

# Гены & Клетки

---

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ



**VII МОЛОДЁЖНАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ  
по молекулярной и клеточной биологии  
Института цитологии РАН**

Санкт-Петербург, 12–15 октября 2020 г.

[www.genescells.ru](http://www.genescells.ru)

---

ИНСТИТУТ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

и микроспоридиям. Скрытое разнообразие розеллид велико, получены сотни последовательностей их генов рРНК из окружающей среды, но лишь несколько видов описаны на организменном уровне. Среди них особое место занимают паразиты амёб, жизненный цикл которых проходит в основном внутри ядра хозяина. Единственная стадия, которую можно обнаружить вне клетки хозяина — споры, попадающие во внешнюю среду при разрушении клетки амёбы.

Развитие *Paramicrosporidium vannellae* KAUN-1 начинается с проникновения споры внутрь клеток хозяина. Споры попадают в клетку в процессе фагоцитоза. На это указывает наблюдение спор, находящихся вместе с другими пищевыми объектами внутри пищевых вакуолей. В некоторых вакуолях также были обнаружены пустые оболочки спор, внутрь которых заходят цитоплазматические выросты клетки хозяина. По-видимому, таким образом клетка амёбы взаимодействует с клетками паразита, но что именно происходит со спорами внутри пищевых вакуолей — пока не известно. Все последующие стадии жизненного цикла развиваются, вероятно, под оболочкой ядра амёбы (никаких внутрицитоплазматических стадий паразита нами обнаружено не было). Механизм проникновения паразита в ядро хозяина неизвестен и требует дополнительных исследований. Зараженные ядра амёб увеличены в размерах по сравнению с ядрами в незараженных клетках и приобретают нетипичную форму: у них появляются лопастевидные отростки. Зачастую в ядре хозяина наблюдали одновременное (но необязательно синхронное) развитие нескольких паразитов.

Самые ранние стадии, тонкое строение которых удалось изучить, — ранние споронты. Они локализованы в карิโอплазме, но не внутри эндосомы (в отличие от других внутриядерных розеллид), и представляют собой клетки округлой формы с одиночными ядрами. После серии ядерных делений из споронта образуется спорогональный многоядерный плазмодий. В ходе развития он увеличивается в размерах, занимая постепенно весь объем ядра хозяина. Следующая стадия — спорофорный пузырек содержит множество одноядерных споробластов, из которых формируются споры. В спорах обнаружены структуры, напоминающие элементы аппарата экстрюзии микроспоридий и мечниковеллид.

Клетки *P. vannellae* на каждой стадии жизненного цикла имеют как минимум одну митохондрию с тубулярными кристами и электронно-светлым матриксом. Предположение о наличии функциональных митохондрий у представителей рода *Paramicrosporidium* было сделано только на основании описания митохондриального генома *P. saccatoebae*. Наши данные на морфологическом уровне доказывают наличие митохондрий у этих паразитов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-74-20136 с использованием оборудования РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

Д.С. Киреева<sup>1,2</sup>, А.Н. Игнатьева<sup>1</sup>,  
С.М. Малыш<sup>1</sup>, Ю.С. Токарев<sup>1</sup>, И.В. Исси<sup>1</sup>

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКРОСПОРИДИЙ, СОБРАННЫХ В СЕРЕДИНЕ ПРОШЛОГО ВЕКА

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия

D.S. Kireeva<sup>1,2</sup>, A.N. Ignatieva<sup>1</sup>,  
S.M. Malysh<sup>1</sup>, Y.S. Tokarev<sup>1</sup>, I.V. Issy<sup>1</sup>

### MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF MICROSPORIDIA COLLECTED IN THE MIDDLE OF THE PAST CENTURY

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Leningrad State University named after A.S. Pushkin, Saint-Petersburg, Russia

stelmdarya@yandex.ru

Микроспоридии — облигатные внутриклеточные паразиты животных, наиболее широко распространённые в членистоногих, в частности у насекомых. За предыдущие десятилетия микроспоридий определяли на основе закономерностей развития, видов хозяев и морфологии спор на светооптическом уровне. Сейчас систематика микроспоридий основана на таких признаках, как размер и форма спор, число витков полярной трубки и её структура, а также особенности жизненного цикла. Но все эти методы не дают таких точных сведений о таксономической принадлежности и филогении паразитов, как молекулярно-генетический анализ, который стал использоваться повсеместно сравнительно недавно. Многие виды микроспоридий находятся в коллекциях, которые идентифицировали только светооптическими методами, поэтому для современной систематики и таксономии необходим анализ ранее описанных видов с помощью молекулярно-генетических исследований.

Материалом для исследования служили 54 образца из коллекции, собранные во второй половине XX века, которые хранились при +4 °С в разных объемах жидкости. Все пробы анализировали с помощью световой микроскопии при увеличении 400X1. В 26 образцах из 54 были обнаружены микроспоридии. Из всех вариантов экстрагировали ДНК методом СТАВ (Sambrook et al., 1989). Затем ставили ПЦП с универсальными праймерами: 18f/1047r (Weiss, Vossbrinck, 1999), и анализировали полученные результаты. Положительные образцы очищали из агарозного геля и секвенировали.

В результате мы подтвердили, что молекулярно-генетический анализ является более чувствительным методом, чем светооптический, так как с помощью световой микроскопии из 54 проб было выявлено 26 положительных, а с помощью ПЦП положительными оказались 30 проб. Около половины образцов (30) сохранились в достаточной степени для молекулярно-генетических исследований при хранении свыше 50 лет. Нами получено 8 целевых сиквенсов. Например, у микроспоридии из дубового походного шелкопряда *Thaumetopoea processionea* из Закарпатья обнаружен уникальный молекулярный гаплотип, имеющий сходство на 80% с микроспоридией рода *Mockfordia* из представителей отряда *Psocoptera*. Все выявленные изоляты принадлежат

IV кладе Древа жизни микроспоридий, но разным филогенетическим ветвям.

Ожидается, что при дальнейшем анализе коллекции будут выявлены новые формы и расширены представления о генетическом разнообразии, распространении и филогенетических связях микроспоридий насекомых фауны СССР.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБНУ ВИЗР 0665-2019-0018.

**М.Д. Лаврова<sup>1,2</sup>, А.А. Агапов<sup>1</sup>, А.В. Кульбачинский<sup>1</sup>**  
**ВЛИЯНИЕ GRE-ПОДОБНЫХ**  
**БЕЛКОВ СТРЕССОУСТОЙЧИВОЙ**  
**БАКТЕРИИ DEINOCOCCUS GOBIESENSIS**  
**НА ТРАНСКРИПЦИЮ**

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

**M.D. Lavrova<sup>1,2</sup>, A.A. Agapov<sup>1</sup>, A.V. Kulbachinskiy<sup>1,3</sup>**  
**AFFECT OF GRE-LIKE PROTEINS FROM STRESS**  
**RESISTANT BACTERIUM DEINOCOCCUS**  
**GOBIESENSIS ON TRANSCRIPTION**

<sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics Russian Academy of Science, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia

lavrova.maria.dm@gmail.com

Бактерия *Deinococcus gobiensis* выдерживает до 15000 Гр  $\gamma$ -излучения, что делает ее одной из самых радиостойчивых бактерий, известных на данный момент. Механизмы, отвечающие за выживание в стрессовых условиях, продолжают активно исследоваться. Однако уже сейчас понятно, что чрезвычайная стрессоустойчивость бактерий *Deinococcus* — это результат комбинации множества факторов. Своевременное включение адаптационных механизмов в ответ на стрессовое воздействие требует сложной регуляции транскрипции. Согласно данным, полученным при исследовании бактерий *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris*, в этот процесс могут быть вовлечены Gre-подобные транскрипционные факторы, связывающиеся во вторичном канале РНК-полимеразы (РНКП) и не образующие прямых контактов с ДНК. В этой работе мы анализировали *in vitro* два белка *D. gobiensis* из группы Gre-подобных белков: GreA и Gfh1.

