

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА В АВЕЗИКУЛЯРНЫХ КЛЕТКАХ МИКРОСПОРИДИИ *PARPARANOSEMA* (*ANTONOSPORA*) *LOCUSTAEAE*

© В. В. Долгих,¹ И. В. Сендерский,¹ О. А. Павлова,¹ Г. В. Безнушенко²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, и ² Институт фармакологических исследований Марио Негри, Санта Мария Имбаро, Италия;

¹ электронный адрес: dolislav@yahoo.com

Длительная адаптация микроспоридий, обширной группы родственных грибам одноклеточных микроорганизмов, к внутриклеточному паразитизму привела к чрезвычайной минимизации функционального аппарата клетки и потере большинства органелл. Структурный анализ секреторного аппарата микроспоридий рода *Paranosema* показал, что комплекс Гольджи (КГ) паразитов представлен разветвленной сетью тубул, соединяющих эндоплазматический ретикулум (ЭР) с плазматической мембраной и формирующейся полярной трубкой, но лишенной транспортных везикул. Изолированные везикулы не удалось обнаружить даже при использовании ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением и применении ингибиторов их слияния (раздевания). При этом в геноме паразитов обнаружен целый ряд генов, традиционно вовлеченных в процессы везикулярного транспорта. В настоящей работе проведен анализ ОТ-ПЦР содержания мРНК транскриптов шести генов везикулярного транспорта, кодирующих β - и β' -субъединицы коаномерного комплекса COPI, Sec13- и Sec31-субъединиц COPII, синтаксин-подобный белок семейства SFT и SNARE-белок синаптобrevин в стадиях внутриклеточного развития микроспоридии *P. locustae*. Для всех изученных генов уровень экспрессии соизмерим с наблюдаемым уровнем гена альтернативной оксидазы — фермента, вовлеченного в центральный метаболизм паразита. Поликлональные антитела, полученные против рекомбинантной Sec13-субъединицы COPII, экспрессированной в *Escherichia coli*, показали накопление белка в стадиях внутриклеточного развития и спорах паразита, а также его связь с мембранами. Присутствие компонентов системы везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридий требует дальнейшего функционального анализа.

Ключевые слова: микроспоридии, везикулярный транспорт, экспрессия генов.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДСН — додецил сульфата натрия, ДСН-ПАГЭ — электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, ИПТГ — изопропил- β -D-тиогалактопиранозид, КГ — комплекс Гольджи, ОТ — обратная транскриптаза, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с использованием в качестве матрицы кДНК, синтезированной с помощью ОТ, ЭР — эндоплазматический ретикулум.

Микроспоридии представляют собой обширную группу филогенетически близких к грибам облигатных внутриклеточных паразитов, обнаруженных у представителей всех типов животного царства от простейших до приматов, за исключением губок. Широкое распространение и возрастающее число видов, являющихся возбудителями оппортунистических инфекций у людей с ослабленным иммунитетом (Weber et al., 1994), обуславливают практическое значение группы. Длительная адаптация паразитов к внутриклеточному развитию привела к чрезвычайной минимизации функционального аппарата клетки. У всех изученных видов микроспоридий отсутствуют митохондрии и другие классические органеллы, за исключением ядра, эндоплазматического ретикулума (ЭР) и видоизмененного комплекса Гольджи (КГ). Детальный структурный анализ секреторного аппарата микроспоридий *Paranosema* (*Nosema*, *Antonospora*) *grylli* и *P. locustae* показал, что аналоги КГ паразитов представлены сетью раз-

ветленно-варикозных тубул диаметром 25—40 нм. Данная тубулярная сеть соединяет ЭР с плазматической мембраной и формирующейся полярной трубкой, но лишена каких-либо везикул (Beznoussenko et al., 2007). Везикулы в данном исследовании не были обнаружены даже при применении метода ультрабыстрой криофиксации структур клетки под высоким давлением (McIntosh, 2001) и ингибировании процессов слияния и «раздевания» (uncoating) COP-везикул соответственно с помощью N-этил-малеимида (Mironov et al., 2001) и AIF₄ (Cole et al., 1996).

