

УДК 576.893.577

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ, СТРУКТУРЫ  
И ЛОКАЛИЗАЦИИ СУБТИЛИЗИН-ПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ  
МИКРОСПОРИДИИ *PARANOSEMA LOCUSTAE***

© С. А. Тимофеев,\* И. В. Сендерский, О. А. Павлова, В. В. Долгих

Всероссийский институт защиты растений РАСХН  
шоссе Подбельского, 3, С.-Петербург, Пушкин, 196608

\*E-mail: ts-bio@yandex.ru

Поступила 23.09.2014

В работе представлены результаты анализа особенностей экспрессии, локализации и структуры субтилизин подобной протеиназы микроспоридии *Paranosema locustae* — паразита перелетной саранчи и ряда других видов прямокрылых. Гетерологичная экспрессия фермента микроспоридий в бактериях *E. coli* позволила получить антитела к рекомбинантному белку и приступить к его изучению. Несмотря на присутствие в составе фермента N-концевого сигнального пептида, потенциально способного обеспечить его секрецию в цитоплазму зараженной клетки хозяина, иммуноблоттинг с полученными антителами показал специфичное накопление протеиназы в нерастворимой фракции гомогената спор. При этом фермент отсутствовал в стадиях внутриклеточного развития паразита и в цитоплазме зараженных клеток хозяина. Накопление мРНК, кодирующей изучаемый белок, в спорах микроспоридий было подтверждено с помощью ОТ-ПЦР. Гетерологичная экспрессия протеазы в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* показала аналогичный результат. Фермент *P. locustae* не секретировался в культуральную среду и отсутствовал в цитоплазме дрожжевых клеток, накапливаясь в нерастворимой (мембранной) фракции гомогената. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что субтилизин-подобная протеиназа *P. locustae*, скорее, играет важную роль в физиологии спор, чем в паразито-хозяйинных отношениях при внутриклеточном развитии.

*Ключевые слова:* *Paranosema locustae*, микроспоридии, паразито-хозяйинные отношения, секреция белков, протеиназы.

Микроспоридии — группа родственных грибам облигатных внутриклеточных эукариотических паразитов, освоивших чрезвычайно широкий круг хозяев, от протистов до млекопитающих. В отличие от представителей других таксонов внутриклеточных паразитов, таких как Kinetoplastida или Apicomplexa, микроспоридии в подавляющем большинстве случаев развиваются непосредственно в цитоплазме зараженной клетки, не образуя паразитофорную вакуоль (Исси, 1986). Такой тесный контакт с хозяи-

ном подразумевает сложный и разнообразный характер паразито-хозяйинных отношений. Среди способов воздействия внутриклеточных паразитов на зараженную клетку важную роль может играть секреция белковых молекул паразита, способных вмешиваться в регуляторные пути и сигнальные каскады хозяина. У представителей Apicomplexa и Kinetoplastida подобные белковые факторы патогенности являются предметом активного изучения в последние десятилетия (Swan et al., 2001; Nandan et al., 2002; Ravindran, Boothroyd, 2008).

Компьютерный анализ генома микроспоридии *Paranosema locustae* — паразита саранчи *Locusta migratoria* позволил выявить целый ряд гипотетических секреторных белков, потенциально способных участвовать в патогенном воздействии на организм насекомого-хозяина, поскольку они обладают на N-конце сигнальным пептидом (СП), обуславливающим поступление в секреторный путь (Долгих и др., 2010а). Гетерологичная экспрессия и иммулокализация некоторых из этих белков показала, что многие из них действительно секретируются микроспоридией в клетку хозяина. В частности, с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии мы продемонстрировали секрецию паразитом гексокиназы и накопление ее в ядрах зараженных клеток жирового тела саранчи (Senderskiy et al., 2014).

