

АППАРАТ ГОЛЬДЖИ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ПРОСТЕЙШИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

© Ю. Я. Соколова, Е. С. Снигиревская, Я. Ю. Комиссарчик

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург:
электронный адрес: yukomis@mail.cytspb.rssi.ru

В обзоре обобщены и проанализированы современные данные по аппарату Гольджи паразитических простейших, которые существенно дополняют и уточняют представления о его структуре и функции, сложившиеся на основании анализа клеток млекопитающих и дрожжей. В ряде исследований показано, что паразитический образ жизни определяет структурные и функциональные особенности систем секреторного транспорта в таких неродственных группах простейших, как Parabasalia (*Trichomonas*), Diplomonada (*Giardia*) и Entamoebidae (*Entamoeba*), паразитических Alveolata типа Apicomplexa (*Toxoplasma* и *Plasmodium*) и Kinetoplastida (*Trypanosoma* и *Leishmania*), в сравнении с секреторным транспортом в модельных системах — культуральных клетках млекопитающих и дрожжей. Рассмотрены структурные вариации аппарата Гольджи (АГ) в клетках эукариот различного уровня организации. В трех из шести супертаксонов, выделяемых новой классификацией протистов (Adl et al., 2005), существует как минимум восемь групп, целиком составленных из видов, в которых АГ не выявляется в виде классической стопки цистерн. Однако молекулярно-генетические и(или) биохимические доказательства говорят в пользу того, что органелла с функциями АГ имела во всех изученных группах. Вторичная утрата оформленного АГ, доказательством которой служит выявление генов белков, участвующих в транспорте между компартаментами Гольджи в таксонах, лишенных морфологически выраженных диктиосом, происходила, вероятно, несколько раз в ходе эволюции эукариот. Показано, что ни признак наличия/отсутствия диктиосом, ни число диктиосом в АГ не связаны с интенсивностью секреции или с расположением группы на филогенетическом древе.

Ключевые слова: аппарат Гольджи, внутриклеточный транспорт, ультраструктура клетки, паразитические простейшие, эволюция эндомембранных систем эукариот.

Принятые сокращения: АГ — аппарат Гольджи, ЭР — эндоплазматический ретикулум, ПМ — плазматическая мембрана, ЯМ — ядерная мембрана, БФА — брэфельдин А, ПФ — паразитофорная вакуоль, МПВ — мембрана паразитофорной вакуоли, ТВС — тубуловезикулярная сеть, ARF — фактор рибозилирования АДФ, СОР1 или СОР11 — белки окаймления I или II типа, AP — адапторные белки.

Секреция макромолекул — одна из важнейших функций как прокариотической, так и эукариотической клетки. Поддержание постоянного состава плазматической мембраны (ПМ), формирование защитных клеточных оболочек, модификация окружающей среды, взаимодействие с другими клетками — вот неполный перечень функций секреторного аппарата клетки. Способы выведения белков и полисахаридов из клеток в среду в ходе эволюции претерпели существенные изменения. У прокариот секреция белков происходит либо непосредственно через ПМ — пути транслокации, сходные с выявленными в клетках млекопитающих путями переноса протеинов из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум (ЭР), либо с помощью переносчиков (sec system) (Schekman, 1994). Основным способом выделения белков и полисахаридов из клеток эукариот является экзоцитоз. В клетках эукариот в процессе эволюции сформировался сложный секреторный путь, состоящий из серии мембранных компарментов, содержащих различные наборы белков — ЭР, аппарат Гольджи (АГ), лизосомы, многочисленные вакуоли, везикулы, тубулы, формирующие

промежуточные компартменты и участвующие во внутриклеточном транспорте.

В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении особенностей внутриклеточного транспорта в клетках эукариот: идентифицированы гены белков и липидов, принимающих участия в транспорте; достаточно хорошо изучены реакции, происходящие в отдельных компартаментах Гольджи; описаны их структурные компоненты: созданы простые экспериментальные системы, позволяющие синхронизировать секрецию и манипулировать процессами сборки и разборки органеллы. Однако единой более или менее непротиворечивой концепции внутриклеточного транспорта пока не существует. Напротив, поражает обилие гипотез, касающихся его организации. Смена господствующих парадигм происходит чуть ли не ежегодно, в рамках 3—4 основных моделей транспорта: везикулярной, матурационной, везикуло-матурационной (синтетической) и наиболее «свежей» — модели мембранных континуумов. Одновременно существует как минимум 20 вариаций различных моделей (Mironov et al., 2005; см. обзор: Снигирев-

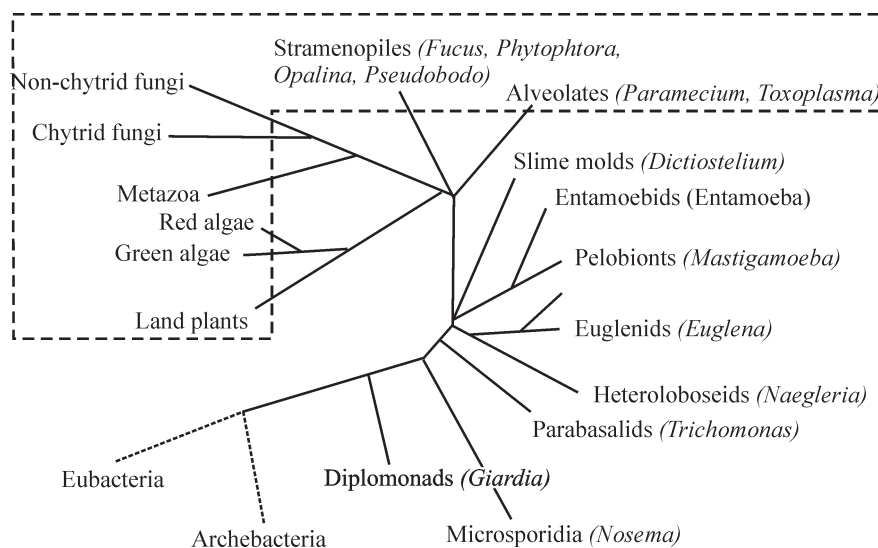


Рис. 1. Схема, отражающая представление об эволюции эукариот (Sogin, 1991).

Крупным шрифтом выделены названия таксонов различного ранга, используемые в англоязычной литературе; в скобках более мелким шрифтом — наиболее известные роды. Штриховой рамкой выделена «крона» филогенетического дерева.

ская и др., 2006). Все существующие гипотезы ограничены, т. е. описывают группы фактов, чаще всего полученных в данной группе и данными методами. Зачастую они оказываются неспособными объяснить результаты исследований, полученных другими методами на других объектах. Одной из причин неопределенности, так долго царящей в одной из центральных и активно разрабатываемых областях клеточной биологии, является тот факт, что процессы внутриклеточного транспорта связаны со структурами, размеры которых лежат на грани разрешающей способности большинства используемых методов структурного анализа. Однако следует указать, что такие современные методы, как коррелятивная микроскопия, иммуномечение на замороженных срезах, компьютерная томография, 3D-реконструкция, методы трансфекции и экспрессии меченых белков, а главным образом сочетание названных методических подходов позволяют значительно отодвинуть эту грань.

Основные успехи в изучении АГ достигнуты с помощью удачных экспериментальных моделей — клеток дрожжей и млекопитающих в культуре. На дрожжах выполнены основные биохимические, молекулярно-биологические и генетические исследования. Клетки культур удобны тем, что они распластаются по поверхности подложки и создают монослой, удобный для физиологических экспериментов и микроскопического анализа (Boulan, Sabatini, 1978; Mostov et al., 2000). Однако эти трансформированные клетки чаще всего функционально неполноценны, с измененным типом секреторного транспорта. Поэтому неудивительно, что результаты, полученные на функционально активных секреторирующих клетках или выделенных из них мембран и на клетках в культуре, часто не вполне согласуются друг с другом.

Одним из плодотворных подходов к изучению секреторного пути может быть использование одноклеточных организмов (протистов) — готовых экспериментальных систем, предоставляемых природой (Plattner, 1993; Sokolova et al., 2001; Joiner, Roos, 2002; Lujan, Touz, 2003; Cooke et al., 2004; Overath, Engstler, 2004). Практически каждая группа протистов обладает особым типом секрета и характерной организацией секреторного транспор-

та, в процессе эволюции идеально подогнанными под функциональные задачи — будь то секреция оболочки цисты лямблии, элементов клеточной стенки, «чешуек» одноклеточных зеленых водорослей, экструсом инфузорий или поверхностных гликопротеидов трипаносом.

В основном две причины обусловили интенсивное изучение облигатных паразитических простейших с помощью современного арсенала генетических, молекулярных и структурных методов. Во-первых, изучение клеточной биологии патогенных для человека и домашних животных видов связано с поиском мишеней для лекарственных препаратов и поэтому хорошо субсидируется. Во-вторых, паразитические простейшие оказались удобными объектами для экспериментального изучения внутриклеточного транспорта. С одной стороны, приспособление к облигатному паразитизму привело к редукции части ферментных систем и структурных элементов секреторного пути, а с другой — у большинства паразитических простейших наблюдается гипертрофированная секреция жизненно важных для паразита белков или гликопротеинов, которые используются как функциональные маркеры секреторной активности. И наконец, мелкие размеры облегчают морфологический анализ, в частности трехмерную реконструкцию секреторного аппарата. В публикациях последних лет убедительно продемонстрировано, что изучение секреторного транспорта у паразитических простейших существенно дополняет и уточняет представления о структуре и функции АГ, сложившиеся на основании анализа клеток других эукариот — млекопитающих и дрожжей.

Кроме того, анализ секреторных систем протистов, представляющих собой наиболее примитивных представителей эукариот, имеет важное значение для понимания одного из наиболее интригующих вопросов современной клеточной биологии: как и когда возникли сложные клеточные системы, отличающие эукариотическую клетку от клетки бактерий, такие как цитоскелет, митохондрии, эндомембранные структуры и связанная с ними система внутриклеточного транспорта?

Цель настоящего обзора — обобщить и проанализировать имеющиеся данные по АГ паразитических про-

стейших.¹ Основной задачей было продемонстрировать, как паразитический образ жизни определяет структурные и функциональные особенности систем секреторного транспорта в таких неродственных (рис. 1, 6) группах простейших, как Parabasalia (*Trichomonas*), Diplomonada (*Giardia*) и Entamoebidae (*Entamoeba*), паразитических Alveolata типа Apicomplexa (*Toxoplasma* и *Plasmodium*), а также Kinetoplastida (*Trypanosoma* и *Leishmania*), по сравнению с секреторным транспортом в модельных системах — культуральных клетках млекопитающих и дрожжей.

Секреторный транспорт в клетках дрожжей и млекопитающих, используемых как модельные системы для изучения секреторного транспорта у эукариот

Основные положения современной концепции секреторного транспорта были разработаны на основании изучения клеток млекопитающих, поддающихся культивированию и трансфекции, и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, на которых получено большое количество мутантов, характеризующихся нарушением или блокировкой отдельных ступеней секреторного пути.

На основании иммунолокализации резидентных белков в стопке АГ выделяют три основных субкомпартамента (цис, медиал и транс) и два промежуточных — ЭР-Гольджи промежуточный компартмент (ERGIC) и транс-Гольджи промежуточный компартмент (TGN). У дрожжей АГ организован не в виде стопок уплощенных цистерн, как у млекопитающих и растений, а в виде тубулярных компонентов, распределенных по всей цитоплазме. Поэтому число субкомпартамента в клетке дрожжей невозможно проанализировать иммуноцитохимическими методами и имеющаяся информация базируется на экспериментах с мутантами.

Секретируемые в цитоплазме протеины транслоцируются в шероховатый ЭР с помощью сигнального пептида, который связывается с сигнальной частицей распознавания (signal recognition particle) и рибосомой (см. обзор: Simon, 1993). В просвете ЭР специфичная эндопроптеаза убирает сигнальный пептид, после чего транспортируемый протеин формирует вторичную структуру, организует бисульфидные мостики и в ряде случаев подвергается N-гликозилированию (Gaut, Hendershot, 1993). Белок (cargo) покидает ЭР в везикулах, тубулах или иных мембранных переносчиках и переходит в АГ, где происходит его дальнейшая модификация, включающая в себя O-гликозилирование, дальнейший процессинг N-гликозилированных участков, фосфорилирование, сульфатирование, разрезание и сортировку. Выход из ЭР происходит или конститутивно, или же уже на этом участке имеет место целенаправленная сортировка с помощью информации, заложенной в транспортируемом белке (Rambourg et al., 1987).

Три взаимосвязанных ключевых процесса лежат в основе внутриклеточного транспорта и находятся в центре внимания исследователей: 1) формирование транспортных элементов — везикул и тубуловезикул, ограниченных мембраной, несущей окаймление в виде комплекса коаномерных протеинов COPI и COPII, клатрина и др.; 2) слияние транспортных элементов между собой и с мембраной мишени; 3) узнавание мишени направленного транспорта. Механизмы этих процессов разгаданы далеко не полностью, несмотря на то что их описанию посвящено большое количество публикаций (Kahn et al., 1991; Sollner et al., 1993; Allan, 1995; Beh, Rose, 1995; Cole, Lippincott-Schwartz, 1995; Conibear, Stevens, 1995; Horazdovsky et al., 1995; Pelham, 1995; Salama, Shekman, 1995; Becker, Melkonian, 1996; Farquhar, Palade, 1998; Klumperman, 2000; Lippincott-Schwartz, Zaal, 2000; Van Vilet et al., 2003). Результаты этих работ обобщены в нашем предыдущем обзоре (Снигиревская и др., 2006).

Итак, белки (cargo) после интернализации в ЭР проходят через мембранные системы ЭР и АГ и в конце концов достигают конечной цели — плазматической мембраны, лизосомы или иного компартмента. Возвращение резидентных белков в исходный компартмент осуществляется, скорее всего, в везикулах, окаймленных COPI, или тубуловезикулах. В основе механизма, позволяющего быстро трансформироваться (формировать почки, изгибы, утолщения и пр.), лежит, по-видимому, свойство текучести липидного бислоя, в котором путем концентрации белковых компонентов в ответ на адекватные стимулы локально создаются структурно обособленные участки, рафты, характеризующиеся определенной толщиной и химическим составом. Вероятно, именно они и определяют наиболее выгодную структурную трансформацию мембранного компартмента (Снигиревская и др., 2006).

На основании сходства механизмов внутриклеточного секреторного транспорта в клетках дрожжей и млекопитающих был сделан вывод о консервативности большинства компонентов транспортных систем, так как они присутствуют «from yeasts to men» (Rothblatt et al., 1994; Horazdovsky et al., 1995). Однако такое сходство неудивительно, так как млекопитающие и грибы относятся к «кроне» филогенетического древа эукариот и представляют собой сестринские группы (рис. 1), которые в последних классификациях эукариот объединены в один супертаксон Opisthocoonta (Adl et al., 2005).