Как показали результаты расшифровки генома патогена человека *Encephalitozoon cuniculi* и еще незавершенный проект по изучению генома микроспоридии *P. locustae* (*Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole), список генов, свойственных эукариотической клетке у паразитов этой группы, также крайне редуцирован (Katinka et al., 2001). Несмотря на это, целый ряд генов, традиционно вовлеченных в про-

Список праймеров, использованных для ОТ-ПЦР-анализа и экспрессии Sec13-субъединицы СОPI

Кодируемый белок	Размер гена (п. н.)	Нуклеотидная последовательность 5'—3'
Sec13	810	Прямой: ^a ggatccGATGGAGGTGCAGAGGGAGATCATACAC Обратный: aagcttTTATTCAGACTTCTTCAGCGG
Sec31	2622	Прямой: ggatccGATGATAAACAACGCTGCATCACAGC Обратный: gaattcAGCTGAGGGCGACCTGCAGAAGGG Прямой (фрагмента 400 п. н.): CGAGGTGCACGAAACGCCTC
β-COP	2424	Прямой: ggatccGATGGCAACGCTTTACATCGACGTG Обратный: gaattcAGTCCTTGAGACCTCGAAGTGTC Прямой (фрагмента 401 п. н.): AACCGAGATGCACACGAAC
β'-COP	373 ^b	Прямой: CAGAACACAAACAAGGCAA Обратный: ATTGTAGAACACCGTTCCTC
Синтаксин семейства SFT	528	Прямой: ggatccGATGAAATACAACACACTCGAAGAAGC Обратный: gaattcTATCTTCTAAGCATAAGACTTGC
Синаптобrevин	273	Прямой: ggatccGATGGGAGACATAACGGACGCC Обратный: gaattcTTACTTTTTGAAAAGAGTCACG
Альтернативная оксидаза	622	Прямой: ggatccGATCACACTCTTGGACCTGAGTAGA Обратный: aagcttAGTCTGCCATGCTGTGGTTTGTAT

^a Строчными буквами в 5'-области ряда праймеров указаны добавленные сайты для ферментов рестрикции. ^b Указан размер амплифицированного фрагмента, полноразмерную копию гена не изучали.

цессы везикулярного транспорта, в геноме паразитов присутствует. В частности, в геноме *E. cuniculi* обнаружено 6 субъединиц комплекса СОPI (кроме ε-COP), все субъединицы СОPII (за исключением Sec24) и 6 SNARE-белков (синаптобrevин, синтаксин 5, VAMP, Bos1, Vti1 и синтаксинподобный белок семейства SFT) (Katinka et al., 2001). Эти данные поднимают вопрос об уровне экспрессии перечисленных генов у микроспоридий. С одной стороны, отсутствие у микроспоридий присущих КГ коагомерзависимых везикул размером 50—60 нм может коррелировать с отсутствием или низким уровнем экспрессии генов, вовлеченных в их формирование и слияние. С другой стороны, если активная экспрессия перечисленных выше белков наблюдается, их новая функция в авезикулярной клетке неизвестна и требует дальнейшего изучения.

В настоящей работе осуществляли выделение и очистку микроспоридий *P. locustae*, находящихся на разных стадиях внутриклеточного развития, в градиенте плотности Перколла, выделение суммарной РНК с последующим анализом ОТ-ПЦР. Обнаружили накопление в клетках паразита мРНК транскриптов 6 генов, вовлеченных в формирование и работу транспортных везикул. Для гена, кодирующего одну из субъединиц коагомерного комплекса СОPII, показано накопление белкового продукта в клетках паразита. Присутствие компонентов системы везикулярного транспорта у авезикулярных микроспоридий требует их дальнейшего функционального анализа.

Материал и методика

Микроспоридии *P. locustae* на разных стадиях внутриклеточного развития (меронты, споронты) и споры выделяли из жирового тела искусственно зараженной саранчи *Locustae migratoria* с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла по ранее разработанной методике (Seleznev et al., 1995).

ОТ-ПЦР-анализ. Общая РНК стадий была выделена с помощью реагента PureZOL (Bio-Rad, США) и очищена согласно инструкции фирмы-производителя. К 200 мкл суспензии, содержащей $3 \cdot 10^8$ клеток паразита, добавляли 1 мл реагента, инкубировали 5 мин на льду и 5 мин при комнатной температуре. После добавления 0.2 мл хлороформа суспензию держали на льду еще 5 мин и центрифугировали 15 мин при 14 000 г. К отобранной верхней фазе добавляли 0.8 мл изопропанола и после 5-минутной инкубации на льду РНК осаждали центрифугированием при тех же условиях. Осадок тщательно отмывали 75%-ным этанолом и растворяли в 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 2.5 мМ MgCl₂ и 0.1 мМ CaCl₂. Примесь ДНК разрушали в присутствии ингибитора РНКазы (5 Е) (Fermentas, Литва) и очищенного от РНКазы фермента ДНКазы I (5 Е) (Fermentas, Литва) в течение 1 ч при 37 °С. кДНК синтезировали в 20 мкл раствора, содержащего 2.5 мкг РНК, 10 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ по 1 мМ каждого дНТФ, 1 мкг олиго-дТ в качестве затравки, 200 Е Revert Aid™ M-MuLV-обратной транскриптазы (ОТ) (Fermentas, Литва) и 5 Е ингибитора РНКазы, в течение 1 ч при 37 °С. ОТ инактивировали 5 мин при 95 °С и использовали 1.6 мкл смеси для постановки ПЦР в 20 мкл смеси. Таким образом, в каждую пробирку добавляли количество кДНК, синтезированное на 200 нг суммарной РНК. Реакционная смесь помимо кДНК содержала 67 мМ Трис-НСl (рН 8.6), 2.5 мМ MgCl₂, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄ по 0.5 мМ каждого дНТФ, 10 пмоль соответствующих праймеров (см. таблицу) и 2.5 Е TaqДНК-полимеразы (Силекс, Россия). Матрицу денатурировали 3 мин при 94 °С и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов, каждый из которых включал в себя денатурацию (94 °С, 30 с), отжиг (58 °С, 30 с) и синтез (72 °С, 30 с). В контроле в качестве матрицы использовали 1 мкг геномной ДНК (положительный контроль) или смесь для синтеза кДНК без добавления ОТ (отрицательный контроль). Праймеры для амплификации генов