Оказалось весьма интересным, что среди последовательностей *P. locustae*, кодирующих различные формы протеиназ, нами не было выявлено ни одной, обладающей СП. Так как протеолитические ферменты часто секретируются представителями одноклеточных и многоклеточных паразитов (Bossard et al., 2013), следовало ожидать наличие протеиназ и в составе секрета микроспоридии. Одной из групп протеиназ, играющих важную роль во взаимодействии с хозяином у многих таксонов паразитов, являются субтилизин-подобные протеиназы (SLP). У энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota) секреция SLP необходима для разрушения кутикулярных покровов насекомого-хозяина (Small, Bidochka, 2005). Возбудитель малярии *Plasmodium falciparum* (Apicomplexa) секретирует SLP в паразитофорную вакуоль, где данный фермент участвует в процессе выхода мерозоитов из клеток печени и эритроцитов, а также в расщеплении поверхностных белков самого плазмодия, необходимых для приобретения паразитом способности поражать другие клетки хозяина (Agarwal et al., 2012; Tawk et al., 2013).

Анализ 5'-фланкирующей области гена субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae* (ORF 939) выявил в той же рамке считывания еще два стартовых кодона, кодирующих остатки аминокислоты метионина, что позволило предположить, что фермент микроспоридии может в действительности иметь удлиненный N-конец по сравнению с формой, выявленной при расшифровке генома паразита (рис. 1, б). Поскольку компьютерный анализ достоверно выявил наличие СП у обеих форм SLP с дополнительной аминокислотной последовательностью, данный белок оказался еще одним кандидатом на роль секретруемого фактора *P. locustae*, участвующего в воздействии на клетку хозяина. Это обусловило интерес к его дальнейшему экспериментальному изучению.

ПЦР-амплификация, клонирование и гетерологичная экспрессия гена, кодирующего изучаемый фермент в бактериях *E. coli* позволили зарабо-

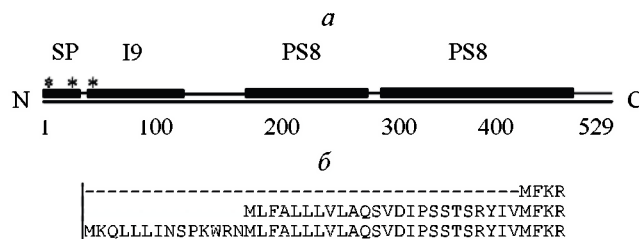


Рис. 1. Анализ структуры субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae*.

*a* — доменная организация SLP, определенная с помощью серверов Pfam и SignalP. SP — сигнальный пептид (1—26 аминокислотный остаток); I9 — продомен «inhibitor I9» (35—112 аминокислотный остаток); PS8 — участки каталитического домена «peptidase S8» (173—278 и 292—489 аминокислотный остаток). *b* — анализ 5'-фланкирующей области гена SLP. В пределах одной открытой рамки считывания обнаружено еще два метионинных остатка.

Fig. 1. Analysis of the structure of *P. locustae* subtilisin-like protease.

тать рекомбинантный белок и получить к нему специфичные антитела. Иммуноблоттинг с антителами к рекомбинантному белку показал специфичное накопление протеиназы в нерастворимой фракции гомогената спор. При этом фермент отсутствовал как в стадиях внутриклеточного развития паразита (меронтах и споронтах), так и в цитоплазме зараженных клеток хозяина. Накопление мРНК, кодирующей изучаемый белок, в спорах микроспоридий было подтверждено с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Гетерологичная экспрессия «удлиненной» протеазы в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* показала аналогичный результат. Фермент *P. locustae* не секретировался в культуральную среду и отсутствовал в цитоплазме дрожжевых клеток, накапливаясь в нерастворимой (мембранной) фракции гомогената.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### Компьютерный анализ последовательностей

Последовательность изучаемого гена микроспоридии *P. locustae* находится в свободном доступе на сайте <http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01> проекта по расшифровке генома этого вида (*Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272). Последовательность аналога SLP у *N. bombycis* находится на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Анализ проводили с помощью пакета программ для молекулярной биологии DNASTAR(r) Laser-gene 5.05.