Существующие гипотезы эволюции эндомембранных систем

Появление эукариотической клетки рассматривается как наиболее радикальный и загадочный апоморфоз за всю историю жизни на земле, насчитывающую более 3.5 млрд лет, несмотря на то что в последнее десятилетие генетическими методами была выявлена значительная гомология ряда ключевых белков у представителей супертаксонов Bacteria, Archea и Eukarya (Dacks, Doolittle, 2001). В литературе предлагается несколько возможных сценариев происхождения и ранней эволюции эукариотической клетки (Woese, Fox, 1977; De Duve, 1990; Cavalier-Smith, 1991, 2002; Patterson, 1994; Cavalier-Smith, Chao, 1996; Fedorov, Hartman, 2004). Все они признают общность происхождения прокариотической и эукарио-

¹ Учитывая ревизии макросистематики эукариот последних лет, связанные с прогрессом молекулярной таксономии (Stechmann, Cavalier-Smith, 2003; Adl et al., 2005; Arisue et al., 2005), под простейшими мы подразумеваем одноклеточных эукариот, традиционно рассматриваемых как Protozoa (Levine et al., 1980), за исключением микроспоридий (Microsporidia). Родство последних с грибами (Fungi) сейчас не вызывает сомнений, так же как и глубинные различия между униконтами, включающими в себя животных и грибы, и биконтами, к которым относятся растения и большинство групп простейших (Richards, Cavalier-Smith, 2005).

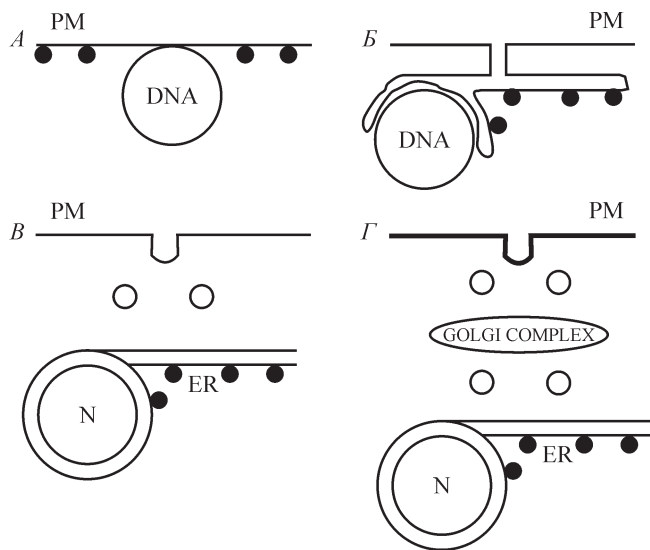


Рис. 2. Гипотетическая схема этапов эволюции эндомембранных систем (по: Becker, Melkonian, 1996).

А — плазматическая мембрана (PM) прокариот состоит из фосфолипидов, кольцевая хромосома прикреплена к ней. *Б* — участок PM, примыкающий к хромосоме, погружается в цитоплазму, окружая ядро (N) и формируя эндоплазматический ретикулум (ER). *В* — происходит разобщение между PM и ER: рециклирование белковых компонентов осуществляется в везикулах, возможно с клатриновым окаймлением; PM состоит из фосфолипидов и незначительного количества стеролов и гликолипидов. *Г* — дополнительная система мембран встраивается между ER и PM; PM состоит из фосфолипидов и значительного количества стеролов и гликолипидов.

тической клеток, основываясь на наличии фундаментального сходства их морфологии и физиологии. Однако между про- и эукариотической клетками имеются серьезные различия, выражающиеся, в частности, в разной организации клеточных мембран. Согласно одной из гипотез, эукариоты произошли от группы эубактерий (актинобактерий), способных производить стеролы. Наиболее существенное значение в эволюции предковой клетки имела предполагаемая трансформация клеточной стенки бактерий. В результате замещения эубактериального пептидогликана муреина N-связанным гликопротеином сформировалась гибкая поверхностная оболочка, которая сделала возможным возникновение фагоцитоза. Именно способность к фаготрофии, вероятно, и определила всю дальнейшую эволюцию клетки эукариот: формирование эукариотического ядра, развитие эндомембранной системы, цитоскелета, появление митохондрий, предшественниками которых, возможно, были симбиотические бактерии (Cavalier-Smith, 2002; Hartman, Fedorov, 2002).

У прокариот кольцевая хромосома крепится к плазмалемме и синтез мембранных белков и липидов связан исключительно с плазматической мембраной (ПМ). В клетке эукариот ПМ выполняет иные функции, а рибосомы и процессы синтеза ассоциированы с мембранами ЭР и ядерной оболочки как части ЭР. ПМ и мембрана ЭР эукариотной клетки имеют различный белковый и липидный состав: плазмалемма обогащена стеролами и гликолипидами, в то время как мембрана ЭР, как и ПМ эубактерий, состоит в основном из фосфолипидов (Van Meer, 1989). Наряду с тем что эти различия связаны с функциональными адаптациями клеток, они также могут отражать процессы эволюции системы внутриклеточных

точных мембран (эндомембран), приведшие к возникновению АГ.

Рассмотрим сценарий возникновения такой системы (рис. 2), предложенный Бэкером и Мелконяном (Becker, Melkonian, 1996). Эти авторы предлагают двуступенчатую модель эволюции эндомембранных систем. По их мнению, произошло разделение двух мембранных доменов — ЯМ/ЭР и ПМ, которое потребовало развития переходной системы мембран для транспорта белков и липидов от места их синтеза к ПМ. Перенос ряда функций от ПМ эндомембранам способствовал быстрой и успешной адаптации ПМ к выполнению новых функций, в частности эндо- и экзоцитоза. Толчком к эволюции эндомембранных систем признается возникновение механизма возврата резидентных белков, осуществляемого с помощью рециклирования белковых компонентов между двумя соседними компартментами. Однако везикулярный транспорт не в состоянии обеспечить наблюдаемую во всех изученных эукариотических клетках биохимическую уникальность двух мембранных систем. Между ЭР и ПМ возникает дополнительный специализированный компартмент — АГ, одна из первичных функций которого — способствовать поддержанию различного липидного состава мембран ЭР и ПМ. Постоянный липидный состав ПМ поддерживается за счет экзоцитоза и(или) эндоцитоза (Van Meer, 1989; Bretscher, Munro, 1993; Allan, Kallen 1994). Проходя через АГ, липиды модифицируются с помощью специфических ферментов, являющихся резидентными белками мембран Гольджи. Так, показано, что соотношение между фосфатидилинозитолом и фосфатидилхолином во внешней мембране цистерн АГ регулируется с помощью белка Sec14 — цитозольного переносчика фосфатидилинозитола (Bangs et al., 1985, 1986; Ohashi et al., 1995). Кроме того, ARF стимулирует фосфолипазу D, которая гидролизует фосфатидилхолин и тоже может способствовать изменению липидного состава эндомембран (Boman, Kahn, 1995; Ktistakis et al., 1995).

Существующие модели эволюции эндомембран предполагают последовательную эволюцию транспортных переносчиков — везикул (De Duve, 1990; Cavalier-Smith, 1991) или тубулярных сетей (Beznoussenko, Mironov, 2002). Наиболее вероятно, что все типы окаймленных транспортных везикул эволюционировали от общего предка. Показано, что компонентами белковых комплексов COPI и клатрина являются бета-COP и бета-адаптин, а также гамма-COP и AP17/AP19 — гомологичные белки (Duden et al., 1991; Serafini et al., 1991; Salama, Schekman, 1995). Связывание как коатомерных белков, так и компонента клатрина AP1 опосредовано взаимодействием с ARF (Stamnes, Rothman, 1993; Traub et al., 1993). Кроме того, сигнальный мотив KKXX, ответственный за возвращение резидентных белков в ЭР, родственен тирозин-мотиву, возвращающему белки к ПМ при эндоцитозе (Itin et al., 1995; Mallabiabarrena et al., 1995). Таким образом, механизмы формирования транспортных везикул как с клатриновым окаймлением, так и одетых коатомерными белками COPI и COPII сходны — перед присоединением белков окаймления к мембране активируются ARF-подобные белки, связанные с ГТФ (Salama, Schekman, 1995). Ограниченная роль COPI в жизнеобеспечении дрожжей (Salama, Schekman, 1995), а также отсутствие у некоторых протистов структурных белков Гольджи, ответственных за формирование стопок цистерн (Seemann et al., 2002), типа джиантина и GM130

(Katinka et al., 2001) могут свидетельствовать о том, что прототипом Гольджи могла быть тубулярная сеть, одетая «прото-COP1» и «прото-COP2». В этом случае одно из направлений эволюции Гольджи могло включать в себя появление структурных белков и более интенсивное использование окаймления для сортировки карго и ферментов Гольджи (Bezoussenko, Mironov, 2002). Впрочем, столь же вероятно предположить, что в некоторых группах эукариот эволюция шла в направлении преобразования стопок уплощенных цистерн в тубулярные сети, что привело к постепенной утрате некоторых структурных белков (scaffold proteins).

Как только комплекс мембран, промежуточных между ЭР и ПМ, был сформирован, предки современных протистов в соответствии со своими экологическими потребностями сформировали, по-видимому, то разнообразие морфологических типов АГ, которое наблюдается в настоящее время.

Организация секреторного транспорта в различных систематических группах паразитических протистов

Аппарат Гольджи (АГ) и его роль у представителей типа Parabasalia (на примере *Trichomonada*). Жгутиконосцы типа Parabasalia известны главным образом как полостные паразиты насекомых и млекопитающих. Основная информация об их цитологии, биохимии и клеточной биологии получена на основании изучения двух представителей класса *Trichomonada* — *Tritrichomonas foetus* и *T. vaginalis*, паразитирующих в урогенитальном тракте крупного рогатого скота и человека. Трихомонады являются объектом пристального внимания клеточных биологов, во-первых, по причине наличия в их клетках гидрогеносом, органелл, продуцирующих энергию анаэробным способом и рассматривающихся как эволюционные предшественники митохондрий (Andersson, Kurland, 1999), и, во-вторых, как одна из наиболее древних групп протистов (Cavalier-Smith, Chao, 1996; Keeling et al., 2000). АГ трихомонад занимает значительный объем в клетке, состоит из хорошо выраженных 8—12 цистерн, расположенных вблизи ядра и дифференцированных на четырех классических субкомпартамента (цис, промежуточный, транс и сеть транс-Гольджи). Цис-цистерна соединена с парабазальным филаментом и находится в непосредственной близости от эндоплазматического ретикулума (ЭР) (Benchimol et al., 2001). АГ вместе с парабазальным филаментом образует так называемое парабазальное тело — органеллу, наличие которой определяет принадлежность жгутиконосца к Parabasalia. Основной функцией АГ является гликозилирование адгезинов — поверхностных белков, определяющих адгезию паразитов к поверхности клеток эпителия и соответственно патогенность трихомонад (Benchimol et al., 2001). С помощью трехмерной реконструкции серийных срезов и применения иммунофлуоресцентных маркеров было продемонстрировано, что в отличие от млекопитающих АГ трихомонад не распадается во время митоза и нечувствителен к действию нокадазола и других антитубулиновых агентов, хотя тубулиновые компоненты и были выявлены с помощью иммунофлуоресценции. Предполагается, что у трихомонад во взаимодействиях с АГ могут быть задействованы другие изоформы тубулина и(или) ассоциированных с тубулином

белков (Benchimol et al., 2001). Любопытно, что непосредственно перед митозом АГ растягивается, а затем каждая цистерна последовательно делится посередине на две половины. Этот процесс начинается с поверхностных (транс) цистерн и заканчивается наиболее глубокой цис-цистерной. Было показано, что комплекс Гольджи, парабазальный филамент, жгутик вместе с базальными телами, ЦОМТ и аксостиль реплицируются одновременно с ядерным геномом перед митозом, а затем в фазе закрытого митоза сегрегируются. Таким образом, у трихомонад органеллы, связанные с клеточным цитоскелетом, в том числе и АГ, дублируются вместе с цитоскелетными элементами и следуют за этими элементами, мигрируя, удлиняясь и расходясь в дочерние клетки во время митоза (Ribeiro et al., 2000). Аналогичный характер поведения АГ при митозе был продемонстрирован у зоитов *Toxoplasma gondii* (Pelletier et al., 2002).

Организация внутриклеточного секреторного транспорта в клетках *Diplomonada* на примере представителей рода *Giardia*. Дипломонад, включая представителей рода *Giardia*, относят к наиболее древней ветви эукариот (Sogin et al., 1989; Hashimoto et al., 1994, 1998). В свое время они даже рассматривались как недостающее звено (missing link) между про- и эукариотами (Kabnick, Peattie, 1991). Представители группы — лямблии *Giardia lamblia*, *G. muris* и *G. intestinalis* — широко распространенные паразиты, возбудители кишечных инфекций человека и других млекопитающих. Древность происхождения, практическое значение и относительная простота культивирования сделали лямблий модельным объектом клеточной биологии. В частности, серия блестящих в методическом отношении работ посвящена организации необычной системы внутримембранного транспорта этих протистов (в качестве обзоров см.: Lujan et al., 1995a, 1995b, 1995c; Lujan, Touz, 2003; Marti et al., 2003a, 2003b).