и их фрагментов были подобраны согласно результатам расшифровки генома *P. locustae* (*Antonosporea locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272, <http://jvpc.mbl.edu/Nosema/index.html> или <http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonosporea01?page=intro>).

Гетерологичная экспрессия Sec13-субъединицы COPII в *Escherichia coli*. Кодирующая последовательность была амплифицирована методом ПЦР с помощью высокоточной *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) и праймеров, использованных для ОТ-ПЦР-анализа (см. таблицу). В качестве матрицы использовали геномную ДНК паразита, выделенную по ранее описанной методике (Dolgikh et al., 2009). ПЦР-продукт размером около 800 п. н., содержащий тупые концы, был выделен из агарозного геля, клонирован в векторе pBlue-script KS(+) (Stratagene, США), линейаризованном с помощью фермента рестрикции *Sma*I, и встроено в вектор pRSETb (Invitrogen, США) по сайтам ферментов *Bam*HI и *Hind*III с сохранением рамки считывания. Полученная конструкция была проверена с помощью секвенирования около 600 нуклеотидов ниже промотора T7, встроенного в вектор pRSET.

Экспрессию осуществляли в штамме C41 *E. coli*, созданном для эффективной наработки белков на основе клеток BL21(DE3) (Migroux, Walker, 1996). Свежие колонии бактерий, трансформированных полученной конструкцией, инокулировали в среду LB, содержащую ампицилин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37 °С без добавления или с добавлением изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид (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 1 мМ ИПТГ (конечная концентрация). Бактерий осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, отмывали дистиллированной водой и разрушали ультразвуком в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.3 М NaCl. Белковые включения осаждали при 1500 g в течение 10 мин, тщательно отмывали тем же раствором в присутствии 0.5 % Тритона X-100 и рекомбинантный белок экстрагировали раствором 8 М мочевины, удаляя нерастворенный дебрис центрифугированием при 14 000 g в течение 5 мин.

Получение и очистка антител к рекомбинантному белку. Растворенный в 8 М мочеvine белок разводили в 10 раз буфером для разрушения, смешивали с равным объемом адьюванта Фрейнда (Sigma, США) (полный для первой инъекции и неполный для последующих) и использовали для иммунизации. Кроликов иммунизировали с помощью трех внутримышечных инъекций (около 0.3 мг белка на инъекцию) с 10-суточным интервалом. Через 10 сут после последней иммунизации отбирали 15 мл крови для последующего анализа. Для очистки специфических антител около 0.5 мг рекомбинантного белка Sec13 разделяли с помощью ДСН-ПАГЭ в 12%-ном геле (Laemmli, 1970), переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) и окрашивали с помощью Понсо. Полоски мембраны, соответствующие перенесенному белку, аккуратно вырезали, отмывали ТТБС, содержащим 50 мМ Трис-НСl (pH 7.4), 150 мМ NaCl и 0.05 % Tween-20, блокировали 1 ч при комнатной температуре в ТТБС в присутствии 1%-ного БСА и инкубировали с 50 мл иммунной сыворотки, разведенной 1 : 100 в ТТБС. После инкубации в течение 12 ч при 4 °С сыворотку меняли на свежеразведенную и процедуру повторяли еще 3 раза. После тща-

тельной отмывки мембран ТТБС и затем ТБС (ТТБС без добавления Tween-20) антитела элюировали в 250 мкл 0.2 М глицин-НСl (pH 2.5), нейтрализовали добавлением 15 мкл 1 М Трис (нетитрованного) и 2.5 мкл 5 М NaCl. Элюцию повторяли несколько раз, фракции объединяли, концентрировали с помощью концентратора Microcon® (Millipore, США) и очищенные антитела хранили при -20 °С в присутствии БСА (1 мг/мл) и 50 % глицерина.