Доменную структуру белка определяли с помощью Pfam (<http://pfam.janelia.org/>). Наличие сигнальной последовательности проверяли с помощью серверов SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), PrediSi (<http://www.predi-si.de/index.html>). Наличие трансмембранных доменов проверяли с помощью сервера ТМНММ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/>).

## Поддержание культур саранчи и паразита

Культура перелетной саранчи была получена от бездиапаузного изолята *Locusta migratoria migratorioides* инсектария Московского зоопарка. Вся саранча относится к стадной форме. Поддержание культуры и заражение насекомых, препарирование зараженного жирового тела саранчи осуществляли по методике, описанной Соколовой и Лангом (Sokolova, Lange, 2002). Выделение спор и стадий внутриклеточного развития микроспоридии осуществляли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла, как было описано ранее (Seleznev et al., 1995).

## ОТ-ПЦР анализ

ОТ-ПЦР анализ транскриптома спор и стадий внутриклеточного развития *P. locustae* осуществляли по ранее описанной методике (Долгих и др., 2010б).

## Получение антител к белку SLP микроспоридии *P. locustae*

Для амплификации гена SLP использовали прямой праймер 5' CCATGGATCCATGTTCAAAAAGGCCCGAGGGCGTT 3' и обратный праймер 5' GTCAGAATTACGTATCCTCGTGAGTCTC 3'. ПЦР-амплификация копий кодирующих генов была осуществлена с помощью высокоточной *Pfu* ДНК полимеразы (Fermentas, Литва). В качестве матрицы использовали геномную ДНК паразита, выделенную по ранее описанной методике (Dolgikh et al., 2009). ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля и встраивали в вектор pRSET A (Invitrogen, США) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI с сохранением рамки считывания. Экспрессия рекомбинантного белка в бактериях *E. coli* (штамм С41), иммунизация животных, получение и очистка поликлональных антител были осуществлены по ранее описанной методике (Долгих и др., 2012).

## Экспрессия SLP в клетках *Pichia pastoris*

ПЦР амплификацию гена, кодирующего SLP с СП, осуществляли так же, как описано выше, с использованием прямого праймера 5' CCATGGATTCATGAAACAGCTCTTGTTGATAAACA 3' и обратного праймера, аналогичного использованному для бактериальной экспрессии. Встраивание амплифицированного фрагмента осуществляли по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI в векторе pPIC3.5. Вектор линеаризовали по сайту рестрикции *Sac*I и использовали для трансформации дрожжей методом электропорации с помощью установки Electroporator 2510 (Eppendorf, Германия). Клетки осаждали центрифугированием и высевали в чашки Петри на MD агарозную среду (1.34 % YNB 4 × 10<sup>-5</sup>%-ный биотин 2%-ная декстроза), после чего инкубировали в течение 3 сут при 28 °С.

Каждую колонию дрожжей инокулировали в 5 мл среды BMGY (1%-ный дрожжевой экстракт, 2%-ный пептон, 100 мМ Калий-фосфатный буфер (pH 6.0), 1.34%-ный YNB, 1%-ный глицерол) и инкубировали на шейкере при постоянном перемешивании 2 сут при температуре 28 °С. Выраженные клетки осаждали при 3000 g и переносили в 5 мл среды ВММУ (1%-ный дрожжевой экстракт, 2%-ный пептон, 100 мМ калий-фосфатный буфер (pH 6.0), 1.34%-ный YNB, 1%-ный метанол) и инкубировали на шейкере при постоянном перемешивании 3 сут при температуре 28 °С, добавляя на вторые сутки по 0.25 мкл метанола в каждую колбу. Клетки дрожжей отделяли от культуральной среды центрифугированием при 3000 g. Клетки, разведенные в 50 мМ Tris буфере, а также культуральная среда, сконцентрированная в 50 раз с помощью концентратора Microcon (Millipore, США), задерживающим белки больше 10 кДа, использовались для приготовления белковых проб для электрофореза.