В жизненном цикле лямблий четко разграничены две фазы: жгутиковая форма — вегетативный трофозоит, колонизирующий верхнюю зону тонкого кишечника млекопитающих, и циста — инфекционная стадия, предназначенная для временного переживания во внешней среде и формирующаяся в результате инцистирования трофозоида. Циста окружена толстой клеточной стенкой, состоящей из полисахаридов и белков. Паразиты рода *Giardia* на стадии трофозитов обладают очень простой системой эндомембран, состоящей из ядерной оболочки, ЭР и эндосомно-лизосомного компартмента (периферических гранул, содержащих кислые фосфатазы) (Adam, 2001; Elmendorf et al., 2003). Трофозоиты жиардий не имеют митохондрий, пероксисом, секреторных гранул, а также морфологически выраженного АГ (Adam, 2001). В то же время ряд экспериментальных данных свидетельствует в пользу того, что в клетках трофозитов присутствует органелла с типичными функциями Гольджи. Показано, что меченный NBD-церамидом маркер Гольджи окрашивает перинуклеарные структуры в вегетативных и инцистирующихся трофозоидах (Lujan et al., 1995a). Были выявлены гены двух гомологов синтаксинов (семейства SNARE), связанных с везикулярным транспортом белков через АГ (Dacks, Doolittle, 2002). Вблизи ядра вегетативных и инцистирующихся трофозитов были локализованы гомолог ARF. Белок *gab1*, ответственный за точность доставки везикулы к мембране-мишени, был описан и локализован в ЭР и периферических гранулах. Было показано, что локализация ARF и

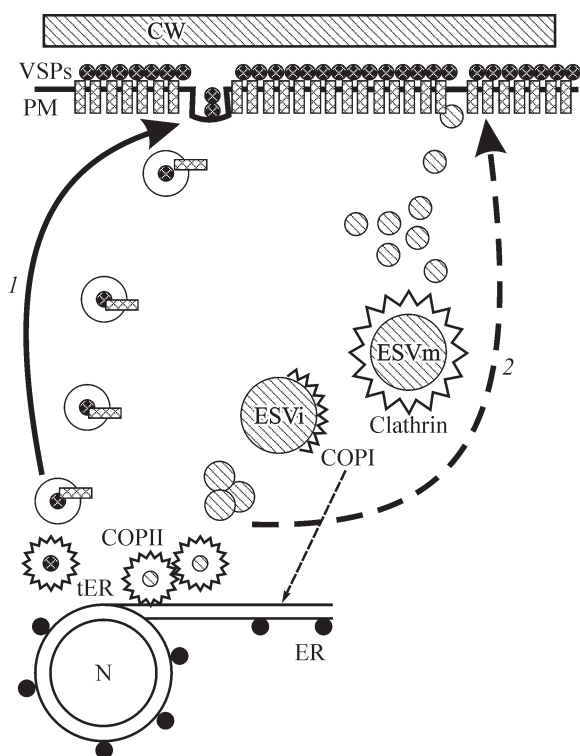


Рис. 3. Два независимых секреторных пути в трофозоитах *Giardia intestinalis* (по: Marti et al., 2003b).

1 — конститутивная секреция переменных поверхностных протеинов (VS), 2 — регулируемая секреция везикул инцистирования (ESV). COPI, COPII и clathrin — белки окаймления везикул, PM — плазматическая мембрана, tER — переходный эндоплазматический ретикулум и зона транспортных пузырьков, отшнуровывающихся от ER, CW — стенка цисты, ESV — везикула инцистирования, ESV_i — незрелая ESV, ESV_m — зрелая ESV, N — ядро, VSP — переменные поверхностные специфические протеины. Объяснения см. в тексте.

белков-коатомеров (COPI и COPII) чувствительна к брэфельдину А (БФА), который блокирует секрецию, взаимодействуя с ARF. И в вегетативных, и в инцистирующихся трофозоитах обработка БФА блокировала белковый транспорт и приводила к разборке структур, метящихся NBD-церамидом, что доказывает наличие функционирующего Гольджи даже в отсутствие характерной структуры (Lujan et al., 1995a; Lujan, Touz, 2003). Следует отметить, что в трофозоитах на поздних стадиях инцистирования возникает морфологически оформленный комплекс Гольджи, состоящий из 3—20 параллельных цистерн, и отмечается значительное возрастание активности ферментов АГ, в частности галактозил трансферазы и N-ацетилгалактозамин трансферазы (Lujan, Touz, 2003).

Переход к инцистированию включает в себя секрецию экстрацеллюлярного матрикса, основным компонентом которого являются растворимые белки оболочки цист (CWP — cyst wall proteins). В трофозоитах лямблий выявлены и охарактеризованы два независимых секреторных пути (рис. 3). Мембрано-связанные конститутивно секретируемые белки, так называемые переменные поверхностные белки (VSPs — variable surface proteins), следуют к плазматической мембране. Синтез и экспорт белков оболочки цист контролируются внутриклеточным триггерным механизмом, запускаются специфическим сигналом и включают в себя формирование дополнительного мембранного компартмента, так назы-

ваемых везикул инцистирования (ESVs — encystation specific vesicles). Оба секреторных пути функционируют параллельно в течение 15—20 ч, пока идет процесс инцистирования. Выявлены и охарактеризованы сигнальные последовательности, обеспечивающие включение белка оболочки цист в везикулы инцистирования и включение последних в клеточную стенку, так же как и мембранный домен, обеспечивающий связывание VSPs с мембранами транспортных везикулярных переносчиков (Hehl et al., 2000). С помощью современных методических подходов, таких как использование трансгенных линий жиардий, модифицированных по локусам, кодирующим сигнальные последовательности, иммулокализация коатомерных протеинов, применение температурных блоков, позволяющих синхронизировать секрецию, и др., было показано, что оба экспортируемых белка вне зависимости от типа секреции (конститутивной или регулируемой) сортируются в соответствии со своими сигнальными последовательностями и упаковываются в мембранные переносчики, одетые коатомерным белком COPII. Сортинг белков имеет место в специализированных («переходных», transitional) участках ЭР, расположенных в зоне ядерной оболочки, которые могут рассматриваться, таким образом, как переходная зона ЭР—Гольджи. Мелкие пузырьки с переменными поверхностными белками направляются непосредственно к плазматической мембране. Формирование и созревание везикул инцистирования включают в себя процесс гомотипического слияния первичных транспортных интермедиатов, содержащих карго-протеин — предшественник белка оболочки цисты, и образование более крупных компартментов, так называемых ранних везикул инцистирования. В последних происходит созревание секретируемого протеина, а также имеет место постепенная модификация мембранной оболочки компартмента, сопровождающаяся COPII-зависимым ретроградным транспортом и рециклированием сигнальных последовательностей. На конечных этапах инцистирования «зрелые везикулы инцистирования» одеваются клатриновой оболочкой и становятся восприимчивыми к сигналу, запускающему процесс распада везикулы на мелкие пузырьки и секрецию материала оболочки цисты (Marti et al., 2003b). Таким образом, было показано, что в трофозоитах лямблий везикулы инцистирования (ESVs) представляют собой компартмент, осуществляющий функции АГ по транспорту и модификации белков оболочки цисты. Авторы предполагают, что такая система сортировки и транспорта протеинов первична и моделирует состояние клетки, перед тем как функции сортировки были переданы специализированной органелле (Marti et al., 2003a). В рамках «модели созревания цистерн» (Allan, Balch, 1999) везикулы инцистирования (ESVs) можно рассматривать как Гольджи-подобные цистерны, претерпевающие матурационные изменения в ходе жизненного цикла паразита.

Секреторный транспорт в трофозоитах *Entamoeba histolytica*. Энтамебы — еще одна группа паразитических протистов, которую прежде относили к типу Archezoa в связи с отсутствием стандартного набора мембранных органелл, главным образом митохондрий и диктиосом АГ. Даже наличие ЭР у *E. histolytica* ставилось под сомнение (Ghosh et al., 1999). *E. histolytica* патогенна для человека. Заражение наступает при проглатывании цист, которые, попадая в кишечный тракт, дифференцируются в трофозоиты и заражают кишечный

эпителий и другие органы, например печень. Многочисленные гликопротеины, гликолипиды и лектины секретируются в клетках амёб и выделяются на поверхность, регулируя адгезивные и инвазивные свойства паразита. Кроме того, амёбы синтезируют протеиназы и другие молекулы, непосредственно связанные с вирулентностью, а также хитиназу в период инцистирования. Секреторные пути этих веществ изучались в связи с выявлением факторов патогенности и поиском биохимических мишеней для применения лекарств. Как выяснилось в результате исследований двух последних десятилетий, «простая» клеточная организация амёб скрывает тонкие и сложные функциональные приспособления к облигатному паразитизму. Несмотря на то что остается много неясностей в вопросе о структурной организации транспорта, несомненно то, что секреция большинства молекул осуществляется с помощью стандартных механизмов везикулярного транспорта. Крупные везикулы, расположенные вблизи ядра и связанные мембранной сетью, были идентифицированы как часть АГ на основании иммулокализации коатомерных белков, ARF и других молекул, участвующих в везикулярном транспорте. С помощью низкотемпературной фиксации и метода замораживания—замещения недавно удалось выявить наряду с крупными везикулами уплощенные цистерны в цитоплазме трофозоитов энтамеб, напоминающие Гольджи-цистерны высших эукариот (Chavez-Munguia et al., 2000). ЭР у энтамеб организован в виде везикул меньшего размера. Сигнальные последовательности, направляющие синтезируемые белки в различные клеточные компартменты трофозоитов (KDEL, N-терминальный сигнал и др.), оказались сходными с сигнальными пептидами клеток млекопитающих (Ghosh et al., 1999). Недавно удалось показать, что транслокация сахаров из цитоплазмы трофозоита в полость «ЭР-везикул» и в полость «АГ-везикул» (где эти сахара участвуют в гликозилировании протеинов) осуществляется с помощью различных гликозилтрансфераз, аналогично тому как это происходит у дрожжей и млекопитающих. Авторы впервые непосредственно продемонстрировали: 1) наличие функции Гольджи у фракции «крупных везикул», 2) разделение функций гликозилирования между ЭР и Гольджи-компартаментами и 3) сходство химической структуры ферментов-транспортеров сахаров у энтамеб и высших эукариот (Bredeston et al., 2005). Структура АГ энтамеб, а также транспорт большинства молекул, чувствительны к БФА, что еще раз показывают сходный механизм секреции у энтамеб и клеток млекопитающих. В то же время синтез некоторых протеиназ энтамеб, индуцируемый внешними стимулами, осуществляется с помощью иного механизма и нечувствителен к БФА. Секреция таких протеиназ была тесно связана с сокращением актомиозинового кортикального цитоскелета (Manning-Cela et al., 2003). Опубликованная недавно аннотация генома *E. histolytica* выявила наличие всех основных генов, ответственных за внутриклеточный транспорт, процессинг и синтез протеинов секреторного пути.

Аппарат Гольджи и системы секреторного транспорта *Apicomplexa*. Организация внутриклеточного секреторного транспорта в зоитах *Apicomplexa* на примере *Toxoplasma gondii* и *Plasmodium falciparum*. Тип *Apicomplexa* состоит исключительно из облигатных внутриклеточных паразитов. Наибольшее хозяйственное значение в качестве паразитов человека и домашних животных

имеют кокцидии (класс Coccidia), в частности представители родов *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Eimeria*, *Cryptosporidium* и *Sarcocystis*. Все кокцидии имеют подвижную расселительную стадию, называемую зоитом, служащую для внедрения паразита в клетку хозяина и быстрого в ней размножения. Внутриклеточная организация зоитов практически идентична у всех родов кокцидий. Из всех *Apicomplexa* наиболее удобной моделью для исследования внутриклеточного транспорта оказалась *Toxoplasma gondii* по следующим причинам. Паразит легко культивируется *in vitro*, развиваясь практически во всех линиях клеток млекопитающих. Кроме того, зоиты *T. gondii* способны к внеклеточному существованию, достаточно длительному для проведения стандартных тестов по динамике секреторных процессов. Вид хорошо изучен генетически, т. е. в Генбанке содержится информация о большинстве его генов. Также разработаны методики манипулирования небольшим по размеру (80 Мб) геномом гаплоидных зоитов (tachyzoites) *T. gondii*, а именно: созданы эффективные системы трансформации, позволяющие блокировать отдельные гены, вызывать направленный мутагенез и индуцировать экспрессию; сконструированы многочисленные молекулярные маркеры; подобраны методы трансфекции (Roos et al., 1994; Striepen et al., 2002). Ультраструктура зоитов кокцидий представляет собой в определенном смысле типичную модель эукариотной клетки: в клетке присутствуют одно ядро, одна митохондрия, одна рудиментарная пластида, компактная сеть ЭР, единственная диктиосома АГ, состоящая из 1 (зоиты *Plasmodium*) или 3—5 (зоиты *Toxoplasma* и *Eimeria*) цистерн, и апикально расположенный комплекс секреторных органелл (Snigirevskaia, 1969; Hager et al., 1999). Как видно из приведенного ниже краткого обзора литературы, секреторный аппарат *T. gondii* сочетает в себе уникальные и консервативные черты структуры и функций. Необычайно удобным для экспериментального анализа секреторного пути *T. gondii* оказалась строгая поляризованность клетки паразита на стадии зоита, являющаяся следствием особого механизма репликации (Hager et al., 1999; Hu et al., 2001). Ядро расположено центрально, разделяя клетку на две части. ЭР редуцирован и расположен за ядром в задней части зоита, при этом ядерная оболочка составляет значительную часть всего объема ЭР. Мелкие окаймленные пузырьки отпочковываются от передней части ядерной оболочки и направляются к комплексу Гольджи. С помощью иммуноцитохимических и генетических маркеров было показано, что HDEL-мотив, обеспечивающий возвращение резидентных белков ЭР, локализуется непосредственно над ядром, а ядерная оболочка выполняет функцию промежуточного компартмента между ЭР и Гольджи (Hager et al., 1999). При каждом последующем делении зоита АГ симметрично делится на две половины. Благодаря простоте организации механизм деления органеллы в *Toxoplasma* был тщательно изучен, а полученные результаты дали возможность предположить, что АГ эукариот в целом является парной структурой, аналогичной центриолям (Pelletier et al., 2002).

Сортировка и транспорт белков на ранних этапах секреторного пути (из ЭР в Гольджи и между цистернами Гольджи) в значительной степени осуществляются с помощью консервативных механизмов, аналогично тому как это происходит в клетках млекопитающих и дрожжей. В этих процессах участвуют гидрофобные мотивы цитоплазматических доменов карго и окаймления COPII,

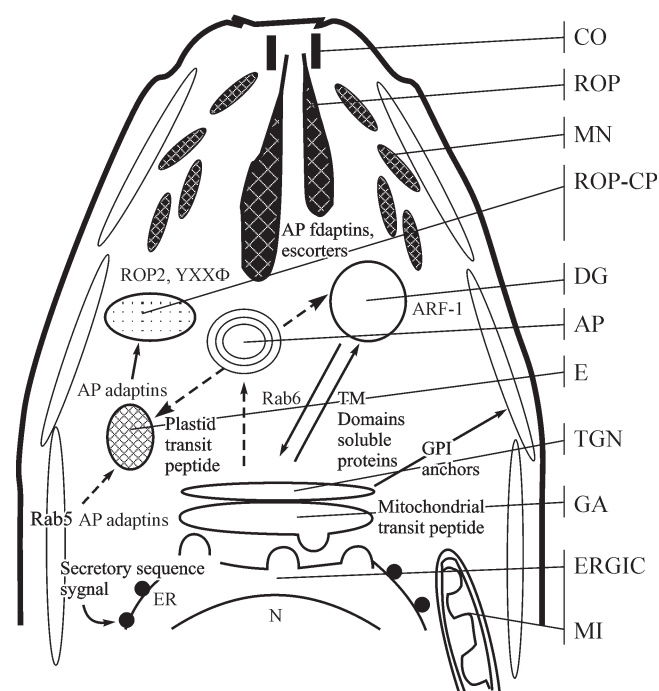


Рис. 4. Схема, суммирующая современные представления о направлениях пост-Гольджи-транспорта белков в зоитах *Aricomplexa* (по: Joiner, Roos, 2002).