ДСН-ПАГЭ и иммуноблоттинг. Пробы белков смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-НСl-буфера, содержащего 4 % ДСН, 10 % 2-меркаптоэтанола и 20 % глицерина, и инкубировали в течение 10 мин при 95 °С. Белки разделяли с помощью ДСН-ПАГЭ в 12%-ном геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США), окрашивали с помощью красителя Кумасси R-250 или переносили на мембрану PVDF того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции. Мембраны блокировали 1 ч в присутствии ТТБС, 1 % БСА и инкубировали с разведенными тем же раствором 1 : 25 или 1 : 125 очищенными анти-Sec13-антителами в течение ночи при 4 °С. После отмывки в ТТБС мембраны инкубировали 2 ч при комнатной температуре с разведенными 1 : 4000 в ТТБС антителами, специфичными к IgG кролика и конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). После очередной отмывки в ТТБС мембрану для проявления пероксидазной реакции инкубировали в свежеразведенном растворе, содержащем ТБС, 15 % метанола, 0.05 % 4-хлоро-1-нафтола (Sigma, США) и 0.02 % H₂O₂.

Результаты

Экспрессия генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридий. Разделение в 1%-ном агарозном геле суммарной РНК, выделенной из 3 · 10⁸ стадий внутриклеточного развития микроспоридии *P. locustae* с помощью реагента RneZOL (Bio-Rad, США), показало хорошую эффективность метода и сохранность полос, соответствующих основным фракциям 23S и 16S рибосомальной РНК микроспоридий (Curgu et al., 1990) (рис. 1, дорожка 1). Следует отметить, что попытка выделить тем же методом РНК из 1.5 · 10⁹ зрелых спор не привела к положительному результату (рис. 1, дорожка 2). Выделенная РНК была использована для синтеза кДНК после удаления примесей геномной ДНК с помощью фермента ДНКазы I. Поскольку для синтеза использовали универсальный олиго-дТ-праймер, набор кДНК продуктов пропорционально отражал содержание мРНК транскриптов, имеющих в 3'-концевой области последовательность поли-А. Полученная кДНК была использована для анализа экспрессии 6 генов, вовлеченных в везикулярный транспорт: β- и β'-субъединиц коацерватного комплекса COPI, субъединиц Sec13 и Sec31 комплекса COPII, синтаксин-подобного белка семейства SFT и SNARE-белка синаптобrevина. ПЦР-амплификация полноразмерных копий генов показала, что эффективность ПЦР снижается с увеличением размера амплифицируемого фрагмента (рис. 2, а). Копии генов размером более 2000 п. н. (Sec31 и β-COPI) синтезировались значительно хуже по сравнению с генами длиной менее 1000 п. н. (Sec13, синаптобrevин, белок семейства SFT). В связи с этим для протяженных генов (Sec31, β-COP и β'-COP) были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать 3'-концевые фрагменты ге-

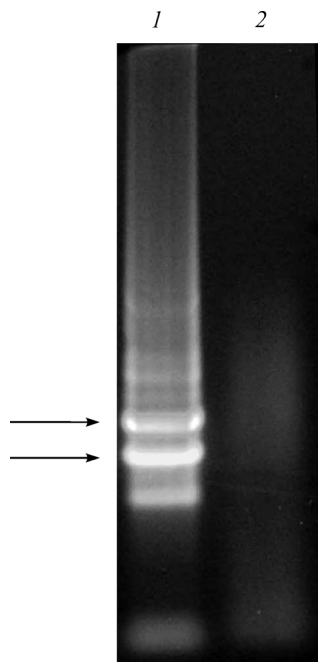


Рис. 1. Выделение суммарной РНК микроспоридии *Paranosema locustae*.

РНК выделяли из стадий внутриклеточного развития (дорожка 1) и спор (дорожка 2) микроспоридий, разделяли в 1%-ном агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. Наличие четких полос, соответствующих 23S и 16S рРНК (указаны стрелками), свидетельствует о хорошей сохранности РНК, выделенной из стадий.

нов длиной около 400 п. н. (см. таблицу). ПЦР-анализ с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты ДНК до 1000 п. н., показал примерно одинаковый уровень экспрессии шести изученных генов (рис. 2, б). Использование в качестве матрицы кДНК, синтезированной на 200 нг суммарной РНК стадий, обеспечивало выход ПЦР-продукта, соизмеримый с таковым для 1 мкг геномной ДНК паразита (положительный контроль). Более того, уровень экспрессии генов везикулярного транспорта оказался сравнимым с уровнем экспрессии гена альтернативной оксидазы — фермента, участвующего в центральном метаболизме паразита и обеспечивающего передачу электронов на кислород. Полученный результат не являлся следствием присутствия остатков геномной ДНК в пробах, поскольку в контрольных экспериментах, когда ОТ не была добавлена в смесь для синтеза кДНК, положительная реакция отсутствовала.