Для определения локализации белка в клетках *P. pastoris* дрожжевые клетки после метанол-индуцированной экспрессии были разрушены встряхиванием с 2.5 мм стеклянными шариками (BDH, UK) в TS растворе (50 мМ Tris-Cl [pH 8.0] и 0.3 М сахараза) в течение 30 мин при 4 °С. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 270 g в течение 5 мин, после чего пробу центрифугировали на 14 000 g в течение 20 мин. Осадок отмывали в TS и ресуспендировали в объеме TS, равном объему супернатанта. Из обеих фракций готовили белковые пробы и анализировали с помощью иммуноблотинга.

#### Приготовление белковых проб и иммуноблотинг

Приготовление белковых проб различных стадий жизненного цикла паразита, клеток зараженного и незараженного жировых тел и их анализ с помощью иммуноблотинга был подробно описан ранее (Долгих и др., 2012).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Анализ последовательности, кодирующей SLP в геноме микроспоридии *P. locustae*

По данным геномного проекта, фермент состоит из 491 аминокислотного остатка (54 кДа). Анализ доменной структуры с помощью сервиса Pfam выявил в составе белка ингибиторный «inhibitor 19» домен и функциональный домен «Peptidase\_S8», определяющий активность белка, как субтилизин-подобной сериновой протеазы (рис. 1, а). Оценка наличия у белка СП с помощью серверов SignalP 4.0, TargetP и PrediSi дала отрицательный результат. Однако проведенный анализ 5'-фланкирующей области гена выявил в той же рамке считывания еще два метиониновых остатка, что позволило предположить, что фермент микроспоридий может в действительности состоять из 515 или 529 аминокислот (рис. 1, б). При этом все три используемых сервера выявляли наличие СП у данных последовательностей.

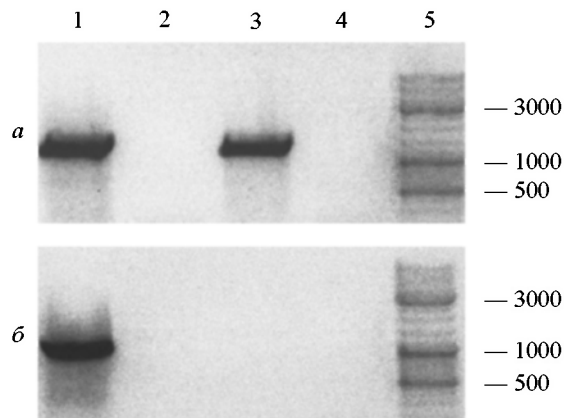


Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ генов SLP (а) и гексокиназы (б) *P. locustae*.

1 — кДНК стадий внутриклеточного развития, 2 — обратная транскриптаза не была добавлена в смесь для синтеза кДНК стадий внутриклеточного развития (контроль), 3 — кДНК спор, 4 — обратная транскриптаза не была добавлена в смесь для синтеза кДНК спор (контроль), 5 — маркеры молекулярного веса.

Fig. 2. RT-PCR analysis of SLP (a) and hexokinase (б) *P. locustae* genes.

### Сравнительный анализ транскрипции гена SLP и одного из секреторных белков *P. locustae* в спорах и стадиях внутриклеточного развития паразита

Для того чтобы определить на какой стадии жизненного цикла микроспоридии происходит транскрипция гена, кодирующего SLP, был проведен ОТ-ПЦР анализ транскриптома *P. locustae*, выделенного из спор и стадий внутриклеточного развития паразита с использованием праймеров к соответствующему гену. Аналогичный анализ также был проведен для гексокиназы *P. locustae*, которая, как было ранее продемонстрировано, секретируется микроспоридией в клетку хозяина (Senderskiy et al., 2014). Транскрипты, кодирующие гексокиназу, обнаруживались только в стадиях внутриклеточного развития *P. locustae*, отсутствуя при этом в спорах (рис. 2, б), тогда как транскрипты, кодирующие SLP, были обнаружены как в спорах, так и в стадиях внутриклеточного развития микроспоридии (рис. 2, а).