Мы выделили РНК-полимеразу из клеток *D. gobiensis*, а также белки GreA и Gfh1 *D. gobiensis*, экспрессированные в клетках *E. coli*. Затем мы исследовали эффекты Gre-подобных белков на различные стадии транскрипционного цикла в *in vitro* системах транскрипции. Мы показали, что оба Gre-подобных фактора проявляют транскрипционные свойства, аналогичные своим гомологам в других бактериях рода *Deinococcus*. GreA активирует эндонуклеазное расщепление и усиливает остановку РНКП в участках ДНК, содержащих поврежденные нуклеотиды. Gfh1 ингибирует синтез РНК уже на стадии инициации транскрипции, а также усиливает терминацию транскрипции. Результаты этой работы свидетельствуют об универсальности механизма регуляции работы РНКП Gre-подобными белками у бактерий рода *Deinococcus* и дают дополнительные основания

предполагать роль этих транскрипционных факторов в стрессоустойчивости.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 17-14-01393.

**К.Н. Лотонин<sup>1</sup>, И.А. Удалов<sup>2</sup>**  
**СООТНОШЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО**  
**И «МОЛЕКУЛЯРНОГО» ВИДА АМЁБ**  
**СЕМЕЙСТВА PARAMOEVIDAE**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

**K.N. Lotonin<sup>1</sup>, I.A. Udalov<sup>2</sup>**  
**A CORRESPONDENCE OF MORPHOLOGICAL**  
**AND “MOLECULAR” SPECIES OF AMOEBAE**  
**OF THE FAMILY PARAMOEVIDAE**

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Zoological institute RAS, Saint-Petersburg, Russia

chlamydophrys@gmail.com

Подавляющее большинство видов голых лобозных амёб считаются агамными организмами, поэтому к ним не применим репродуктивный критерий для различения видов. В течение очень долгого времени единственной концепцией вида, используемой специалистами по этой группе, была морфологическая. Проблема видовой идентификации многих видов этих протистов заключается в очень малом количестве чётких морфологических признаков, позволяющих их различать. С возникновением молекулярно-филогенетических методов появилась возможность использовать последовательности нуклеотидных маркеров в случаях, когда границы между морфологическими видами размыты. Однако нередко исследователи сталкиваются с несоответствием морфологических видов с выявленными «молекулярными». На уровне молекулярных маркеров различие между отдельными морфологическими видами оказываются менее существенным, чем между некоторыми штаммами других морфологических видов.

Одно из возможных решений этой проблемы — исследование изменчивости молекулярных маркеров у голых лобозных амёб, имеющих чёткие межвидовые морфологические различия. Таковыми являются амёбы, имеющие сложноорганизованные видоспецифичные чешуйки в составе клеточных покровов. Выявив размах различий по молекулярному маркеру между такими чётко очерченными морфологическими видами, мы в дальнейшем сможем экстраполировать эти данные на другие, более проблематичные группы этих протистов.

В качестве молекулярного маркера нами был выбран ген COX1, являющийся наиболее чувствительным и легко амплифицируемым ДНК-штрихкодом у голых лобозных амёб. Нами были исследованы представители двух родов семейства Paramoebidae: *Korotnevella*, обладающий видоспецифичными чешуйками, и близкий к нему род *Pseudoparamoeba*, виды которого слабо различаются на морфологическом уровне. Филогенетический анализ на основе этого маркера у 12 морфологических видов *Korotnevella* показал чёткое соответствие между морфологией чешуек и молекулярными данными. Уровень различия по этому маркеру