Экспрессия в *E. coli* и выделение субъединицы Sec13 COPII *P. locustae*. При трансформации *E. coli* плазмидой pRSETb, содержащей ген субъединицы Sec13 COPII *P. locustae*, наблюдали токсичное влияние чужеродного белка на рост бактерий. Несмотря на то что на чашках с твердой средой LB выросли колонии нормального размера, при добавлении в среду индуктора экспрессии ИПТГ развития колоний не наблюдали. Инокуляция свежих колоний в жидкую среду и культивирование в течение ночи при 37 °С показали, что наиболее эффективная экспрессия рекомбинантного белка происходит без добавления индуктора (рис. 3, а). Вероятно, низкий уровень экспрессии, наблюдаемый в отсутствие ИПТГ (так называемая протечка промотора), обеспечивает менее токсичное воздействие на клетку *E. coli* по сравнению с индукцией и быстрым накоплением чужеродного

продукта. Это в свою очередь приводит к более эффективному постепенному накоплению белка в бактериальной культуре. Мол. масса рекомбинантного белка, оцененная с помощью ДСН-ПАГЭ, составила около 34 кДа, что соответствует предсказанному размеру (30 кДа) с учетом дополнительного N-терминального пептида вектора (4 кДа).

Центрифугирование разрушенных ультразвуком бактерий показало, что рекомбинантный продукт накапливается в клетках в виде нерастворимых белковых включений, может быть осажден с помощью низкоскоростного центрифугирования и специфично экстрагируется с помощью 8 М мочевины. Как показал ДСН-ПАГЭ, использованная схема выделения позволила получить достаточно чистый белок для получения специфичных антител (рис. 3, б).

Накопление белка Sec13 в клетках микроспоридий. Иммунизация кроликов выделенным белком позволила получить иммунную сыворотку, специфично реагирующую с рекомбинантным Sec13 при разведении 1 : 500 (не показано). Поликлональные анти-Sec13-антитела были дополнительно очищены против иммобилизованного на нитроцеллюлозном фильтре рекомбинантного продукта и использованы для иммуноблоттинга с белками микроспоридий. В ходе эксперимента было установлено накопление субъединицы Sec13 комплекса COPII в спорах и стадиях внутриклеточного развития *P. locustae* (рис. 4). При этом содержание белка в стадиях (рис. 4, дорожка 5) было несколько выше, чем в спорах (рис. 4, дорожки 1—4). Это может быть связано с вовлечением секреторного аппарата микроспоридий в процессы спорообразования и пролиферации клеток. Мол. масса белка, выявленного в клетках паразита, составила около 30 кДа, что соответствует значению, предсказанному по аминокислотной последовательности. С целью изучения внутриклеточной локализации комплекса COPII споры *P. locustae* были разрушены в 25 мМ Трис-HCl-буфере (pH 8.0) в присутствии 0.3 М сахарозы и последовательно центрифугированы при различных скоростях. Анализ полученных осадков, ресуспендированных в том же буфере до объема конечного супернатанта, показал, что изучаемый белок присутствует в грубом дебрисе (осадке после 10-минутного центрифугирования при 200 g), мембранной фракции (осадках после центрифугирования в течение 20 мин при 20 000 g и в течение 1 ч при 460 000 g), а также в растворимой фракции (супернатанте). При этом наибольшая часть белка была обнаружена в мембранной фракции.

Обсуждение

В настоящей работе мы показали что, несмотря на непрерывность секреторного пути микроспоридий и отсутствие транспортных везикул, в клетках паразитов сохраняется транскрипционная активность генов, вовлеченных в их формирование и слияние с мембранами мишеней. Кроме того, для Sec13-субъединицы комплекса COPII показаны не только присутствие мРНК транскриптов, но и накопление белка в клетках паразита, а также его ассоциация с мембранной фракцией. Полученные результаты поднимают вопрос о том, какую роль могут выполнять изученные гены в авезикулярных клетках паразита. Одной из предполагаемых функций COPII-комплексов микроспоридий может быть их участие в сортировке и концент-