Транспорт белков от эндоплазматического ретикулума (ER) к аппарату Гольджи (UGA) и между его цистернами осуществляется с помощью везикул, окаймленных коатомерами COPI и COPII, и регулируется малыми ГТФазами семейства Rab. Растворимые белки плотных гранул (DG), не несущие сигнальной последовательности, направляются из АГ в ПГ по умолчанию: белки роптрий (ROP) и микронем (MN) транспортируются от АГ через специализированный компартмент-предшественник (ROP-CP), который, возможно, связан с эндосомами. Для транспортировки растворимых белков MN необходимо связывание этих белков с трансмембранными эскортными белками. Белки, направляющиеся в апиколаст, обладают NH₂-концевым доменом, который обеспечивает транспортировку белка сначала в АГ, а потом, после отщепления концевой последовательности, в полость апиколаста, причем на последнем этапе используется транспортный пептид, гомологичный таковому растений. Неясно, следуют ли все секретируемые в АГ белки через апиколаст или нет (черные прерывистые стрелки). Также еще предстоит выяснить направление транспорта веществ, продуцируемых в апиколасте. Экспериментально доказанные направления транспорта указаны непрерывными стрелками; гипотетические (подтвержденные лишь косвенными доказательствами) — прерывистыми. Сигнальные факторы, определяющие направления транспорта белков к той или иной органелле, обозначены черными буквами на сером фоне.

COPI-зависимое рециклирование резидентных белков, образование комплексов адаптинов и др. (Ajioka et al., 1998; Liendo et al., 2001; Stedman et al., 2003). Как и в клетках модельных систем, транспорт белков через Гольджи *T. gondii* ингибируется низкой температурой, БФА и ингибитором сборки микротрубочек нокадазолом (Stokkermans et al., 1996; Soldati et al., 1998). В пузырьках, отпочковывающихся от дистальных участков трансцистерн, наблюдается клатриновое окаймление (Liendo et al., 2001). Многие поверхностные антигены *T. gondii* имеют консервативный трансмембранный GPI (гликозилфосфатидилинозитольный) мотив, являющийся сигнальным для встраивания в плазматическую мембрану (Karsten et al., 1998).

В зоитах *Aricomplexa* присутствуют три типа секреторных органелл: плотные гранулы, равномерно распределенные по цитоплазме, апикально расположенные микронемы и роптрии (рис. 4). Морфологически и функ-

ционально плотные гранулы напоминают зрелые секреторные гранулы в секреторных клетках млекопитающих. Предполагается, что они транспортируются в паразитофорную вакуоль, модифицируя ее мембрану и содержащее. Механизмы, регулирующие секрецию плотных гранул, неясны, сигнальные последовательности, обеспечивающие сортировку белков плотных гранул, не идентифицированы. Секреция не зависит от концентрации Ca²⁺, предполагается, что она осуществляется конститутивным путем (Dubremetz et al., 1993; Joiner, Roos, 2002; Stedman et al., 2003). Недавно была продемонстрирована роль ГТФазы Rab 6 в ретроградном транспорте белков из плотных гранул в АГ (Stedman et al., 2003). Ранее было показано, что эта ГТФаза участвует в рециклировании мембран Гольджи при формировании эндосомных везикул у дрожжей. Интересно, что мутанты *T. gondii* с нарушенной экспрессией Rab 6 демонстрировали нарушения цитокинеза: вместо эндоцитоза наблюдалась эндополиения. Это указывает на участие Rab 6 в сопряжении митоза и цитокинеза (Stedman et al., 2003). Роптрии отличны от всех типов известных секреторных гранул, сочетая в себе признаки эндосом и секреторных гранул. Секреция роптрий происходит в момент внедрения паразита в клетку хозяина и заканчивается в течение 15—29 с. По биохимическим признакам роптрии можно было бы отнести к эндосомно-лизосомному компартменту. Их содержимое подвергается ацидофикации подобно содержимому вторичных лизосом. И действительно, в них выявляются некоторые лизосомные маркеры, типа DAMP (3-[2,4-dinitroanilin]-3'-amino-N-methyldipropylamine) (Shaw et al., 1998). Мембраны роптрий, подобно мембранам мультивезикулярных телец и вторичных лизосом, обогащены холестерином (соотношение холестерин—фосфолипиды порядка 1.0 : 1.5) (Foussard et al., 1991; Bishop, Woodman, 2000). В процессе деления зоита органеллы — предшественники роптрий — образуются de novo в дочерних клетках сразу после разделения материнского Гольджи, постепенно созревая и увеличиваясь в размерах подобно секреторным гранулам (Soldati et al., 1998). Показано, что в белках роптрий присутствует трансмембранный домен, который в клетках млекопитающих функционально связан с формированием клатриновых везикул (Hoppe, Joiner, 2000; Bradley, Boothroyd, 2001; Striepen et al., 2002). Экспериментально было показано, что изъятие или замена этого домена предотвращает созревание роптрий (Bonifacio, Dell'Angelica, 1999; Hoppe, Joiner, 2000). В зоитах *T. gondii* (впервые у паразитических протистов) было получено свидетельство наличия тирозинзависимого механизма сортировки протеинов, что косвенно подтверждает по крайней мере эволюционную связь роптрий с лизосомно-эндосомной системой. Основная функция роптрий состоит, по-видимому, в модификации мембраны паразитофорной вакуоли (ПВ). Большинство компонентов, входящих в состав мембраны ПВ сразу после внедрения зоита, принадлежит клетке хозяина. Белки, секретируемые главным образом роптриями, быстро встраиваются в мембрану ПВ и специфически изменяют ее структуру, делая невозможным слияние ПВ с эндомембранными структурами клетки хозяина (Sibley et al., 1985; Joiner et al., 1990; Mordue et al., 1999).

Предполагается, что функция микронем связана с прикреплением зоита к клетке хозяина, так как белки, содержащиеся в матриксе микронем, содержат последовательности, ответственные за адгезивные свойства

(Brecht et al., 2001; Striepen et al., 2001). Выявлена целая серия таких белков-агезинов, в настоящее время идет активное изучение их внутриклеточного транспорта молекулярно-генетическими методами (Joiner, Roos, 2002). Было показано, что для транспортировки таких белков из АГ в микронемы растворимый белок должен образовывать комплекс с мембранным белком (transmembrane escorting). Так, трансмембранный белок MIC6 образует тройной комплекс с растворимыми белками микронем MIC1 и MIC4, мембранный «эскортный» протеин MIC8 образует комплекс с MIC3 (Meissner et al., 2002). MIC8 является эскортным протеином и для белков роптрий у *Plasmodium falciparum* (Baldi et al., 2000). Сортировка микронем в секреторном пути, так же как и роптрий, по-видимому, связана с тирозинзависимым механизмом (Hoppe, Joiner, 2000), хотя трансмембранные домены, обуславливающие такой тип сортировки, пока не выявлены.

В клетке зоитов есть еще одна органелла, которая вовлечена в секреторный транспорт. Это апикопласт, рассматриваемый как «реликтовый хлоропласт», оставшийся от одноклеточной водоросли, в прошлом — эндосимбионта клетки *Apicomplexa* (Kohler et al., 1997). Эта органелла, окруженная четырьмя мембранами (мембрана ПВ, плазмалемма водоросли и две мембраны хлоропласта), функционально не является рудиментарной, так как играет важную роль в липидном метаболизме клетки паразита (Fichera, Roos, 1997; Roos et al., 1999; He et al., 2001). Несмотря на то что хлоропласт обладает собственным геномом (объемом всего в 35 кб), большинство белков этой органеллы закодировано в ядре паразита, синтезируется на его рибосомах и транспортируется в органеллу после посттрансляционной модификации в АГ (Waller et al., 1998, 2000). Серией блестящих молекулярно-генетических исследований удалось выявить сигнальные последовательности, обеспечивающие котрансляционную транслокацию пластидных белков в ЭР (bipartite terminal NH₂ domaine) и последующую посттрансляционную транслокацию в хлоропласт («subterminal domain») (Roos et al., 1999; Waller et al., 2000; Yung et al., 2001). Хотя многие белки апикопласта *Toxoplasma* и *Plasmodium* идентифицированы и в некоторых из них даже выявлены домены, ответственные за распознавание компартмента — мишени (targeting signals) (Bahl et al., 2002), остается непонятным, каким образом происходит транспорт этих белков по секреторному пути. До сих пор не было обнаружено мембранных переносчиков, сливающихся с мембраной апикопласта или отпочковывающихся от нее. Обработка БФА или встраивание сигнальной последовательности, направляющей белок в ЭР, не изменяла направление транспорта белков к хлоропласту. Возможно, апикопласт сам является составной частью секреторного пути на уровне ЭР, тогда все белки, имеющие соответствующую концевую сигнальную последовательность (NH₂), должны проходить через апикопласт (Joiner, Roos, 2002). Роль апикопласта в жизнедеятельности зоита *Toxoplasma*, *Plasmodium* и других кокцидий сводится, по-видимому, к модификации липидов мембраны и содержимого паразитофорной вакуоли (Fichera, Roos, 1997). Рис. 4 суммирует современные представления о направлениях и механизмах секреторного транспорта в зоитах *Apicomplexa*.

Эритроцитарная стадия *Plasmodium* и эстраклеточный транспорт белков. Говоря об организации секреторного аппарата у *Apicomplexa*, невоз-

можно не коснуться уникальной системы транспорта, которую воссоздает малярийный плазмодий (*Plasmodium*), заражая эритроциты млекопитающих. Ниша обитания этого паразита, эритроциты — крайне специализированные клетки, которые предоставляют паразиту защиту от иммунной системы хозяина, но в то же время они полностью лишены собственного синтетического аппарата и системы внутриклеточного транспорта. В клетке эритроцита паразит лежит внутри паразитофорной вакуоли. Чтобы выжить, размножаться и взаимодействовать с внешней средой, паразит экспортирует свои белки через плазмалемму и мембрану паразитофорной вакуоли (МПВ) в цитозоль и клеточную мембрану эритроцитов, а также во внешнюю среду (кровеносный сосуд). Работы начала 1990-х годов и более ранние исследования не выявили АГ ни структурными, ни биохимическими методами на асексуальных эритроцитарных стадиях плазмодия (трофозоиты и стадия кольца). В то же время в клетке хозяина наблюдалась секреторная активность, связанная с мембранными структурами паразитарного происхождения. Причем вышеупомянутые мембранные структуры окрашивались флуоресцентным церамидом, что указывало на активность сфингомиелин-синтазы и принадлежность к цискомпарменту комплекса Гольджи (см. обзор: Banting et al., 1995). В последнее десятилетие механизмы, лежащие в основе необычной организации секреторного компартмента эритроцитарной стадии плазмодия, интенсивно изучались. Интерес к данной проблеме был обусловлен также и тем фактом, что многие белки, экспортируемые паразитом в мембрану эритроцита и за ее пределы, связаны с тяжелейшими синдромами, наблюдаемыми у больных малярией. В последние годы понимание процессов, лежащих в основе модификации эритроцита паразитом, значительно продвинулось благодаря сиквенсу и аннотации генома *Plasmodium falciparum*, развитию техники трансфекции асексуальных стадий жизненного цикла, идентификации новых паразитарных белков, а также успехам тонкого морфологического анализа с применением трехмерной реконструкции.

Данные о том, что транспорт большинства белков, проникающих в ПВ, блокируется БФА, свидетельствуют о том, что он осуществляется универсальным для всех изученных клеточных систем механизмом везикулярного транспорта. Известно, что взаимодействие БФА с ARF приводит к нарушению сборки коаномерных белков, окаймляющих транспортные везикулы. Были иммунолокализированы коаномерные белки, COP1 и COP2, элементы системы слияния пузырьков и пр. Исследования генома, активно ведущиеся в рамках «Малярийного геномного проекта», привели к идентификации генов белков, участвующих в транспорте, в частности генов белков семейства SNARE, коаномерных белков, белков кластринового комплекса, адаптинов и др. Усовершенствованный электронно-микроскопический анализ, включающий в себя трехмерную реконструкцию серийных срезов и коррелятивную микроскопию, позволили выявить в клетке плазмодия ЭР, образующий единую систему с ядерной оболочкой, а также Гольджи-подобный компартмент, состоящий из одной или нескольких тубулярных или уплотненных цистерн, окруженных везикулами различного диаметра. Этот комплекс расположен вблизи кластера окаймленных пузырьков, формирующихся в результате почкования внешней мембраны ядерной оболочки или ее выпячивания (Bannister et al., 2004). Было показано, что резидентные белки ПВ, а также транзитные белки, на-

правляющиеся в эритроцит, высвобождаются в пространство ПВ из транспортных везикул. Электронная микроскопия выявила особые везикулы, окруженные двойной мембраной (ВДМ), которые отпочковываются от ЭР в клетке паразита. Внешняя мембрана везикул сливается с плазмалеммой паразита, высвобождая «дочерние» внутренние везикулы, которые в свою очередь сливаются с МПВ и высвобождают содержимое в цитоплазму эритроцита (Oliaro, Castelli, 1997; Cooke et al., 2004). Применение зеленого флуоресцентного протеина и люциферазы в качестве люминесцентных маркеров в сочетании с трансфекцией эритроцитарной стадии плазмодия дало возможность наблюдать транспорт в живых клетках и выявлять сигналы, направляющие белки паразита к различным компартментам системы. Белки, предназначенные для транспортировки к плазмалемме паразита в ПВ к МПВ, имеют классический сигнальный мотив, состоящий из примерно 15 гидрофобных аминокислот, расположенный на расстоянии 3—17 аминокислот от N-конца. Белки, которые проходят через МПВ в цитоплазму эритроцитов, имеют более длинный сигнальный мотив, состоящий из примерно 30 аминокислот, которые отстоят на 80 аминокислот от N-конца. Сходный внутренний сигнальный мотив выявлен в некоторых белках высших эукариот, например в овальбумине (Tabe et al., 1984). В то же время существуют некоторые исключения. Так, некоторые белки, экспортируемые в пищеварительную вакуоль плазмодия, обладают так называемым молчащим сигналом, который представляет собой гидрофобный участок белка, функционирующий как мембранный якорь и отщепляющийся во время прохождения через мембрану вакуоли (Klemba et al., 2004). Другое исключение — HRP (histidine rich protein), который хотя и направляется в цитоплазму эритроцита, но содержит классический гидрофобный сигнал. Кроме того, было показано, что транслокация растворимых паразитарных белков через МПВ требует энергии в виде АТФ и что, вероятнее всего, АТФ-зависимый переносчик вовлечен в перенос белков через МПВ (Ansoerge et al., 1996). В эритроците паразит выстраивает собственную систему мембран. Некоторые важные для патогенеза паразитарные белки были обнаружены в цитоплазме эритроцита также в свободном виде (вне мембранных компартментов). Эти белки могут проходить через ПВ в виде полипептидов, лишенных вторичной структуры (unfolded proteins). В цитоплазме эритроцита эти белки заново сворачиваются и спонтанно скапливаются в определенных участках клетки, взаимодействуя с резидентными белками эритроцита. Некоторые трансмембранные белки (например, PfEMP1 — *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein) предположительно доставляются к плазмалемме эритроцита с помощью везикулярного транспорта (Taschchi et al., 2001, 2003). В связи с этим появился интерес к мембранным компартментам, возникающим по мере созревания паразита в эритроците. На стадии кольца МПВ образует короткие пальцеобразные выросты. Эти выросты могут отпочковываться от МПВ и давать начало мелким везикулам или трубочкам (Bannister et al., 2003, 2004). По мере созревания паразита в эритроците возникают структуры, известные как клефты Маурера (Maurer's Clefts) (КМ), представляющие собой вытянутые мембранные цистерны с плотными стенками и электронно-прозрачным содержимым. С цитоплазматической стороны к стенкам КМ часто примыкают агрегаты аморфного электронно-плотного материала. По мере со-

зревания паразита КМ подходят вплотную к ПМ эритроцита, но не сливаются с ней, а образуют зоны контакта, электронно-микроскопически выявляемые как тяжи фиброзного материала умеренной электронной плотности. Вблизи таких цистерн часто располагаются скопления мелких везикул диаметром 20—25 нм. Роль КМ в транспорте паразитарных антигенов особенно активно изучалась в связи с транспортом белка PfEMP1, который является полиморфным интегральным белком, определяющим адгезивные свойства инфицированных эритроцитов. Известно, что адгезия таких клеток к поверхности васкулярного эпителия является причиной ряда фатальных синдромов при малярии (Cooke et al., 2004). Предполагается, что КМ служат транзитным депо при транспортировке PfEMP1. Белок встраивается в мембрану КМ с помощью C-терминального домена.

