Bombyx mori* / S. Inagaki, O. Yamashita // *Insect Biochem.* - 1986; 16:327–31.

James, T.Y. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny / T.Y. James et al. // *Nature* – 2006. - 443(7113):818–822.

Karpov, S.A. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia / S.A. Karpov, M.A. Mamkaeva, V.V. Aleoshin, E. Nassonova, O. Lilje, F.H. Gleason // *Front. Microbiol.* - 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00112>

Kharazi-Pakdel, A. Recherches sur la pathogenie de *Nosema melolonthae* (Krieg) / A. Kharazi-Pakdel // *Entomophaga*. - 1968. - Vol. 13. - № 4. - P.289-318.

Kikawada, T. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells / T. Kikawada, A. Saito, Y. Kanamori, Y. Nakahara, K.I. Iwata // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2007. 104:11585–90. [PubMed: 17606922].

Kobe, B. The leucine-rich repeat as a protein recognition *motif* / B. Kobe, A.V. Kajava // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2001. – 11 (6). – P. 725-732.

Kucera, M. The different course of lactate and glutamate dehydrogenases activity in the larvae of *Barathra brassicae* (Lepidoptera) during microsporidian infection / M. Kucera // *Acta entomologica bohemoslovaca*. - 1975. - Vol. 72. - P.370-373.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. - 1970. - Vol. 227. - P.680-685.

Lambertz, U. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis / U. Lambertz, J.M. Silverman, D. Nandan, W.R. McMaster, J. Clos, L.J. Foster, N.E. Reiner // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – Vol. 91. P.887-899.

Leger, R.J.S. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle / R.J.S. Leger, A.K. Charnley, R.M. Cooper // *J. Invertebr. Pathol.* - 1986. 48: 85-95.

Lewis, L.C. Effect of *Perezia pyraustae* on oxygen consumption by the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* / L.C. Lewis, J.A. Mutchmor, R.E. Lynch // *J. Insect Physiol.* - 1971. - Vol. 17. - P.2457-2468.

Malone, L. Factors controlling in vitro hatching of *Vairimorpha plodia* (Microspora) spores and their infectivity to *Plodia interpunctella*, *Heliothis virescens*, *Pieris brassicae* / L. Malone // J. Invertebr. Pathol. - 1984. - Vol. 44. - № 2. - P.192-197.

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. - Vol. 30. - № 3. - P.422-428.

Ma, Z. Genome-wide transcriptional response of silkworm (*Bombyx mori*) to infection by the microsporidian *Nosema bombycis* / Z. Ma, C. Li, G. Pan, Z. Li, B. Han, J. Xu, X. Lan, J. Chen, D. Yang, Q. Chen // PLoS ONE. - 2013. 8:e84137.

McDougall, G.E. Free fatty acids as a source of energy for trehalose synthesis in the fat body of the American cockroach (*Periplaneta americana*) / G.E. McDougall, J.E. Steele // Insect Biochem. - 1988; 18:591–97.

Mendes, A.M. Conserved mosquito/parasite interactions affect development of *Plasmodium falciparum* in Africa / A.M. Mendes, T. Schlegelmilch, A. Cohuet, P. Awono-Ambene, M. De Iorio // PLoS Pathog. - 2008; 4:e1000069. [PubMed: 18483558]

Meyer-Fernandes, J.R. Fat body fructose-2,6-bisphosphate content and phosphorylase activity correlate with changes in hemolymph glucose concentration during fasting and re-feeding in larval *Manduca sexta* / J.R. Meyer-Fernandes, C.P. Clark, K.C. Gondim, M.A. Wells // Insect Biochem. Mol. Biol. - 2001; 31:165–70.

Moreno, F. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway / F. Moreno, D. Ahuatzí, A. Riera, C.A. Palomino, P. Herrero // Biochemical Society Transactions. – 2005. – Vol. 33 (1). – P. 265–268.

Nandan, D. Leishmania EF-1 α 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; 277:50190–50197.

Neary, C.L. Nucleocytoplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell / C.L. Neary, J.G. Pastorino // Biochem Biophys Res Commun. – 2010. – 394 (4). P. 1075–1081. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.129.

Olofsson, S-O. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids / S-O. Olofsson, P. Bostrom, L. Andersson, M. Rurberg, J. Perman, J. Boren // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. 1791:448–8. [PubMed: 187 75796].

Orchard, I. A multifunctional role for octopamine in locust flight / I. Orchard, J.M. Ramirez, A.B. Lange // *Annu Rev Entomol*. - 1993; 38:227–49.

Passier, P.C. Trehalose inhibits the release of adipokinetic hormones from the corpus cardiacum in the African migratory locust, *Locusta migratoria*, at the level of the adipokinetic cells / P.C. Passier, H.G. Vullings, J.H. Diederer, D.J. Vander Horst // *J Endocrinol*. – 1997. 153:299–305. [PubMed: 9166120].

Patel, R.T. Adipokinetic hormone-induced mobilization of fat body triglyceride stores in *Manduca sexta*: role of TG-lipase and lipid droplets / R.T. Patel, J.L. Soulages, E.L. Arrese // *Arch. Insect Biochem. Physiol*. – 2006. 63:73–81. [PubMed: 16983668]

Pavan, C. Changes in the ultrastructure of *Rhynchosciara* cells infected by microsporidia / C. Pavan, R. Basile, R.W. Riess, A.V. Wertz // *Studies in genetics* 6. - Univ. Tex. Publ. - 1971. - Vol. 7103. - P.241-271.