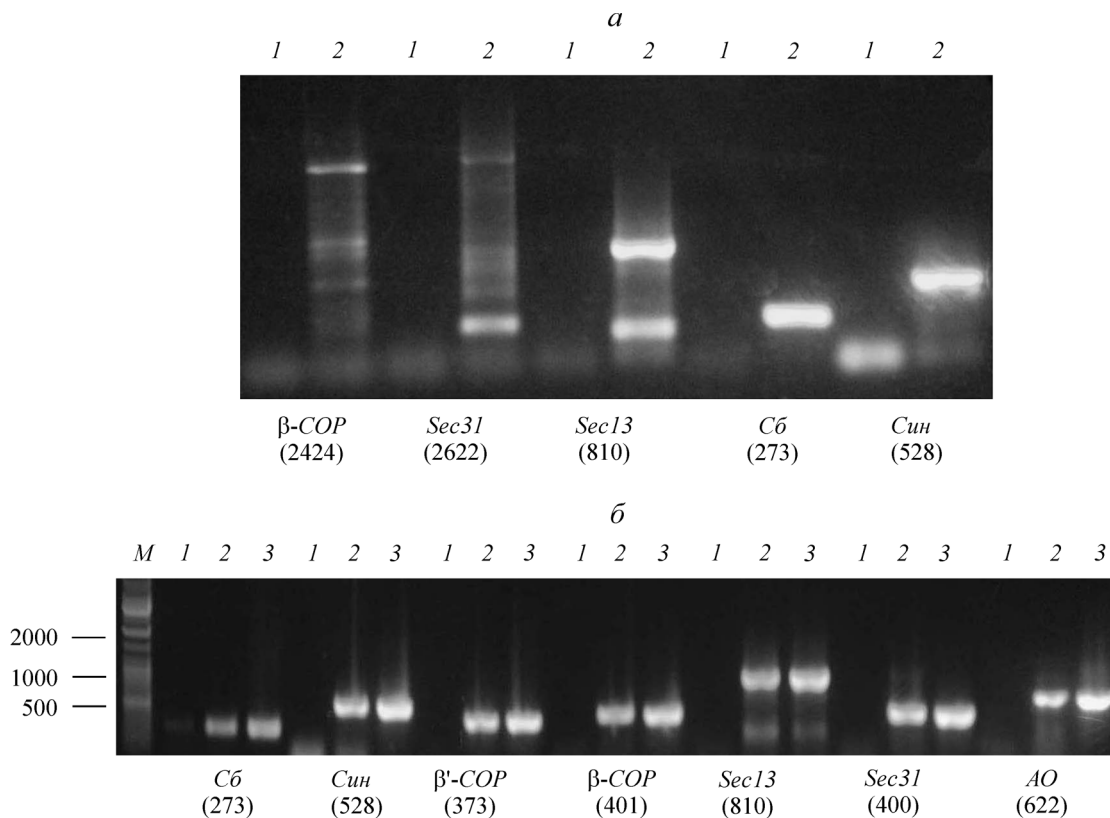


Рис. 2. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии 6 генов везикулярного транспорта в стадиях внутриклеточного развития *Paranosema locustae*.

а — амплификация полноразмерных копий генов показала, что эффективность ПЦР снижается с увеличением размера продукта; *б* — ПЦР с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать фрагменты до 1000 п. н., показала примерно одинаковый уровень экспрессии 6 изученных генов и гена кодирующего альтернативную оксидазу. *Cb* — синаптобrevин, *Csn* — синтаксин-подобный белок семейства SFT, β' -COP и β -COP — субъединицы комплекса COP1, *Sec13* и *Sec31* — субъединицы COPII, *AO* — альтернативная оксидаза. В скобках указан ожидаемый размер амплифицирующихся фрагментов (п. н.). 1 — отрицательный контроль (ОТ не была добавлена в смесь для синтеза кДНК), 2 — опыт (кДНК синтезирована в присутствии ОТ), 3 — положительный контроль (амплификация с использованием геномной ДНК в качестве матрицы), *M* — маркеры молекулярной массы (п. н.).

рировании секретируемых карго-белков (Beznoussenko, Mironov, 2002). Для выяснения этого вопроса необходимо проведение дальнейших экспериментов, связанных с иммулокализацией, выделением и анализом COP-комплексов и SNARE-белков микроспоридий.

Не менее интересным представляется вопрос и о том, насколько пример авезикулярного транспорта, обнаруженный в клетках микроспоридий рода *Paranosema*, является уникальным, связан ли он с минимизацией паразитической клетки при переходе к внутриклеточному паразитизму и наблюдается ли подобная ситуация у свободноживущих организмов. Поскольку филогенетическая связь микроспоридий с грибами к настоящему времени фактически доказана (Fischer, Palmer, 2005), интерес представляют данные ультраструктурного анализа секреторного аппарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — одного из модельных объектов клеточной биологии. Структуры, эквивалентные КГ, впервые были описаны у дрожжей *S. cerevisiae* как изолированные мембранные элементы, окруженные мелкими везикулами (Preuss et al., 1992). Позднее было установлено, что независимо распределенные в цитоплазме элементы представляют собой кластеры тубул, часто содержащих на конце утолщения в виде секреторных гранул (Rambourg et al., 1993). Изучение трехмерной структуры секреторного аппарата дрожжей с помощью стерео-электронной микроскопии показало, что тубулярная сеть КГ обеспечивает непрерывную связь между ЭР и формируемыми секреторными гранула-