В цитоплазме инфицированного эритроцита выявлен также другой тип мембранных структур — тубуловезикулярная сеть (ТВС), представляющая собой скрученную в эллипс цистерну, замыкающую в себе часть цитоплазмы эритроцита. В некоторых случаях обнаружена связь мембран ТВС и паразитофорной вакуоли. Характерно, что мембраны обеих структур не имеют электронно-плотного покрытия, характерного для мембран КМ; также они имеют весьма сходный антигенный состав. Предполагается, что ТВС принимает участие в транспорте компонентов от ПМ эритроцита и из окружающей среды (Lauer et al., 1997). Некоторые исследования показывают, что КМ и ТВС также связаны в единую мембранную сеть, тогда как другие исследования говорят в пользу того, что КМ — обособленный компартмент, который контактирует с ТВС через систему везикулярного транспорта. С помощью иммуноцитохимических исследований в цитоплазме инфицированных эритроцитов выявлены многие элементы системы везикулярного транспорта паразитарного происхождения, включая белки коатомерных комплексов Sar1p, Sec31p, Sec23, PfNSF и др. (Hayashi et al., 2001; Cooke et al., 2004). Таким образом, можно констатировать, что малярийный плазмодий способен воссоздавать систему классического везикулярного транспорта за пределами собственной плазматической мембраны, т. е. экспортировать секреторную систему. Пути секреторного транспорта в клетке малярийного плазмодия на эритроцитарной стадии схематично изображены на рис. 5.

Обзор литературы по секреторной системе *Apicomplexa* можно резюмировать следующим образом. Упрощенная поляризованная организация клетки мерозоитов кокцидий позволяет легко вычленять компартменты секреторного пути и сравнивать эту систему с клетками млекопитающих и дрожжей. Там, где механизмы транспорта консервативны, мерозоиты *T. gondii* и других кокцидий представляют собой идеальную модель для изучения транспорта в клетке эукариот в целом, например для изучения роли коатомерных белков COP1 и COP2 в транспорте от ЭР к Гольджи или для изучения процесса деления Гольджи. Там, где эти механизмы уникальны, например в процессе секреции липидов роптрий, при транспортировке белков через четыре мембраны апикопласта или к мембранным компартментам, находящимся за пределами клетки паразита, исследования *Apicomplexa* помогут выявить разнообразие путей эволюции эукариот, а также найти потенциальные мишени для применения лекарственных препаратов (Joiner, Roos, 2002).

Аппарат Гольджи кинетопластид. Кинетопластиды (Kinoplastida) представляют собой еще одну ветвь эволюции эукариотической клетки. В целом секреторный транспорт в клетках паразитических кинетопластид, так же как и в родственных им свободноживущих эвгленовых (Euglenidea), организован примерно так же, как и в клетках млекопитающих. АГ представлен одной диктиосомой, состоящей из 6—10 уплощенных цистерн, и разделен на стандартные субкомпарменты (цис-, медиал-, транс- и транс-Гольджи-сеть), хорошо выявляемые с помощью маркерных белков (Duszenko et al., 1988; Weise et al., 2000; McConville et al., 2002a, 2002b).

Кинетопластиды, в первую очередь *Trypanosoma brucei*, чрезвычайно привлекательны как удобная модель для изучения внутриклеточного транспорта компартмент (Overath, Engstler, 2004). Трипаносомы легко культивируются *in vitro*, разработаны методы их трансфекции и генетической модификации. В клетках этих жгутиконосцев эндо- и экзоцитоз приурочены к ограниченной области плазматической мембраны — области жгутикового кармана. Все эндо- и экзоцитозные компартменты, включая диктиосому, расположены в задней части клетки между ядром и жгутиковым карманом, что облегчает трехмерную реконструкцию этих компартментов с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии и визуализацию процессов транспорта. Для трипаносом характерна необычайно высокая интенсивность процессов экзо-, эндоцитоза, сортировки и концентрации экспортируемых и рециклируемых белков: 10⁷ поверхностных гликопротеинов буквально ежеминутно (Overath, Engstler, 2004) рециклируют от мест синтеза в ЭР к ПМ (экзоцитоз) и обратно (эндоцитоз), используя везикулярный транспорт. 10 % синтезируемых *T. brucei* поверхностных белков и гликолипидов имеют GPI-мотив («мембранный якорь»), обеспечивающий встраивание этих белков в мембрану. Количественный и ультраструктурный анализ рециклирования GPI-ассоциированных белков в клетках трипаносом (в клетках млекопитающих только в 0.5 % клеточных белков выявлен этот мотив) значительно продвинул понимание механизмов транспорта белков к плазматической мембране эукариот (Overath, Engstler, 2004).

Наиболее основательно секреторный транспорт изучен у кинетопластид, патогенных для млекопитающих, в частности у *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* и *Leishmania* spp., возбудителей соответственно сонной болезни, болезни Чагаса и висцерального лейшманиоза человека. Поверхностные белки и другие вещества, жизненно важные с точки зрения взаимоотношений этих облигатных паразитов с клетками хозяина, интенсивно изучались с целью создания специфичных вакцин. К числу таких веществ относятся поверхностные гликопротеины типа эндопротеазы grb3, протеиноподобные фосфатазы, липофосфоглюканы и мембранные переносчики глюкозы лейшманий, α-маннозидаза у *T. cruzi* и вариабельные поверхностные гликопротеины (variant surface glycoproteins, VSGs) у *Trypanosoma* spp. (список источников до 1996 г. см.: Becker, Melkonian, 1996). Все поверхностные молекулы кинетопластид гликозилированы. Биосинтетические пути многих поверхностных белков кинетопластид детально охарактеризованы. Показано, что N-гликозилирование, формирование гликаносфосфатидил-инозитольных доменов, «заякоривающих» эти белки в поверхностной мембране (GPI-anchors), и другие элементы процессинга происходят в основном (но не все-

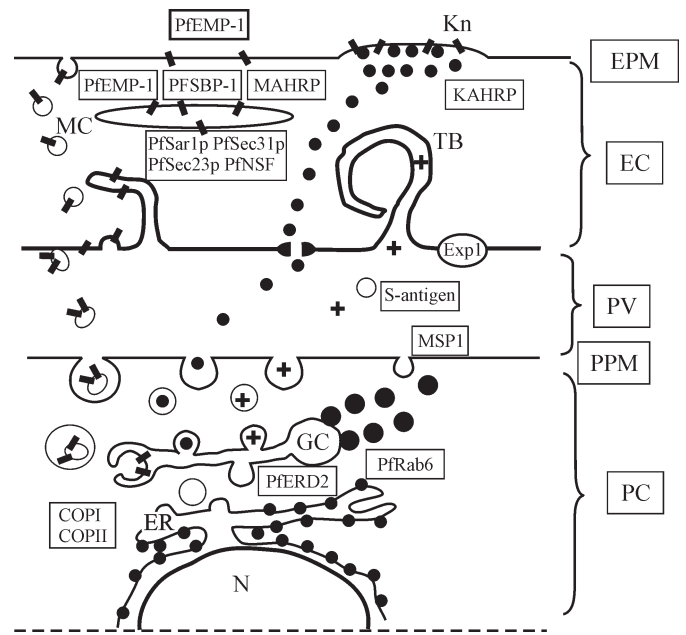


Рис. 5. Гипотетическая схема путей секреторного транспорта *Plasmodium falciparum*, суммирующая экспериментальные данные (по: Cooke et al., 2004).

Растворимые белки, предназначенные на экспорт, направляются в ЭР и затем проходят через АГ. Белки PfERD2, RfRab6, COPI и COPII необходимы для формирования везикул и транспорта от ЭР к АГ (и обратно). Белки KAHRP, S-antigen и MSP1 транспортируются в специальных везикулах (в некоторых случаях совместно с другими белками) к различным субкомпартаментам паразитической вакуоли (PV). В PV белки сортируются на резидентные и транзитные, следующие в клетку хозяина. Ряд белков от плазматической мембраны плазмодия (PPM), ЭР или АГ направляются к секреторным (роптриям, микронемам) или другим органеллам (пищевой вакуоли, апикопласту и др.) цитоплазмы плазмодия (PC). Транзитные белки (KAHRP) сначала высвобождаются в просвет PV, а затем переносятся в цитоплазму эритроцита (EC) через АТФ-зависимый переносчик (ABC transporter) с помощью специального транслокационного мотива (Expl). Эти белки формируют на плазматической мембране эритроцита (EPM) «узелки» (Kp). Экспорт интегральных мембранных белков типа PfEMP-1 предположительно осуществляется в везикулах. Белок PfEMP-1 переносится к клефтам Маурера (MC), которые представляют собой промежуточный компартмент секреторного пути от паразита к мембране эритроцита. PfSBP-1, PfEMP-3 и MAHRP — маркерные белки MC. Показано, что три компонента коапомерного белка COPII, Sar1p, Sec31p и Sec23p экспортируются из клетки паразита к MC вместе с PfNSF.

гда) в АГ кинетопластид (Parodi, 1993; Rubotham et al., 2005). Подавляющее число работ по мембранному транспорту кинетопластид посвящено секреции VSGs. С помощью иммунной колокализации этих белков и маркеров компартментов АГ показано, что VSGs *T. brucei* направляются к клеточной поверхности, используя классический путь секреции, и выявляются последовательно в ЭР, цистернах Гольджи, тубулярных структурах транс-Гольджи-сети, а затем на поверхности ПМ (Duszenko et al., 1988). В процессе транспорта к ПМ происходит 50-кратная концентрация VSGs (Grunfelder et al., 2002). Остается непонятным, почему мoneзин, ионофор моновалентных катионов, ингибирующий АГ—ПМ-транспорт в большинстве клеточных систем (Mollenhauer et al., 1990), не оказывает влияния на секрецию VSGs, хотя адекватно изменяет морфологию Гольджи (вызывает набухание транс-Гольджи) и блокирует синтез N-гликанов (Bangs et al., 1986; Duszenko et al., 1988). Было высказано предположение о наличии дополнительных секреторных путей синтеза и рециклирования

VSGs (Ferguson et al., 1986; Grunfelder et al., 2002). Сиквенирование генов некоторых белков секреторного пути кинетопластид показало их значительное сходство с генами аналогичных белков дрожжей и млекопитающих (Bangs et al., 1993; Ryan et al., 1993; Descoteaux et al., 1995; McConville et al., 2002b).

В последние годы были получены интересные данные по биогенезу АГ *T. brucei*. Было показано, что в делющихся жгутиконосцах АГ формируется из ЭР de novo в зоне ЭР—АГ промежуточного компартмента (Golgi export sites), который располагается у трипаносом вблизи ядра. За 2 ч органелла достигает размеров АГ зрелой клетки. При созревании нового АГ наблюдаются активное взаимодействие и обмен материалом со «старым» Гольджи (He et al., 2004). Эти данные, с одной стороны, противоречат двум основным теориям биогенеза Гольджи, согласно которым 1) новый АГ образуется в результате деления старого (Benchimol et al., 2001), 2) новый АГ возникает de novo из ЭР (Bevis et al., 2002) без участия старого. С другой стороны, полученные на *T. brucei* данные, объединяют эти две теории.

Аппарат Гольджи паразитических простейших и эволюция эукариот (вместо заключения)

На рис. 1 представлено «древо жизни» — одна из первых кладограмм, построенная на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена малой субъединицы рибосомальной РНК (МС рДНК). Это гипотетическое древо, отражающее гипотезу последовательной дивергенции различных групп от основного ствола эукариот (Sogin, 1991), послужило стимулом для исследований в области эволюции эукариот в последние два десятилетия.

Любопытно, что один из наиболее известных специалистов по макросистемам эукариот Кавальер-Смит (Cavalier-Smith, 1993) одно время придавал диктиосомам АГ исключительное значение в филогении простейших — большее, чем жгутику или митохондриям. В одной из своих ранних филогенетических систем он даже разделил царство Protozoa на два подцарства — Adictyozoa и Dictyozoa — в зависимости от отсутствия или наличия структур АГ. В последующем он отказался от этой экстраемальной идеи. Очевидно, что данный признак мало пригоден в качестве маркера супертаксонов эукариот, так как может варьировать в пределах одной группы. Так, диктиосомы не найдены у представителей Охутопада, однако присутствуют в близкородственном таксоне *Trymastix* (Dacks, Doolittle, 2001) и даже могут появляться или исчезать в ходе жизненного цикла, как у ряда видов родов *Giardia* и *Plasmodium*.