### Получение антител к изучаемому белку

Для получения антител к SLP *P. locustae* была осуществлена гетерологичная экспрессия последовательности, кодирующей SLP, без СП в бактериях *E. coli*. Ген был амплифицирован с помощью ПЦР и клонирован в векторе для бактериальной экспрессии pRSET A. Это позволило наработать рекомбинантный белок в виде нерастворимых белковых включений и разработать схему его очистки в достаточном количестве для иммунизации кроликов. После трехкратного цикла иммунизаций у кроликов была отобрана кровь, из которой была получена сыворотка, содержащая необходимые антитела.

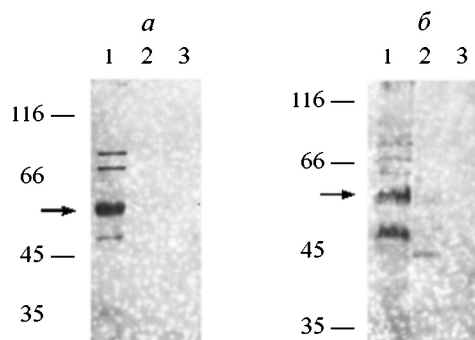


Рис. 3. Иммулокализация субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae* с помощью иммуноблоттинга.

*a* — Вестерн-блот анализ белков спор и стадий внутриклеточного развития *P. locustae* с антителами, полученными против SLP микроспоридий, показал специфичное накопление фермента (59 кДа) в нерастворимой фракции гомогената спор. Споры в растворе, содержащем 50 мМ Tris-Cl (pH8.0) и 0.3 М сахарозу, разрушали встряхиванием со стеклянными бусами, и гомогенат осветляли центрифугированием при 100 g 10 мин. Дорожка 1 — нерастворимый дебрис (осадок) после осветления гомогената; дорожка 2 — осветленный гомогенат; дорожка 3 — белки стадий внутриклеточного развития микроспоридий, выделенных в градиенте плотности Перколла. *б* — Вестерн-блот анализ белков зараженного жирового тела саранчи с антителами, полученными против SLP микроспоридии, подтвердил накопление фермента (59 кДа) в нерастворимой фракции гомогената, содержащего споры и клетки паразита. Отпрепарированное зараженное жировое тело мягко разрушали в фосфатно-солевом буфере тефлоновым пестиком, осадили паразитов при помощи низкоскоростного центрифугирования при 100 g, 10 мин (осадок нанесен на дорожку 1), дополнительно центрифугировали при 14 000 g 20 мин и осадок (дорожка 2), ресуспендированный в ФСБ до объема супернатанта (дорожка 3), анализировали с помощью иммуноблоттинга.

Fig. 3. Immunolocalization of *P. locustae* subtilisin-like protease with the use of immunoblotting.

### Локализация SLP в стадиях жизненного цикла паразита и клетках зараженного жирового тела

Для того чтобы оценить, на какой стадии жизненного цикла микроспоридии экспрессируется изучаемый белок и является ли он секретлируемым, белковые пробы, приготовленные в отдельности из спор и стадий внутриклеточного развития *P. locustae*, были проанализированы с помощью иммуноблоттинга с использованием полученных антител. Было показано, что белок, соответствующий предсказанному молекулярному весу, накапливается только во фракции нерастворимого гомогената спор, полностью отсутствуя в стадиях внутриклеточного развития микроспоридии (рис. 3, *a*). 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 (рис. 3, *б*). Таким образом, было показано, что SLP микроспоридии *P. locustae* накапливается исключительно в спорах паразита и не секретруется им в цитоплазму клетки хозяина.