ми. Поскольку при анализе крайне редко выявлялись изолированные везикулы, тубулы и вакуоли, авторы делают вывод о непрерывности секреторного пути в клетках

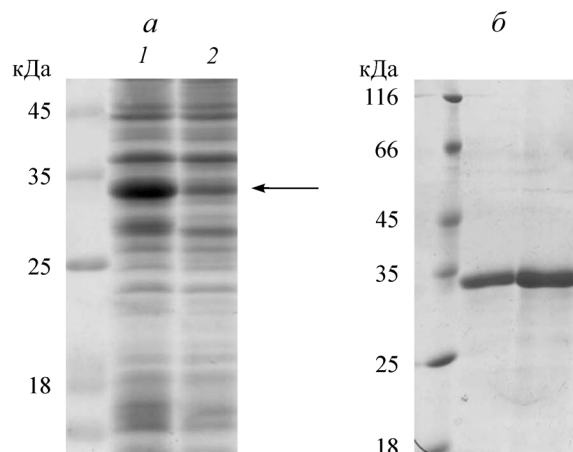


Рис. 3. Гетерологичная экспрессия в *Escherichia coli* и очистка Sec13 субъединицы COPII *Paranosema locustae*.

а — анализ экспрессии белка Sec13 (*стрелка*) в *E. coli*; при культивировании бактерий без добавления индуктора изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (дорожка 1) видна более эффективная наработка рекомбинантного продукта, чем в присутствии индуктора (дорожка 2). *б* — анализ белка, экстрагированного 8 М мочевиной из выделенных включений (на дорожки нанесены разные аликвоты экстракта). Белки разделяли с помощью ДСН-ПАГЭ и окрашивали Кумасси G-250.

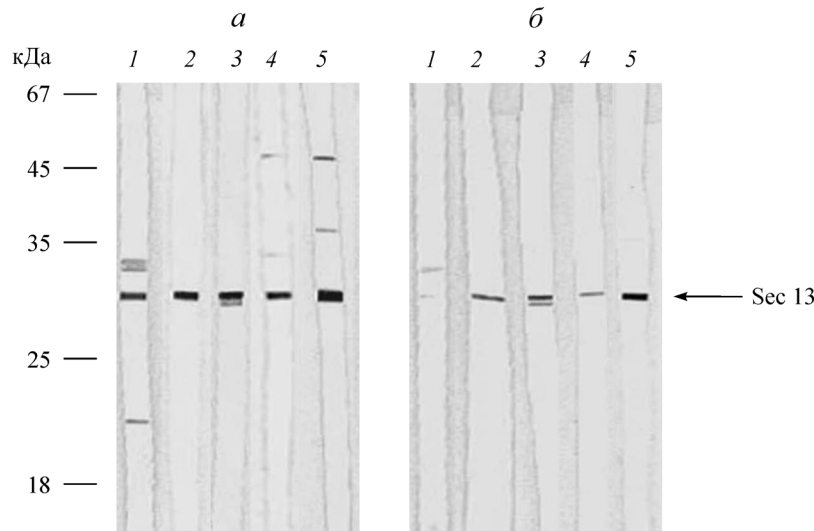


Рис. 4. Иммуноблоттинг белков *Paranosema locustae* с очищенными анти-Sec-антителами.

Очищенные споры разрушали в присутствии 0.3 М сахарозы. Осадки после последовательного центрифугирования гомогената (100 г, 10 мин — дорожка 1; 20 000 g, 20 мин — дорожка 2; 430 000 g, 1 ч — дорожка 3) были ресуспендированы в том же буфере до объема конечного супернатанта (дорожка 4) и равные аликвоты проанализированы с помощью иммуноблоттинга; 5 — белок стадий внутриклеточного развития, нанесенный в том же количестве, что и растворимый белок спор (на дорожку 4 и 5 нанесено по 20 мкг белка). Перенесенные на фильтр белки инкубировали с разведенными 1 : 25 (а) или 1 : 125 (б) очищенными анти-Sec13-антителами.

S. cerevisiae (Rambourg et al., 2001). Вероятно, данный тип строения КГ не является универсальным даже среди дрожжевых грибов. Например, секреторный аппарат митотрофных дрожжей *Pichia pastoris* представляет собой стопку из 3—4 изолированных цистерн, непосредственно примыкающих к ЭР (Mogelsvang et al., 2003). Однако принципиальное сходство в строении КГ микроспоридий рода *Paranosema* (Beznoussenko et al., 2007) и дрожжей *S. cerevisiae* позволяет заключить, что авезикулярный транспорт не является уникальным для данной группы паразитов и встречается по крайней мере у некоторых свободноживущих родственных грибов. Уникальной особенностью КГ микроспоридий является полное отсутствие транспортных везикул, что может быть связано с утратой ряда ключевых генов (Katinka et al., 2001) при переходе к внутриклеточному паразитизму.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01358).