Рассматривая структуру и функцию секреторных систем простейших в эволюционном аспекте, невозможно не коснуться филогении эукариот, в частности «архезойной гипотезы» (Cavalier-Smith, 1983). Данные по ультраструктуре паразитических простейших, в том числе рассмотренные в настоящем обзоре, сыграли существенную роль как в становлении, так и в отказе от этой ошибочной, но вместе с тем плодотворной для развития науки идеи. В основе гипотезы лежало представление, господствующее еще полтора десятилетия назад, о том, что клетка так называемого последнего общего предка эукариот была устроена существенно проще, чем клетка

любого из ныне живущих организмов. На основании структурных особенностей, прежде всего отсутствия митохондрий, пероксисом и диктиосом АГ, было выявлено несколько групп современных протистов, которые предположительно наиболее рано дивергировали от общего ствола эукариот: Parabasalia (*Trichomonas*),² Diplomonada (*Giardia*), Entamoebidae (*Entamoeba*), Microsporidia (*Nosema* и *Encephalitozoon*), Oxymonada (*Oxymonas*), Heterolobosea (*Naegleria*) и Pelobionta (*Mastigamoeba*). Эти «рано дивергировавшие» таксоны рассматривались как прямые потомки предковой эукариотической клетки и были помещены в царство Archezoa (Cavallier-Smith, 1983).

Постулировалось, что дивергенция этих групп от общего ствола эукариот произошла до установления симбиотических отношений предковой клетки с эндосимбиотическими бактериями, предшественниками митохондрий (Vossbrinck, Woese, 1986; Vossbrinck et al., 1987). Обращает на себя внимание тот факт, что подавляющее большинство таксонов, входящих в Archezoa, представлены облигатными паразитами. В противоположность первичной простоте паразитических Archezoa подразумевалось, что упрощенное («минимизированное») строение клеток паразитических простейших других групп, например, Apicomplexa (*Toxoplasma* и *Plasmodium*), Kinetoplastida (*Trypanosoma* и *Leishmania*) или паразитических одноклеточных грибов, вторично и является следствием паразитического образа жизни. Интересно, что первые реконструкции филогенетических взаимоотношений на основании анализа сиквенса МС рДНК подтвердили предположение о ранней дивергенции по крайней мере части представителей Archezoa (Sogin, 1991). В дальнейшем усовершенствование алгоритмов филогенетического анализа и более глубокое понимание механизмов молекулярной эволюции помогли выявить и исправить ряд методических просчетов, которые приводили к неверной топологии филогенетических древ. Одна из типичных ошибок — так называемый артефакт взаимного притяжения длинных ветвей (long-branch attraction artifact; Felsenstein, 1978) — основана на ложном предположении о том, что один и тот же ген в разных организмах эволюирует с одинаковой скоростью.³ Преодолеть такого рода ошибки помогает использование нескольких генов (рРНК, ДНК-полимеразы, структурных белков типа актина, тубулина, миозина и др.), а также усовершенствование алгоритмов и уточнение параметров компьютерного анализа (Arisue et al., 2005; Fischer, Palmer, 2005). Классическим примером «артефакта взаимного притяжения длинных ветвей» оказалось неверное заключение о древности происхождения микроспоридий на основании сравнительного филогенетического анализа сиквенсов МС рДНК.⁴ Отделение микроспоридий от Archezoa и перемещение этой группы от основания филогенетического древа (Vossbrinck et al., 1987) к его вершине (Keeling

² В скобках приведен род наиболее известного или изученного представителя.

³ В филогенетических построениях быстро эволюирующие сиквенсы («длинные ветви») искусственно группируются друг с другом и с истинно древними последовательностями, в частности с последовательностями Eubacteria и Archea, которые обычно выбираются в качестве «внешних групп» (outgroups) при реконструкциях макросистемы эукариот.

⁴ Предположение о ранней дивергенции диплоноад и парабазалид, возможно, основано на той же расчетной ошибке (Dacks, Doolittle, 2001), хотя древность последних пока подтверждается некоторыми (но не всеми) альтернативными методами филогенетического анализа (Keeling et al., 2000; Arisue et al., 2005).

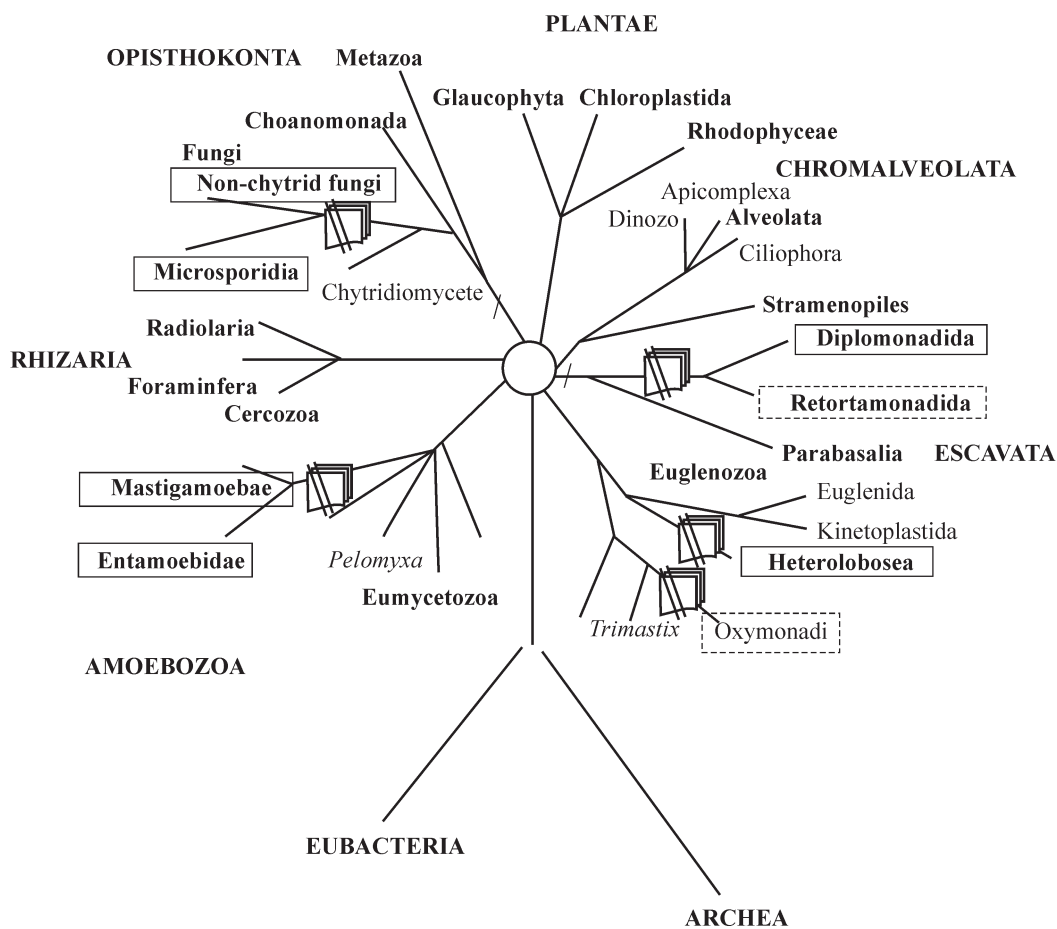


Рис. 6. Древо жизни (по: Adl et al., 2005).

Схема отражает господствующую концепцию монофилетического происхождения клетки эукариот от прокариот, а также наиболее общепринятое представление о дивергенции основных групп (супертаксонов). Монофилетичность всех супертаксонов, за исключением Escavata, подтверждается независимыми методами филогенетического анализа при использовании как ультраструктурных признаков, так и сиквенсов генов, кодирующих различные макромолекулы (более 20). Моно- или даже парафилетичность Escavata подтверждается не во всех случаях (Arisue et al., 2005), и этот таксон, возможно, сборный (полифелетичный). Последовательность дивергенции супертаксонов не разрешается используемыми методами анализа, однако последние указывают на два наиболее вероятных местоположения корня дерева: это ветви, ведущие к кладе Parasasalia /Diplomonada и к Opisthokonta (предположительные позиции корня на схеме обозначены «*петелькой*»). Те таксоны, в которых отсутствуют диктиосомы АГ, обведены *рамкой*. Биохимические, структурные или молекулярные доказательства наличия функционирующего АГ выявлены во всех таксонах, за исключением Retortamonada и Oxymonada (*рамка* обозначена *штриховой линией*). Считается, что клетка последнего общего предка обладала диктиосомой и в ходе эволюции эукариот АГ изменялся до неузнаваемости как минимум 5 раз («*бумажные стопки*», *перечеркнутые черной линией*). Схема обобщает данные Dacks et al., 2003; Adl et al., 2005; Arisue et al., 2005.

et al., 2000) стало первым сокрушительным ударом по архезойной гипотезе. В настоящее время принадлежность Microsporidia и Fungi к одному филогенетическому кладу показана при использовании нуклеотидных последовательностей многих генов, в том числе и МС рДНК (Fischer, Palmer, 2005). Вторым ударом по архезойной гипотезе было выявление митохондриальных генов в геномах представителей всех групп Archezoa (Germot et al., 1996, 1997; Ghosh et al., 2000; Arisue et al., 2002; Williams et al., 2002; Tovar et al., 2003). В-третьих, отсутствие у Archezoa интронов и системы сплайсинга также не подтвердилось. В геномах представителей микроспоридий, трихомонад (Biderre et al., 1998; Fast et al., 1998; Fast, Doolittle, 1999), парабазалид и других архезойных таксонов выявлены либо интроны, либо гены факторов сплайсинга, либо то и другое (Dacks, Doolittle, 2001). И наконец, в-четвертых, следует считать доказанным, в том числе и примерами, приведенными в настоящем обзоре, что АГ в явном или скрытом виде имеется в клетках всех современных эукариот (рис. 6; см.

таблицу). Совокупность имеющихся данных говорит о том, что, скорее всего, клетка общего предка эукариот обладала митохондриями, интронами, механизмом сплайсинга, АГ и вообще всеми основными биологическими и молекулярными чертами, присущими клеткам современных эукариот (литературу см.: Dacks, Doolittle, 2001). Простота предположительно рано дивергировавших групп является, скорее всего, следствием вторичной утраты клеточных структур, например в результате паразитического образа жизни.

Успехи молекулярной филогенетики последних лет имели огромное положительное значение для систематики одноклеточных организмов (протистов): уточнены старые и выявлены новые связи между таксонами; положение ряда групп в системе кардинально пересмотрено; подтверждена или опровергнута правомочность выделения спорных таксонов (Sogin, Silberman, 1998; Cavalier-Smith, 1999, 2004; Dacks, Doolittle, 2001, 2002; Adl et al., 2005). Одновременно новые данные поставили под сомнение теорию последовательной дивергенции групп

Гены белков, ассоциированные с аппаратом Гольджи, в различных группах эукариот^а

Таксон	Организм	Гены белков, связанных с эндомембранным транспортом ^б							
		синтаксины	Snap25 ^в	rab	arf-gap	β-COP	Vps	AP	Sec1
Metazoa, Bilateria	<i>Homo</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Fungi	<i>Saccharomyces</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Microsporidia	<i>Encephalitozoon</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	НВ ^г	+
Eumycetozoa	<i>Dictyostelium</i>	+	НВ ^г	+	НВ ^г	НВ ^г	+	+	+
Entamoebidae	<i>Entamoeba</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	+	+
Mastigamoebidae	<i>Mastigamoeba</i>	? ^д	? ^д	? ^д	? ^д	НВ ^г	+	+	? ^д
Embryophyta	<i>Arabidopsis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	+	+
Rhodophyceae	<i>Porphyra</i>	+	НВ ^г	НВ ^г	НВ ^г	+	+	+	НВ ^г
Stramenopiles	<i>Phytophthora</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	+	+
Diplomonadida	<i>Giardia</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	+	+
Kinetoplastida	<i>Trypanosoma</i>	+	НВ ^г	+	+	+	+	+	+
Heterolobosea	<i>Naegleria</i>	? ^д	? ^д	? ^д	? ^д	+	НВ ^г	НВ ^г	? ^д

^а Таблица построена на основании работ (Katinka et al., 2001; Dacks, Doolittle, 2002; Dacks et al., 2003; Fedorov, Hartmann, 2004), суммирующих данные соответствующих геномных проектов, за исключением данных по *Naegleria* и *Mastigamoeba*, которые взяты из оригинального исследования (Dacks et al., 2003). ^б Синтаксины (кодируются генами, гомологичными sso, sed5, pep12 *Saccharomyces*) — белки, относящиеся к семейству SNARE; Snap25 (гены, гомологичные sec9 *Saccharomyces*); rab — белки семейства ГТФаз, принимающих участие в ЭР-Гольджи-транспорте; arf-gap — белки семейства ГТФаз, принимающих участие в транспорте между цистернами Гольджи; β-COP — субъединица коацерватного белка COP1, участвующего в ретроградном ЭР-Гольджи-транспорте; Vps — белки ретромерного комплекса, кодируемые генами Vps26 и Vps35 (их функция — участие в рециклировании белков транс-Гольджи-сети); AP — семейство адапторных белков, вовлеченных в формирование окаймления клатриновых везикул; Sec1 — белок, который принимает участие в закоривании SNARE в мембране. ^в Snap25 выявлен только в клетках млекопитающих, высших растений и дрожжей, но не обнаружен у представителей других исследованных групп, что ставит под сомнение его консервативность, предполагаемую ранее см. в тексте обзора). ^г Ген не выявлен. ^д Исследования не проводились.

от общего ствола.⁵ Схема эволюционных связей между основными таксонами эукариот, изображенная в виде неукорененной дендрограммы, в большей степени согласуется с имеющимися структурными и молекулярными данными. В трех из шести супертаксонов, выделяемых Новой классификацией протистов (Adl et al., 2005), существует как минимум восемь групп, целиком составленных из видов, в которых АГ не выявляется в виде классической стопки цистерн. На рис. 6 эти группы обведены рамкой. Однако молекулярно-генетические и(или) биохимические доказательства говорят в пользу того, что органелла с функциями АГ имеется во всех изученных группах. Исключение составляют Oxymonada и Retortamonada, для которых пока не получено таких доказательств, хотя в родственных этим группам таксонах АГ присутствует в скрытом (Diplomonada, Giardia) или явном (Trimastix) виде (Dacks et al., 2003).

В целом следует отметить, что ни признак наличия или отсутствия диктиосом, ни число диктиосом в аппарате Гольджи никак не связаны с интенсивностью секреции или с расположением группы на филогенетическом древе. Например, предположительно «древние» Parabasalida, имеют хорошо развитую систему уплощенных цистерн, а «продвинутые» Fungi, за исключением Chitridiomycetes, вообще лишены диктиосом. Сложность организации и консервативность белков и генов, участвующих в секреторном транспорте в различных группах

эукариот (см. таблицу), говорит о том, что АГ возникал в эукариотической клетке всего один раз и что, по-видимому, в клетке общего предка он был организован в виде стопки цистерн (Dacks, Doolittle, 2001). Прямым доказательством того, что в таксонах, лишенных диктиосом, произошла вторичная утрата морфологически выраженного АГ, служит выявление генов и белков, участвующих в транспорте между компартментами Гольджи. Предполагается, что в ходе эволюции эукариот АГ изменялся как минимум 5 раз (рис. 6) (Dacks et al., 2003).