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 // *Journal of Bacteriology*. - 2000. - Vol. 182 (23). - P. 6815–6818.

Rao, L. Solution Behavior and Activity of a Halophilic Esterase under High Salt Concentration / L. Rao, X. Zhao, F. Pan, Y. Li, Y. Xue // *PLoS ONE*. – 2009. - Vol. 4(9).

Ravindran, S. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasite / S. Ravindran, J.C. Boothroyd // *Traffic* - 2008. - 9: 647—656.

Roberts, P.A. Response of *Rhynchosciara* chromosomes to microsporidian infection: increased polyteny and generalized puffing / P.A. Roberts, R.F. Kimball, C.C. Pavan // *Exp. Cell Res*. - 1967. - Vol. 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. - 445 : 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 // *Glycobiology*. – 2006. – 16. P. 1194–1206.

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. - 4 : e4839.

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, O.A. Pavlova, V.V. Dolgikh // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9 (4). e93585.

Shi, W. Unveiling the mechanism by which microsporidian parasites prevent locust swarm behavior / W. Shi, Y. Guo, C. Xu, S. Tan, J. Miao, Y. Feng, H. Zhao, R.J. St Leger, W. Fang // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. 111:1343-1348

Sprague V. Biology of Microsporidia In: Comparative Pathobiology / V. Sprague. - NY, 1976. – Vol. 1. - P. XI.

Stentiford, G.D. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems / G.D. Stentiford, S.W. Feist, D.M. Stone, K.S. Bateman, A.M. Dunn // *Trends in Parasitology*. - 2013. - 29 (11). – P. 567 - 578.

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 // *Journ. Cell Sci.* - 2001. - 114 : 2747—2754.

Szumowski S.C. Microsporidia–host interactions / S.C. Szumowski, E.R. Troemel. *Current Opinion In Microbiology*. – 2015. - 26:10–16.

Szumowski, S.C., The small GTPase RAB-11 directs polarized exocytosis of the intracellular pathogen *N. parisii* for fecal-oral transmission from *C. elegans* / S.C. Szumowski, M.R. Botts, J.J. Popovich, M.G. Smelkinson, E.R. Troemel // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2014. 111:8215-8220.

Tawk, L. A key role for Plasmodium subtilisin-like SUB1 protease in egress of malaria parasites from host hepatocytes. L. Tawk, C. Lacroix, P. Gueirard, R. Kent, O. Gorgette, S. Thiberge, O. Mercereau - Puijalon, R. Menard, J.C. Barale // *Journ. of Biological Chemistry*. - 2013. - 288 (46): 33336—33346.

Teixeira, L. *Drosophila* perilipin/ADRP homologue Lsd2 regulates lipid metabolism / L. Teixeira, C. Rabouille, P. Rorth, A. Ephrussi, N.F. Vanzo // *Mech Dev*. – 2003. 120:1071–81. [PubMed: 14550535]

Tsaousis, A.D. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi* / A.D. Tsaousis, E.R. Kunji, A.V. Goldberg, J.M. Lucocq, R.P. Hirt // *Nature*. - 2008. 453: 553–556.

Tufail, M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms / M. Tufail, M.J. Takeda // *Insect Physiol*. – 2009. 55:87–103. [PubMed: 19071131].

Tusndy, G.E. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction / G.E. Tusndy, I. Simon // *J. Mol. Biol*. – 1998. – 283. – P. 489-506.

Vavra, J. *Methods in microsporidiology* / J. Vavra, J.V. Maddox // *Comparative pathobiology*. NY-London. - 1976. - Vol. 1. - P. 281-319.

Weidner, E. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion / E. Weidner, L.D. Sibley // *J. Protozool*. - 1985. - Vol. 32. - P. 311-317.

Weidner, E. *Microsporidian biochemistry and physiology* / E. Weidner, A.M. Fidley, V. Dolgikh, J. Sokolova // In “The microsporidia and microsporidiosis” - Wasington D.C. - 1999. - P. 172-195.

Weiss, L.M. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* / L.M. Weiss, J.J. Becnel. - Wiley-Blackwell, 2014. - 728 p.

Whitlock, V.H. Stimuli for the in Vitro Germination and Inhibition of *Noosema locusta* (Microspora: Nosematidae) Spores / V.H. Whitlock, S.J. Johnson // *Inv. Pat*. - 1990. - V. 56. - P. 57-62.

Williams, B.A. An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonospora locustae* / B.A. Williams, I. Haferkamp, P.J. Keeling // J Mol Biol. – 2008. – 375. – P. 1249–1257.

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 // Infection and Immunity. - 2006. - 74 (1). – P. 239–247.

Yue, YJ. Early responses of silkworm midgut to microsporidium infection—a Digital Gene Expression analysis / Y.J. Yue, X.D. Tang, L. Xu, W. Yan, Q.L. Li, S.Y. Xiao, X.L. Fu, W. Wang, N. Li, Z.Y. Shen // J. Invertebr. Pathol. - 2015. – 124. – P. 6-14.

Yefimenko, T.M. Effect of Microsporidia infection on the esterases activities in *Agrotis segetum* caterpillars / T.M. Yefimenko, O.V. Sundukov, I.V. Issi // Вестник зоологии. - 2001. - Т. 35. - Вып. 4. - С. 45-50.

Ziegler, R. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* / R. Ziegler, M.M. Ibrahim // J Insect Physiol. – 2001. – 47. – P. 623–27. [PubMed: 11249951].