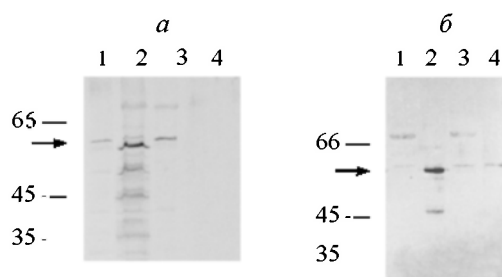


Рис. 4. Результаты гетерологичной экспрессии субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae* в дрожжах *Pichia pastoris*.

*a* — Вестерн-блот анализ результатов экспрессии SLP *P. locustae* в *P. pastoris* показал, что фермент микроспоридий (59 кДа) накапливается в дрожжевых клетках и не выделяется в культуральную среду. 1 — дрожжевые клетки до добавления метанола; 2 — клетки, экспрессирующие гетерологичный белок после добавления метанола в качестве индуктора экспрессии; 3 — дрожжевые клетки, экспрессирующие другой (контрольный) белок паразита после добавления в среду метанола; 4 — сконцентрированная в 50 раз культуральная среда после протеиназы *P. locustae*; 5 — сконцентрированная в 50 раз культуральная среда после экспрессии другого (контрольного) белка паразита. *б* — иммунолокализация SLP *P. locustae*, экспрессированной в *P. pastoris*. Дрожжевые клетки после экспрессии разрушали в присутствии 0.3М сахарозы и гомогенат, осветленный при 270 g 4 мин, центрифугировали при 14 000 g 20 мин. Иммуноблоттинг супернатанта (дорожка 1) и осадка (дорожка 2) показал осаждение фермента (59 кДа), что свидетельствует о его связи с мембранными структурами дрожжей. Дорожки 3 и 4 представляют аналогичные супернатант и осадок после разрушения и центрифугирования клеток, экспрессирующих LRR-белок семейства Б (контрольный эксперимент).

Fig. 4. Results of heterologous expression of *P. locustae* subtilisin-like protease in the yeast *Pichia pastoris*.

### Гетерологичная экспрессия SLP в клетках дрожжей *Pichia pastoris*

Для оценки возможности поступления фермента с СП в секреторный путь дрожжевых клеток последовательность гена, кодирующая полноразмерную молекулу SLP с обнаруженным нами дополнительным N-концевым участком, была встроена в вектор rPIC3.5, предназначенный для внутренней экспрессии белков в клетках *P. pastoris*. Вестерн-блот анализ дрожжевых клеток и концентрированной культуральной жидкости после гетерологичной экспрессии показал, что, как и ожидалось, протеиназа микроспоридий не секретируется *P. pastoris* во внешнюю среду, а накапливается внутри клеток (рис. 4, *a*). Разрушение дрожжевых клеток в присутствии 0.3 М сахарозы после экспрессии протеиназы и последующее центрифугирование гомогената при 14 000 g 20 мин показали, что фермент микроспоридий полностью осаждается в мембранной фракции, отсутствуя во фракции цитоплазматических белков, что свидетельствует о его вероятном поступлении в секреторный путь *P. pastoris* (рис. 4, *б*).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение на N-конце субтилизин-подобной протеиназы *P. locustae* дополнительного участка, соответствующего сигнальному секреторному пептиду, и наличие в составе белка регуляторного ингибирующего домена (рис. 1, *a, б*) позволяет предположить, что активный фермент может секре-



тироваться микроспорицией в клетку хозяина. Как показал ОТ-ПЦР анализ, транскрипционная активность SLP *P. locustae* наблюдается в спорах (рис. 2, а), что отличается от особенностей транскрипции одного из ферментов микроспорицие, секреторная природа которого была продемонстрирована ранее — гексокиназы. Транскрипция этого гена происходит только в стадиях внутриклеточного развития (рис. 2, б).