Следует подчеркнуть, что дальнейшие исследования АГ, поражающего своим морфологическим разнообразием, консервативностью и универсальностью функций в различных группах организмов, поможет ответить на многие важные теоретические и практические вопросы, связанные с морфофункциональными особенностями и генетическим контролем процессов внутриклеточного транспорта.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ИНТАС (проект 99-1732) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49629, 03-04-49422 и 06-04-48281).

Список литературы

- Снизиревская Е. С., Соколова Ю. Я., Комиссарчик Я. Ю. 2006. Структурно-функциональная организация аппарата Гольджи. Цитология. 48 (4) : 283—307.
Adam R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14 : 447—475.

⁵ По мнению некоторых исследователей, основанному на молекулярном анализе сиквенсов ряда консервативных генов, дивергенция предковой формы произошла так стремительно (Big Bang radiation), что порядок отщепления таксонов от общего ствола определить не представляется возможным (Philippe et al., 2000).

- Adl S. M., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., Browser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., McCourt R. M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S. E., Neerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., Spiegel F. W., Taylor M. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52 : 399—451.
- Ajioka J. W., Boothroyd J. C., Brunk B. P., Hehl A., Hillier L., Manger I. D., Marra M., Overton G. C., Roos D. S., Wan K. L., Waterston R., Sibley L. D. 1998. Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa. *Genome Res.* 8 : 18—28.
- Allan D., Kallen K. J. 1994. Is plasma membrane lipid composition defined in the exocytic or the endocytic pathway? *Trends Cell Biol.* 4 : 350—353.
- Allan V. 1995. Membrane traffic motors. *FEBS Lett.* 369 : 101—106.
- Andersson S. G. E., Kurland C. G. 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 : 535—541.
- Ansorge I., Benting J., Bhakdi S., Lingelbach K. 1996. Protein sorting in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming proteins streptolysin. *O. Biochem. J.* 315 : 307—314.
- Arisue N., Hasegawa M., Hashimoto T. 2005. Root of the eukaryota tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 22 : 409—420.
- Arisue N., Sacher L. B., Weiss L. M., Muller M., Hashimoto T. 2002. Mitochondrial-types hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol. Int.* 51 : 9—16.
- Bahl A., Brunk B., Coppel R. L., Crabtree J., Diskin S. J., Fraunholz M. J., Grant G. R., Gupta D., Huestis R. L., Kissinger J. C., Labo P., Li L., McWeeney S. K., Milgram A. J., Roos D. S., Schug J., Stoeckert C. J., jr. 2002. PlasmoDB: the *Plasmodium* genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished). *Nucl. Acids Res.* 30 : 87—90.
- Baldi D. L., Andrews K. T., Waller R. F., Roos D. S., Howard R. F., Crabb B. S., Cowman A. F. 2000. RAP1 controls rhoptry targeting of RAP2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.* 19 : 2435—2443.
- Bangs J. D., Andrews N. W., Hart G. W., Englund P. T. 1986. Posttranslational modification and intracellular-transport of a trypanosome variant surface glycoprotein. *J. Cell Biol.* 103 : 255—263.
- Bangs J. D., Hereld D., Krakow J. L., Hart G. W., Englund P. T. 1985. Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 3207—3211.
- Bangs J. D., Uyetake L., Brickman M. J., Balber A. E., Boothroyd J. C. 1993. Molecular cloning and cellular localization of a Bip homolog in *Trypanosoma brucei* — divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J. Cell Sci.* 105 : 1101—1113.
- Bannister L. H., Hopkins J. M., Dluzewski A. R., Margos G., Williams I. T., Blackman M. J., Kocken C. H., Thomas A. W., Mitchell G. H. 2003. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *J. Cell Sci.* 116 : 3825—3834.
- Bannister L. H., Hopkins J. M., Margos G., Dluzewski A. R., Mitchell G. H. 2004. Three-dimensional ultrastructure of the ring stage of *Plasmodium falciparum*: evidence for export pathways. *Microscopy and Microanalysis.* 10 : 551—562.
- Banting G., Benting J., Lingelbach K. 1995. A minimalist view of the secretory pathway in *Plasmodium falciparum*. *Trends Cell Biol.* 5 : 340—343.
- Becker B., Melkonian M. 1996. The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution. *Microbiol. Rev.* 60 : 697—721.
- Beh C. T., Rose M. D. 1995. 2 redundant systems maintain levels of resident proteins within the yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 9820—9823.
- Benchimol M., Ribeiro K. C., Mariante R. M., Alderete J. F. 2001. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Eur. J. Cell Biol.* 80 : 593—607.
- Bevis B. J., Glick B. S., Mogelsvang S., Staehelin L. A. 2002. De novo formation of transitional ER and Golgi compartments in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 283A.
- Beznoussenko G. V., Mironov A. A. 2002. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *Anat. Res.* 268 : 226—238.
- Biderre C., Metenier G., Vivares C. P. 1998. A small spliceosomal-type intron occurs in a ribosomal protein gene of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94 : 283—286.
- Bishop N., Woodman P. 2000. ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 227—239.
- Boman A. L., Kahn R. A. 1995. Arf proteins — the membrane traffic police. *Trends Biochem. Sci.* 20 : 147—150.
- Bonifacino J. S., Dell'Angelica E. C. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* 145 : 923—926.
- Boulan E., Sabatini D. 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75 : 5071—5075.
- Bradley P. J., Boothroyd J. C. 2001. The pro region of *Toxoplasma* ROP1 is a rhoptry-targeting signal. *Int. J. Parasitol.* 31 : 1177—1186.
- Brecht S., Carruthers V. B., Ferguson D. J. P., Giddings O. K., Wang G., Jakle U., Harper J. M., Sibley L. D., Soldati D. 2001. The toxoplasma micronemal protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.* 276 : 4119—4127.
- Bredeson L. M., Caffaro C. E., Samuelson J., Hirschberg C. B. 2005. Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 280 : 32168—32176.
- Bretscher M. S., Munro S. 1993. Cholesterol and the Golgi-Apparatus. *Science.* 261 : 1280—1281.
- Cavalier-Smith T. 1983. A 6-kingdom classification and a united phylogeny. In: Schwemmler W., Schenk H. (eds). *Endocytobiology II*. Berlin; de Gruyter. 265—279.
- Cavalier-Smith T. 1991. Cell evolution. In: Osawa S., Honjo T. (Eds). *Evolution of life*. Tokyo: Springer-Verlag. 271—304.
- Cavalier-Smith T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57 : 953—994.
- Cavalier-Smith. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46 : 347—366.
- Cavalier-Smith T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 : 297—354.
- Cavalier-Smith T. 2004. Only six kingdoms of life. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B—Biol. Sci.* 271 : 1251—1262.
- Cavalier-Smith T., Chao E. E. 1996. Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. *J. Mol. Evol.* 43 : 551—562.
- Chavez-Munguia B., Espinosa-Cantellano M., Castanon G., Martinez-Palomo A. 2000. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.* 31 : S165—S167.
- Cole N. B., Lippincott-Schwartz J. 1995. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 : 55—64.
- Conibear E., Stevens T. H. 1995. Vacuolar biogenesis in yeast — sorting out sorting Proteins *Cell.* 83 : 513—516.

- Cooke B. M., Lingelbach K., Bannister L. H., Tilley L. 2004. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol.* 20 : 581—589.
- Dacks J. B., Davis L. A. M., Sjogren A. M., Andersson J. O., Roger A. J., Doolittle W. F. 2003. Evidence for Golgi bodies in proposed «Golgi-lacking» lineages. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B—Biol. Sci.* 270 : S168—S171.
- Dacks J. B., Doolittle W. F. 2001. Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell.* 107 : 419—425.
- Dacks J. B., Doolittle W. F. 2002. Novel syntaxin gene sequences from *Giardia*, *Trypanosoma* and algae: implications for the ancient evolution of the eukaryotic endomembrane system. *J. Cell Sci.* 115 : 1635—1642.
- De Duve C. 1990. The primitive phagocyte. In: Nardon P., Gianiazzi-Pearson Y., Grenier A. M., Margulis L., Smith D. C. (Eds). *Endocytobiology IV*. Paris: Institut National de la Recherche Agonomique. 511—514.
- Descoteaux A., Luo Y., Turco S. J., Beverley S. M. 1995. A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science.* 269 : 1869—1872.
- Dubremetz J. F., Achbarou A., Bermudes D., Joiner K. A. 1993. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* host-cell interaction. *Parasitol. Res.* 79 : 402—408.
- Duden R., Griffiths G., Frank R., Argos P., Kreis T. E. 1991. Beta-Cop, a 110 Kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell.* 64 : 649—665.
- Duszenko M., Ivanov I. E., Ferguson M. A. J., Plesken H., Cross G. A. M. 1988. Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 106 : 77—86.
- Elmendorf H. G., Dawson S. C., McCaffery M. 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 33 : 3—28.
- Farquhar M., Palade G. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8 : 2—10.
- Fast N. M., Doolittle W. F. 1999. *Trichomonas vaginalis* possesses a gene encoding the essential spliceosomal component, PRP8. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99 : 275—278.
- Fast N. M., Roger A. J., Richardson C. A., Doolittle W. F. 1998. U2 and U6snRNA genes in the microsporidian *Nosema locustae*: evidence for a functional spliceosome. *Nucl. Acids Res.* 26 : 3202—3207.
- Fedorov A., Hartman H. 2004. What does the microsporidian *E. cuniculi* tell us about origin of the eukaryotic cell? *J. Mol. Evol.* 59 : 695—702.
- Felsenstein J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zool.* 27 : 401—410.
- Ferguson M. A. J., Duszenko M., Lamont G. S., Overath P., Cross G. A. M. 1986. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J. Biol. Chem.* 261 : 356—362.
- Fichera M. E., Roos D. S. 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature.* 390 : 407—409.
- 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.
- Foussard F., Leriche M. A., Dubremetz J. F. 1991. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology.* 102 : 367—370.
- Gaut J. R., Hendershot L. M., 1993. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 : 589—595.
- Germot A., Philippe H., LeGuyader H. 1996. Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 14 614—14 617.
- Germot A., Philippe H., LeGuyader H. 1997. Evidence for loss of mitochondrial in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87 : 159—168.
- Ghosh S. K., Field J., Frisardi M., Rosenthal B., Mai Z. M., Rogers R., Samuelson J. 1999. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infection and Immunity.* 67 : 3073—3081.
- Ghosh S., Field J., Rogers R., Hickman M., Samuelson J. 2000. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. *Infection and Immunity.* 68 : 4319—4322.
- Grunfelder C. G., Engstler M., Weise F., Schwarz H., Stierhof Y. D., Boshart M., Overath P. 2002. Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels. *Traffic.* 3 : 547—559.
- Hager K. M., Striepen B., Tilney L. G., Roos D. S. 1999. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 112 : 2631—2638.
- Hartman H., Fedorov A. 2002. The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 1420—1425.
- Hashimoto T., Nakamura Y., Nakamura F., Shirakura T., Adachi J., Goto N., Okamoto K., Hasegawa M. 1994. Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes: phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. *Mol. Biol. Evol.* 11 : 65—71.
- Hashimoto T., Sanchez L. B., Shirakura T., Muller M., Hasegawa M. 1998. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 6860—6865.
- Hayashi M., Taniguchi S., Ishizuka Y., Kim H. S., Wataya Y., Yamamoto A., Moriyama Y. 2001. A homologue of N-ethylmaleimide-sensitive factor in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is exported and localized in vesicular structures in the cytoplasm of infected erythrocytes in the brefeldin A-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* 276 : 15 249—15 255.
- He C. Y., Ho H. H., Malsam H., Chalouni C., West C. M., Ullu E., Toomre D., Warren G. 2004. Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 165 : 313—321.
- He C. Y., Shaw M. K., Pletcher C. H., Striepen B., Tilney L. G., Roos D. S. 2001. A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 20 : 330—339.
- Hehl A. B., Marti M., Kohler P. 2000. Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 1789—1800.
- Hoppe H. C., Joiner K. A. 2000. Cytoplasmic tail motifs mediate endoplasmic reticulum localization and export of transmembrane reporters in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Cell. Microbiol.* 2 : 569—578.
- Horazdovsky B. F., Dewald D. B., Emr S. D. 1995. Protein transport to the yeast vacuole. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 : 544—551.
- Hu K., Mann T., Striepen B., Beckers C. J. M., Roos D. S., Murray J. M. 2001. Daughter cell assembly in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell.* 12 : 143A.
- Itin C., Kappeler F., Linstedt A. D., Hauri H. P. 1995. A novel endocytosis signal related to the KKXX ER-retrieval signal. *EMBO J.* 14 : 2250—2256.
- Joiner K. A., Fuhrman S. A., Miettinen H. M., Kasper L. H., Mellman I. 1990. *Toxoplasma gondii* fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc-receptor transfected fibroblasts. *Science.* 249 : 641—646.
- Joiner K. A., Roos D. S. 2002. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J. Cell Biol.* 157 : 557—563.
- Kabnick K. S., Peattie D. A. 1991. *Giardia* — a missing link between Prokaryotes and Eukaryotes. *Amer. Scientist.* 79 : 34—43.
- Kahn R. A., Kern F. G., Clark J., Gelmann E. P., Rulka C. 1991. Human ADP ribosylation factors — a functionally conserved family of Gtp-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266 : 2606—2614.
- Karsten V., Qi H. L., Beckers C. J. M., Reddy A., Dubremetz J. F., Webster P., Joiner K. A. 1998. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* targets proteins to dense granules and the vacuolar space using both conserved and unusual mechanisms. *J. Cell Biol.* 141 : 1323—1333.

- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thoma-
rat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Winc-
ker 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.
- Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J. D. 2000. Evidence from
beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the
fungi. *Biol. Evol.* 17 : 23—31.
- Klemba M., Beatty W., Gluzman I., Goldberg D. E. 2004. Traf-
ficking of plasmepsin II to the food vacuole of the malaria parasite
Plasmodium falciparum. *J. Cell Biol.* 164 : 47—56.
- Klumperman J. 2000. Transport between ER and Golgi. *Curr.*
Opin. Cell Biol. 12 : 445—449.
- Kohler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webs-
ter P., Wilson R. J. M., Palmer J. D., Roos D. S. 1997. A plastid of
probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science*.
275 : 1485—1489.
- Ktistakis N. T., Brown H. A., Sternweis P. C., Roth M. G.
1995. Phospholipase-D is present on Golgi-enriched membranes
and its activation by ADP-ribosylation factor is sensitive to Brefel-
din-A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 4952—4956.
- Lauer S. A., Rathod P. K., Ghori N., Haldar K. 1997. A mem-
brane network for nutrient import in red cells infected with the ma-
laria parasite. *Science*. 276 : 1122—1125.
- Levine N. D., Corliss J. O., Cox F. E. G., Deroux G., Grain J.,
Honigberg B. M., Leedale G. F., Loeblich A. R., Lom J., Lynn D.,
Merinfeld E. G., Page F. C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J.,
Wallace F. G. 1980. A newly revised classification of the Protozoa.
J. Protozool. 27 : 37—58.
- Liendo A., Stedman T. T., Ngo H. M., Chaturvedi S., Hop-
pe H. C., Joiner K. A. 2001. *Toxoplasma gondii* ADP-ribosylation
factor 1 mediates enhanced release of constitutively secreted dense
granule proteins. *J. Biol. Chem.* 276 : 18 272—18 281.
- Lippincott-Schwartz J., Zaal K. J. 2000. Cell cycle mainten-
ance and biogenesis of the Golgi complex. *Histochem. Cell Biol.*
114 : 93—103.
- Lujan H. D., Marotta A., Mowatt M. R., Sciaky N., Lippin-
cott-Schwartz J., Nash T. E. 1995a. Developmental induction of
Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Giardia*
lamblia. *J. Biol. Chem.* 270 : 4612—4618.
- Lujan H. D., Mowatt M. R., Chen G. Z., Nash T. E. 1995b.
Isoprenylation of proteins in the protozoan *Giardia lamblia*. *Mol.*
Biochem. Parasitol. 72 : 121—127.
- Lujan H. D., Mowatt M. R., Wu J. J., Lu Y., Lees A., Chan-
ce M. R., Nash T. E. 1995c. Purification of a variant-specific surfa-
ce protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-bin-
ding properties. *J. Biol. Chem.* 270 : 13 807—13 813.
- Lujan H. D., Touz M. C. 2003. Protein trafficking in *Giardia*
lamblia. *Cell. Microbiol.* 5 : 427—434.
- Mallabiarrena A., Jimenez M. A., Rico M., Alarcon B. 1995.
A tyrosine-containing motif mediates ER retention of Cd3-epsilon
and adopts a helix-turn structure. *EMBO J.* 14 : 2257—2268.
- Manning-Cela R., Marquez C., Franco E., Talamas-Roha-
na P., Meza I. 2003. BFA-sensitive and insensitive exocytic path-
ways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their relationship to
pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5 : 921—932.
- Marti M., Lit Y. J., Schraner E. M., Wild P., Kohler P.,
Hehl A. B. 2003a. The secretory apparatus of an ancient eukaryote:
protein sorting to separate export pathways occurs before formation of
transient Golgi-like compartments. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 1433—1447.
- Marti M., Regos A., Li Y. J., Schraner E. M., Wild P., Mul-
ler N., Knopf L. G., Hehl A. B. 2003b. An ancestral secretory appa-
ratus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.*
278 : 24 837—24 848.
- McConville M. J., Ilgoutz S. C., Teasdale R. D., Foth B. J.,
Matthews A., Mullin K. A., Gleeson P. A. 2002a. Targeting of the
GRIP domain to the trans-Golgi network is conserved from protists
to animals. *Eur. J. Cell Biol.* 81 : 485—495.
- McConville M. J., Mullin K. A., Ilgoutz S. C., Teasdale R. D.
2002b. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol.*
Mol. Biol. Rev. 66 : 122—154.
- Meissner M., Reiss M., Viebig N., Carruthers V. B., Tour-
sel C., Tomavo S., Ajioka J. W., Soldati D. 2002. A family of trans-
membrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain
EGF-like domains and function as escorts. *J. Cell Sci.* 115 :
563—574.
- Mironov A. A., Beznoussenko G. V., Polishchuk R. S., Truc-
co A. 2005. Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Bio-
chim. biophys. acta.* 1744 : 340—350.
- Mollenhauer H. H., Morre D. J., Rowe L. D. 1990. Alteration
of intracellular traffic by monensin — mechanism, specificity and
relationship to toxicity. *Biochim. biophys. acta.* 1031 : 225—246.
- Mordue D. G., Hakansson S., Niesman I., Sibley L. D. 1990.
Toxoplasma gondii resides in a vacuole that avoids fusion with host
cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp. Pa-
rasitol.* 82 : 87—99.
- Mostov K. E., Verges M., Altschuler Y. 2000. Membrane traffic
in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 483—490.
- Ohashi M., Devries K. J., Frank R., Snoek G., Bankaitis V.,
Wirtz K., Huttner W. B. 1995. A role for phosphatidylinositol trans-
fer protein in secretory vesicle formation. *Nature.* 377 : 544—547.
- Olliaro P., Castelli F. 1997. *Plasmodium falciparum*: an elec-
tronmicroscopy study of caveolae and trafficking between the para-
site and the extracellular medium. *Int. J. Parasitol.* 27 : 1007—
1012.
- Overath P., Engstler M. 2004. Endocytosis, membrane recy-
cling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a
model system. *Mol. Microbiol.* 53 : 735—744.
- Parodi A. J. 1993. N-glycosylation in trypanosomatid Proto-
zoa. *Glycobiology.* 3 : 193—199.
- Patterson D. J. 1994. Protozoa: evolution and systematics. In:
Haussman K., Hulsman N. (eds). *Progress in protozoology.* Proc.
9th Int. Congr. Protozool. Stuttgart: Fischer Verlag. 1—14.
- Pelham H. R. B. 1995. Sorting and retrieval between the en-
doplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 :
530—535.
- Pelletier L., Stern C. A., Pypaert M., Sheff D., Ngo H. M., Ro-
per N., He C. Y., Hu K., Toomre D., Coppens I., Roos D. S., Joi-
ner K. A., Warren G. 2002. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*.
Nature. 418 : 548—552.
- Philippe H., Lopez P., Brinkmann H., Budin K., Germot A.,
Laurent J., Moreira D., Muller M., Le Guyader H. 2000. Early-
branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on
slowly evolving positions. *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B — Biol.*
Sci. 267 : 1213—1221.
- Plattner H. 1993. Membrane traffic in Protozoa. *Adv. Cell.*
Mol. Biol. Membr. 2.
- Rambourg A., Clermont Y., Hermo L., Segretain D. 1987. Tri-
dimensional structure of the Golgi apparatus of nonciliated epitheli-
al cells of the *ductuli efferentes* in rat — an electron microscope ste-
reoscopic study. *Biol. Cell.* 60 : 103—116.
- Ribeiro K. C., Monteiro-Leal L. H., Benchimol M. 2000. Con-
tributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists
Tritrichomonas foetus and *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot.*
Microbiol. 47 : 481—492.
- Richards T. A., Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolu-
tion and the primary divergence of eukaryotes. *Nature.* 436 :
1113—1118.
- Roos D. S., Crawford M. J., Donald R. G. K., Kissinger J. C.,
Klimczak L. J., Striepen B. 1999. Origin, targeting, and function of
the apicomplexan plastid. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 : 426—
432.
- Roos D. S., Donald R. G. K., Morrissette N. S., Moul-
ton A. L. C. 1994. Molecular tools for genetic dissection of the pro-
tozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell Biol.* 45 : 27—63.
- Rothblatt J., Novick P., Stevens T. H. 1994. Guidebook to the
secretory pathway. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Rubotham J., Woods K., Garcia-Salcedo J. A., Pays E., No-
lan D. P. 2005. Characterization of two protein disulfide isomera-
ses from the endocytic pathway of bloodstream forms of *Trypano-
soma brucei*. *J. Biol. Chem.* 280 : 10 410—10 418.
- Ryan K. A., Garraway L. A., Descoteaux A., Turco S. J., Be-
verley S. M. 1993. Isolation of virulence genes directing surface

- Glycosyl-phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90 : 8609—8613.
- Salama N. R., Schekman R. W. 1995. The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 536—543.
- Schekman R. 1994. Translocation gets a push. Cell. 78 : 911—913.
- Seemann J., Pypaert M., Taguchi T., Malsam J., Warren G. 2002. Partitioning of the matrix fraction of the Golgi apparatus during mitosis in animal cells. Science. 295 : 848—851.
- Serafini T., Stenbeck G., Brecht A., Lottspeich F., Orci L., Rothman L. E., Wieland F. T. 1991. A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. Nature. 349 : 214—220.
- Shaw M. K., Roos D. S., Tilney L. G. 1998. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 117 : 435—443.
- Sibley L. D., Weidner E., Krahenbuhl J. L. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature. 315 : 416—419.
- Simon S. 1993. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. Curr. Opin. Cell Biol. 5 : 581—588.
- Snigirevskaya E. S. 1969. Electron microscopic study of the schizogony process in *Eimeria intestinalis*. Acta protozool. 7 : 57—70.
- Sogin M. L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. Curr. Opin. Gen. Develop. 1 : 457—463.
- Sogin M. L., Gunderson J. H., Elwood H. J., Alonso R. A., Peattie D. A. 1989. Phylogenetic meaning of the Kingdom concept — an unusual ribosomal-RNA from *Giardia lamblia*. Science. 243 : 75—77.
- Sogin M. L., Silberman J. D. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. Int. J. Parasitol. 28 : 11—20.
- Sokolova Y., Snigirevskaya E., Morzhina E., Skarlato S., Mironov A., Komissarchik Y. 2001. Visualization of early Golgi compartments at proliferate and sporogonic stages of a microsporidian *Nosema grylli*. J. Eukaryot. Microbiol. 86S—87S.
- Soldati D., Lassen A., Dubremetz J. F., Boothroyd J. C. 1998. Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. Mol. Biochem. Parasitol. 96 : 37—48.
- Sollner T., Whitehart S. W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P., Rothman J. E. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature. 362 : 318—324.
- Stammes M. A., Rothman J. E. 1993. The binding of Ap-1 clathrin adapter particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. Cell. 73 : 999—1005.
- Stechmann A., Cavalier-Smith T. 2003. Phylogenetic analysis of eukaryotes using heat-shock protein Hsp90. J. Mol. Evol. 57 : 408—419.
- Stedman T. T., Sussmann A. R., Joiner K. A. 2003. *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex. J. Biol. Chem. 278 : 5433—5443.
- Stokkermans T. J. W., Schwartzman J. D., Keenan K., Morrisette N. S., Tilney L. G., Roos D. S. 1996. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. Exp. Parasitol. 84 : 355—370.
- Striepen B., Soldati D., Garcia-Reguet N., Dubremetz J. F., Roos D. S. 2001. Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 113 : 45—53.
- Striepen B., White M. W., Li C., Guerini M. N., Malik S. B., Logsdon J. M., Liu C., Abrahamsen M. S. 2002. Genetic complementation in apicomplexan parasites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 6304—6309.
- Tabe L., Krieg P., Strachan R., Jackson D., Wallis E., Colman A. 1984. Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes — identification of an ovalbumin signal sequence. J. Mol. Biol. 180 : 645—666.
- Taraschit T. F., O'Donnell M., Martinez S., Schneider T., Trelka D., Fowler V. M., Tilley L., Moriyama Y. 2003. Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. Blood. 102 : 3420—3426.
- Taraschit T. F., Trelka D., Martinez S., Schneider T., O'Donnell M. E. 2001. Vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. Int. J. Parasitol. 31 : 1381—1391.
- Tovar J., Leon-Avila G., Sanchez L. B., Sutak R., Tachezy J., van der Giezen M., Hernandez M., Muller M., Lucocq J. M. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature. 426 : 172—176.
- Traub L. M., Ostrom J. A., Kornfeld S. 1993. Biochemical dissection of Ap-1 recruitment onto Golgi membranes. J. Cell Biol. 123 : 561—573.
- Van Meer G. 1989. Lipid traffic in animal cells. Ann. Rev. Cell. Biol. 5 : 247—275.
- Van Vilet C., Thonas E. C., Merino-Trigo A., Teasdale R. D., Gleeson P. A. 2003. Intracellular sorting and transport of proteins. Prog. Biophys. Mol. 82 : 1—45.
- Vossbrinck C. R., Maddox J. V., Friedman S., Debrunnervossbrinck B. A., Woese C. R. 1987. Ribosomal-RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature. 326 : 411—414.
- Vossbrinck C. R., Woese C. R. 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8s RNA. Nature. 320 : 287—288.
- Waller R. F., Keeling P. J., Donald R. G. K., Striepen B., Handman E., Lang-Unnasch N., Cowman A. F., Besra G. S., Roos D. S., McFadden G. I. 1998. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 12 352—12 357.
- Waller R. F., Reed M. B., Cowman A. F., McFadden G. I. 2000. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. EMBO J. 19 : 1794—1802.
- Weise F., Stierhof Y. D., Kuhn C., Wiese M., Overath P. 2000. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. J. Cell Sci. 113 : 4587—4603.
- Williams B. A. P., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. Nature. 418 : 865—869.
- Woese C. R., Fox G. E. 1977. Concept of cellular evolution. J. Mol. Evol. 10 : 1—6.
- Yung S., Unnasch T. R., Lang-Unnasch N. 2001. Analysis of apicoplast targeting and transit peptide processing in *Toxoplasma gondii* by deletional and insertional mutagenesis. Mol. Biochem. Parasitol. 118 : 11—21.

GOLGI APPARATUS IN PARASITIC PROTISTS (REVIEW OF THE LITERATURE)

Yu. Ya. Sokolova, E. S. Snigirevskaya, Ya. Yu. Komissarchik

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: vykomis@mail.cytspb.rssi.ru

This review summarizes modern data on Golgi apparatus of parasitic protists and demonstrates how the parasitic lifestyle determines functional and structural peculiarities of secretory systems in unrelated groups of unicellular parasites, in comparison to ones of «model systems», mammalian and yeast cells. The review covers the most well-studied protists, predominantly of high medical importance, belonging to following taxons: Parabasalia (*Trichomonas*), Diplomonada (*Giardia*), Entamoebidae (*Entamoeba*), parasitic Alveolata of the phylum Apicomplexa (*Toxoplasma* and *Plasmodium*), and Kinetoplastida (*Trypanosoma* and *Leishmania*). Numerous recent publications demonstrated that studies on intracellular traffic in the mentioned above parasites essentially advanced our knowledge of Golgi function, traditionally based on research of cultured mammalian and yeast cells. Morphology of Golgi organelle in eukaryotes from various taxonomic groups has been compared. Within three of total six the highest taxons of Eukaryota (Adl et al., 2005) there exist at minimum eight groups represented by species lacking Golgi dictyosomes. However, biochemical and (or) molecular (genomic) evidences indicate that the organelle with functions of Golgi was present in every studied so far lineage of eukaryotes. Loss of Golgi organelle is a secondary event, which has been proven by identification of Golgi genes in the genomes of Golgi-lacking lineages. This loss might have occurred independently several times in the course of evolution. Neither the number of stacks, nor the size of the organelle correlates with intensity of secretion, or the position of the species on the evolutionary tree (in terms of presumably early/late diverged lineages).
