

УДК 577.29

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ В ОБЛАСТИ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

В.В. Долгих¹, И.В. Сендерский¹, С.А. Тимофеев¹, А.А. Царев¹, Г.В. Митина¹, Е.А. Рогожин²

¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, dolislav@yahoo.com

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В работе обсуждаются первые результаты исследований, проводимых в лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР с использованием методов молекулярной и клеточной биологии по трем направлениям: (1) гетерологичная экспрессия белков в клетках насекомых линии Sf9 для изучения внутриклеточных энтомопатогенов; (2) получение рекомбинантных одноцепочечных антител с использованием технологии фагового дисплея для изучения и диагностики различных энтомо- и фитопатогенов, (3) повышение вирулентности природных изолятов энтомопатогенных грибов с использованием пост-геномных и генно-инженерных подходов.

Ключевые слова: клетки насекомых, микроспоридии, энтомопатогенные грибы, одноцепочечные антитела, гетерологичная экспрессия.

Современные методы генной инженерии, молекулярной и клеточной биологии традиционно широко используются в области фундаментальных биологических, а также медико-биологических исследований. В последнее время они начинают находить свое применение и в области сельскохозяйственной науки, включая исследования в области защиты растений. Мы кратко рассмотрим некоторые результаты использования этих методов в исследованиях, проводимых в лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР.

Первое направление исследований связано с гетерологичной экспрессией белков в клетках насекомых линии Sf9 кукурузной листовой совки *Spodoptera frugiperda* [Vaughn et al., 1977] для изучения внутриклеточных энтомопатогенов. Ранее мы показали, что энтомопатогенные микроспоридии (близкие к грибам внутриклеточные паразиты) секретируют в зараженную клетку белки, относящиеся к различным функциональным категориям [Долгих и др., 2010]. Наиболее интересным результатом иммунолокализации секретируемых белков микроспоридии *Paranosema locustae* в зараженных клетках жирового тела перелетной саранчи оказалось специфичное накопление гексокиназы II паразита в ядрах хозяина [Senderskiy et al., 2014]. Для дальнейшего изучения этого вопроса мы осуществили гетерологичную экспрессию гексокиназы *P. locustae* в клетках линии Sf9. С целью обеспечения синтеза гетерологичного белка в цитоплазме клеток насекомых, из состава гексокиназы был удален сигнальный пептид, ответственный за ее секрецию. Проведенный эксперимент ясно показал, что гетерологичная экспрессия белка паразита

сопровождалась его специфичным накоплением в ядрах клеток Sf9, что подтверждает важную роль гексокиназы микроспоридий в воздействии на транскрипционную активность генов хозяина. В дальнейшем мы планируем использовать данную модель для выяснения роли других белков, выделяемых микроспоридиями, в патогенезе зараженной клетки и насекомого в целом, а также для гетерологичной экспрессии различных целевых функционально активных полипептидов.

Второе направление исследований связано с созданием библиотек рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv-антител) на основе переменных фрагментов иммуноглобулинов мышей [Huston et al., 1988], иммунизированных определенным антигеном. Отбор антител, специфичных к данному антигену, из сконструированных библиотек осуществляется с использованием технологии фагового дисплея [Breitling et al., 1991]. К настоящему времени нами получены рекомбинантные scFv-антитела против: (1) глютенин-гидролизующей протеиназы клопа вредная черепашка *Eurygaster integriceps*, (2) белка оболочки одного из штаммов вируса картофеля Y, (3) одного из белков микроспоридии *P. locustae*, секретируемых паразитом в цитоплазму зараженной клетки. Наряду с поиском новых антител, в настоящее время осуществляется генно-инженерная модификация уже полученных с целью повышения их антиген-связывающей способности и стабильности.

Третье направление исследований связано с использованием генно-инженерных подходов для повышения вирулентности природных штаммов энтомопатогенных

грибов и проводится совместно с сотрудниками ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. На основании последовательностей двух токсинов-блокаторов ионных каналов насекомых из яда пауков созданы конструкции для их встраивания в геном энтомопатогенных грибов родов *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* и последую-

щей гетерологичной экспрессии в секретируемой форме под контролем сильных промоторов. В настоящее время подбираются условия для эффективной трансформации различных штаммов грибов созданными конструкциями.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№№ 15-04-04968, 15-08-04247, 16-34-60217).

Библиографический список (References)

Долгих ВВ, Павлова ОА, Сендерский ИВ, Пэн Г. 2010. Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Вестник Защиты Растений. N1: 48–51.

Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. and Little, M. 1991. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 147–53.

Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotný, J.; Margolies, M. N.; Crea, R. (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain

Fv analogue produced in *Escherichia coli*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16): 5879–5883.

Senderskiy IV, Timofeev SA, Seliverstova EV, Pavlova OA, Dolgikh VV. 2014. Secretion of *Antonosporea (Paranosema) locustae* proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes. *PLoS One*. 9(4):e93585. doi: 10.1371/journal.pone.0093585

Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)". *In Vitro* 13 (4): 213–217.

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 64–65

APPLICATION OF MOLECULAR AND CELL BIOLOGY APPROACHES IN THE FIELD OF PLANT PROTECTION

V.V. Dolgikh¹, I.V. Senderskiy¹, S.A. Timofeev¹, A.A. Tsarev¹, G.V. Mitina¹, E.A. Rogozhin²

¹*All-Russian Institute of Plant Protection, dolislav@yahoo.com*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*

The paper discusses the first results of the experiments carried out in the laboratory of microbiological control of All-Russian Institute of Plant Protection that use methods of molecular and cell biology in three areas: (1) the expression of heterologous proteins in Sf9 insect cell line to study the intracellular entomopathogens; (2) construction and selection scFv-antibodies using phage display technology for the study and diagnostic of entomo- and phytopathogens; (3) increasing the virulence of natural isolates of entomopathogenic fungi using post-genomic and genetic engineering approaches.