Список литературы

- Beznoussenko G. V., Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Semenov P. B., Tokarev Y. S., Trucco A., Micaroni M., Di Giandomenico D., Auinger P., Senderskiy I. V., Skarlato S. O., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Y. Y., Pavelka M., De Matteis M. A., Luini A., Sokolova Y. Y., Mironov A. A. 2007. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avascular mechanisms of function. *J. Cell Sci.* 120 : 1288—1298.
- Beznoussenko G. V., Mironov A. A. 2002. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *Anat. Rec.* 268 : 226—238.
- Cole N. B., Sciaky N., Marotta A., Song J., Lippincott-Schwartz J. 1996. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell.* 7 : 631—650.
- Curgy J. J., Vavra J., Vivares C. 1990. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell.* 38 : 49—52.
- Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Beznoussenko G. V. 2009. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonosporea) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 293 : 285—291.
- Fischer W. M., Palmer J. D. 2005. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36 : 606—622.
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thomaat F., Prensier G., Barbe V., Peyretaillade E., Brottier P., Winkler P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414 : 450—453.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- McIntosh J. R. 2001. Electron microscopy of cells: a new beginning for a new century. *J. Cell. Biol.* 153 : F25—F32.
- Mironov A. A., Beznoussenko G. V., Nicoziani P., Martella O., Trucco A., Kweon H. S., Di Giandomenico D., Polishchuk R. S., Fusella A., Lupetti P., Berger E. G., Geerts W. J., Koster A. J., Burger K. N., Luini A. 2001. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell. Biol.* 155 : 1225—1238.
- Miroux B., Walker J. E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260 : 289—298.
- Mogelsvang S., Gomez-Ospina N., Soderholm J., Glick B. S., Staehelin L. A. 2003. Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 2277—2291.
- Preuss D., Mulholland J., Franzusoff A., Segev N., Botstein D. 1992. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Mol. Biol. Cell.* 3 : 789—803.
- Rambourg A., Clermont Y., Képès F. 1993. Modulation of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae* sec7 mutants as seen by three-dimensional electron microscopy. *Anat. Rec.* 237 : 441—452.
- Rambourg A., Jackson C. L., Clermont Y. 2001. Three dimensional configuration of the secretory pathway and segregation of sec-

retion granules in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 114 : 2231—2239.

Seleznev K., Issi I., Dolgikh V., Belostotskaya G., Antonova O., Sokolova J. 1995. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by cen-

trifugation in percoll density gradient for biochemical research. *J. Euk. Microbiol.* 42 : 288—292.

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 : 426—461.

Поступила 7 IX 2009

ANALYSIS OF EXPRESSION OF VESICULAR TRANSPORT GENES IN AVESICULAR CELLS OF THE MICROSPORIDIUM *PARANOSEMA* (ANTONOSPORA) LOCUSTAE

V. V. Dolgikh,¹ I. V. Senderskiy,¹ O. A. Pavlova,¹ G. V. Beznoussenko²

¹ All-Russian Institute for Plant Protection, St. Petersburg—Pushkin, Russia, and ² Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Santa Maria Imbaro (Chieti), Italy; e-mail: dollslav@yahoo.com

Long adaptation of microsporidia, a large group fungi-related protozoa, to intracellular lifestyle has resulted in a drastic minimization of parasite cell. Ultrastructural analysis has shown that the Golgi complex of the microsporidia *Paranosema* (*Antonospora*) *grylli* and *P. locustae* appears as branching or varicose networks of thin tubules. These tubular networks are connected to endoplasmic reticulum, plasma membrane and forming polar tube but have no vesicles. Vesicles were not found even if ultra-fast cryofixation and membrane fusion/uncoating inhibition were used. However, a limited number of genes involved in vesicular transport were found in microsporidia genomes. In this study we used RT-PCR to analyze the content of mRNA transcripts encoding β and β' subunits COPI coatomer complex, Sec13 and Sec31 subunits COPII, SNARE-proteins synaptobrevin and syntaxin-like member of SFT family in *P. locustae* intracellular stages. The level of expression of studied genes was comparable with that of gene encoding alternative oxidase, enzyme involved in microsporidia core metabolism. Moreover, polyclonal antibodies raised against recombinant Sec13 subunit COPII, expressed in *Escherichia coli*, has shown accumulation of the protein in spores and stages of intracellular development as well as its association with membranes. The presence of components of vesicular transport machinery in avesicular microsporidia cells requires their functional analysis.

Key words: microsporidia, vesicular transport, gene expression.