С помощью иммуноблотинга было установлено, что SLP синтезируется и накапливается только в спорах *P. locustae* (рис. 3, а, б) — наименее активной стадии жизненного цикла паразита, предназначенной для сохранения и распространения инвазионного начала. При этом SLP накапливалась только в нерастворимой фракции гомогената спор, осаждаемая вместе с оболочками и крупными компартментами даже при низкоскоростном центрифугировании (рис. 3, а). Можно было бы предположить, что SLP является мембранным белком и ассоциирована, например, с оболочкой споры, однако анализ последовательности белка не выявил в его составе трансмембранного домена. Таким образом, наиболее вероятно, что наличие у белка СП служит не для направления фермента за пределы клетки, а для его транспорта в какой-либо компартмент споры, а ингибирующий домен предназначен для сохранения фермента в неактивном состоянии до его прибытия на место назначения. Возможно также, что SLP *P. locustae* участвует в процессе экструзии спор, и протеолитическая активация фермента может происходить во время активации этого процесса. Группой китайских исследователей был всесторонне изучен гомолог SLP у другого вида микроспорицие *Nosema bombycis*. Несмотря на то что данный вид микроспорицие относится к эволюционно удаленной от *P. locustae* кладе, и гомология между аминокислотными последовательностями SLP у двух видов составляет всего 39 %, оба белка демонстрируют схожую структуру и специфично накапливаются в спорах (Dang et al., 2013). При этом в составе SLP у *N. bombyces*, как и у *P. locustae*, достоверно выявляется СП, а также ингибирующий и каталитический домены.

Еще одним фактом, подтверждающим наличие на N-конце у субтилизин-подобной протеиназы микроспорицие *P. locustae* СП, является поступление удлинённой формы фермента в секреторный путь дрожжевых клеток. Ранее мы продемонстрировали, что секреторный аппарат дрожжей способен распознавать секреторные белки микроспорицие и выделять их культуральную среду (Senderskiy et al., 2014). Как и ожидалось, в эксперименте с SLP данный белок не секретировался в культуральную среду, накапливаясь только в дрожжевых клетках (рис. 4, а). При этом мы продемонстрировали, что форма SLP *P. locustae* с СП полностью отсутствует в цитоплазматической фракции дрожжевых клеток и осаждаётся вместе с внутренними компартментами при центрифугировании (рис. 4, б).

Несмотря на то что предположение о наличии на N-конце субтилизин-подобной протеиназы микроспорицие *P. locustae* сигнального секреторного пептида подтвердилось, гетерологичная экспрессия и иммунолокализация данного белка показали отсутствие его секреции в клетку хозяина и специфическое накопление фермента в спорах паразита. Таким образом, среди многообразия секреторных белков микроспорицие до сих пор не было выявлено ни одного протеолитического фермента, секреция которых характерна для представителей других групп внутриклеточных

паразитов. Возможно, это связано со сложностью взаимоотношений микроспоридий с зараженной клеткой, которые могли быть нарушены действием неспецифических протеаз. Особенно это относится к таким видам микроспоридий, как *P. locustae*, развивающимся в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина без образования паразитофорной вакуоли, потенциально способной защитить зараженную клетку от подобного воздействия со стороны паразита.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 12-04-01517-а).

#### Список литературы

- Долгих В. В., Павлова О. А., Сендерский И. В., Пэй Г. 2010. Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Вестн. защиты растений. 1 : 48—51.
- Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Безнусенко Г. В. 2010. Анализ экспрессии генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *Paranosema (Antonospora) locustae*. Цитология. 52 (1) : 5—11.
- Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Тимофеев С. А., Наумов А. М. 2012. Использование антител к молекулярным шаперонам семейства hsp70 микроспоридий в изучении секретома внутриклеточных паразитов. Паразитология. 46 (6) : 479—492.
- Исси И. В. 1986. Микроспоридии как тип паразитических простейших. Протозоология. 10 : 6—137.
- Agarwal S., Singh M. K., Garg S., Chitnis C. E., Singh S. 2013. Ca(2+)-mediated exocytosis of subtilisin-like protease 1 : a key step in egress of *Plasmodium falciparum* merozoites. Cellular microbiology. 15 (6) : 910—921.
- Bossard G., Cuny G., Geiger A. 2013. Secreted proteases of *Trypanosoma brucei gambiense*: Possible targets for sleeping sickness control? Biofactors. 39 (4) : 407—414.
- Dang X., Pan G., Li T., Lin L., Ma Q., Geng L., He Y., Zhou Z. 2013. Characterization of a subtilisin-like protease with apical localization from microsporidian *Nosema bombycis*. Journ. of Invertebrate Pathology. 112 (2) : 166—174.
- Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Beznoussenko G. V. 2009. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells. FEMS Microbiology Letters. 293 : 285—291.
- Nandan D., Yi T., Lopez M., Lai C., Reiner N. E. 2002. Leishmania EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. Journ. of Biological Chemistry. 277 : 50 190—50 197.
- Ravindran S., Boothroyd J. C. 2008. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. Traffic. 9 : 647—656.
- 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 centrifugation in Percoll density gradient for biochemical research. Journ. of Eukaryotic Microbiology. 42 : 288—292.
- Senderskiy I. V., Timofeev S. A., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Dolgikh V. V. 2014. Secretion of *Antonospora (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.

- Small C. L. N., Bidochka M. J. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 109 : 307—313.
- Sokolova Y. Y., Lange C. E. 2002. An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). *Acta protozoologica*. 41 : 229—237.
- Swan D. G., Stern R., McKellar S., Phillips K., Oura C. A., Karagenc T. I., Stadler L., Shiels B. R. 2001. Characterisation of a cluster of genes encoding *Theileria annulata* AT hook DNA-binding proteins and evidence for localisation to the host cell nucleus. *Journ. of Cell Science*. 114 : 2747—2754.
- Tawk L., Lacroix C., Gueirard P., Kent R., Gorgette O., Thiberge S., Merceureau-Puijalon O., Menard R., Barale J. C. 2013. A key role for *Plasmodium* subtilisin-like SUB1 protease in egress of malaria parasites from host hepatocytes. *Journ. of Biological Chemistry*. 288 (46) : 33 336—33 346.

PECULIARITIES OF THE EXPRESSION, STRUCTURE,  
AND LOCALIZATION OF THE SUBTILISIN-LIKE PROTEASE  
IN THE MICROSPORIDIUM PARANOSEMA LOCUSTAE

S. A. Timofeev, I. V. Sendersky, O. A. Pavlova, V. V. Dolgikh

*Key words:* *Paranosema locustae*, microsporidia, host-parasite relations, protein secretion, proteases.

SUMMARY

Peculiarities of the expression, localization, and structure of the subtilisin-like protease from the microsporidium *Paranosema locustae*, a parasite of the migratory locust and other orthopteran species, are analyzed. Heterologous expression of the microsporidian ferment in the bacterium *Escherichia coli* allowed obtaining antibodies to the recombinant protein and to start its examination. In spite of the presence of the N-tail signal peptide in the ferment, potentially able to secret it into the cytoplasm of the infected cell, immunoblotting with obtained antibodies had demonstrated specific accumulation of the protease in the insoluble fraction of spore homogenate. At the same time, the ferment was absent in intracellular stages of the parasite and also in the cytoplasm of infested host cells. Accumulation of mRNA, coding the studied protein in microsporidian spores was confirmed with the use of RT-PCR method. Heterologous expression of the protease in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* demonstrated the same result. The ferment of *P. locustae* was not secreted into a culture medium and was absent in the cytoplasm of yeast cells, accumulating in a dissoluble (membrane) fraction of the homogenate. On the whole, the obtained data testify to the fact that the subtilisin-like protease of *P. locustae* plays an important role in the physiology of spores rather than participates in host-parasite relations during intracellular development.