

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРОСПОРИДИЙ С ЗАРАЖЕННОЙ КЛЕТКОЙ ХОЗЯИНА

© С. А. Тимофеев,^{1,*} Ю. С. Токарев,¹ А. В. Симакова,²
А. А. Царев,¹ В. В. Долгих¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург—Пушкин, 196608,

и ²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050;
* электронный адрес: ts-bio@yandex.ru

Микроспоридии — группа облигатных внутриклеточных эукариотических паразитов, родственных грибам и освоивших чрезвычайно широкий круг хозяев: от протистов до млекопитающих. В процессе адаптации к внутриклеточному паразитизму геном и функциональный аппарат данных организмов подверглись значительной редукции и модификации, что обуславливает крайнюю степень зависимости микроспоридий от клетки хозяина, а также сложный и разнообразный характер отношений паразит—хозяин. В настоящем обзоре обобщены полученные авторами оригинальные результаты и данные из литературы последних лет о взаимоотношениях микроспоридий с животными-хозяевами на клеточном уровне. Воздействия, оказываемые данными патогенами на зараженные клетки, включают в себя индукцию их гипертрофии, перестройку и модификацию цитоскелета и системы везикулярного транспорта. Кроме того, микроспоридии способны стимулировать обменные процессы в зараженных клетках и подавлять их защитные реакции. Основным инструментом прямого регулирующего воздействия микроспоридий на клетку хозяина предположительно является секреция паразитом особых белковых молекул-эффекторов, способных вмешиваться в регуляторные пути и сигнальные каскады клетки хозяина.

Ключевые слова: микроспоридии, внутриклеточные паразиты, паразито-хозяинные отношения, метаболизм, цитоскелет, апоптоз.

Принятые сокращения: ПВ — паразитофорная вакуоль.

Микроспоридии (тип Microsporidia) — облигатные внутриклеточные паразиты билатеральных животных практически всех систематических групп, а также некоторых одноклеточных эукариот (протистов). Описано около 1400 видов и 200 родов (Vavra, Larsson, 2014); 15 видов могут заражать человека, вызывая летальные заболевания у пациентов с ослабленным иммунитетом. Чаще всего наблюдается кишечная форма микроспориоза, однако данные патогены могут поражать практически любые органы человека (глаза, легкие, мышцы, органы нервной системы) или вызывать диссеминированную инфекцию (Тимофеев, 2015).

Единственной стадией жизненного цикла микроспоридий, способной существовать вне клетки хозяина, являются микроскопические споры (длиной 2—7 мкм), имеющие уникальное строение (рис. 1). В споре под слоями защитных оболочек (хитиновой и гликопротеиновой) находится зародыш (спороплазма) и сложно организованный аппарат экстрюзии, осуществляющий внедрение инвазионного начала в клетку хозяина. Характерной чертой спор микроспоридий служит спирально уложенная под оболочкой полярная трубка. При экстрюзии споры полярная трубка выбрасывается наружу и пробивает мембрану инфицируемой клетки. По каналу этой органеллы в клетку хозяина вбрасывается спороплазма. После внедрения

происходит рост и дифференцировка зародыша, после чего клетка паразита превращается в меронт — пролиферативную стадию, которая размножается бинарным или множественным делением. Затем микроспоридии приступают к спорогонии. Ядра споронтов претерпевают от одного до нескольких делений, в результате чего образуются спорогональные плазмодии, дающие начало споробластам, из которых формируются споры. Обычно на этом этапе происходит разрушение зараженной клетки хозяина, высвободившиеся из разрушенных клеток споры заражают другие клетки того же организма или выводятся наружу для заражения других особей (Исси, Воронин, 2007).

В настоящем обзоре обобщены полученные авторами оригинальные результаты и данные из литературы последних лет о взаимоотношениях микроспоридий с животными-хозяевами на клеточном уровне.

Локализация в клетке хозяина

Большинство микроспоридий развивается в прямом контакте с цитоплазмой зараженной клетки без образования паразитофорной вакуоли (ПВ) (Исси, Воронин, 2007). При наличии таковой она может иметь различную

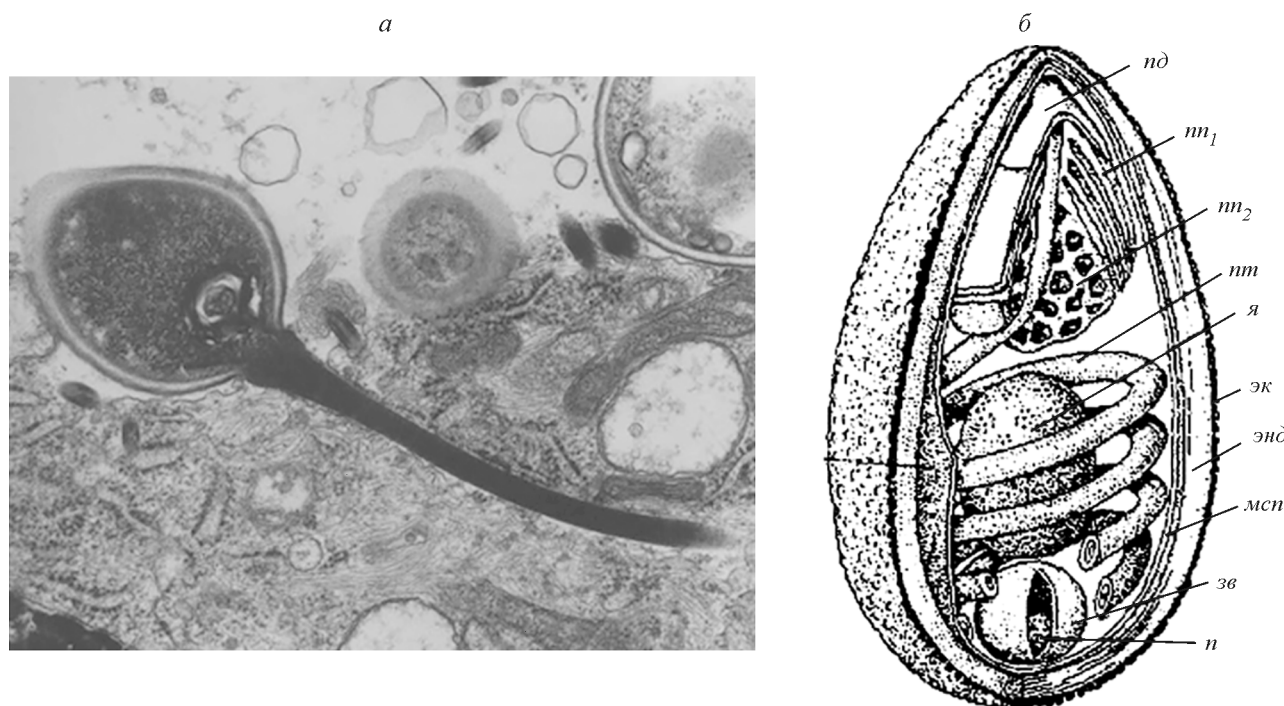


Рис. 1. Морфология спор микроспоридий.

а — электронная микрофотография споры с выброшенной полярной трубкой, внедренной в эукариотическую клетку (изображение с сайта центров по контролю и профилактике заболеваний США; <http://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/gallery.html>). б — схема строения споры микроспоридий: зв — задняя вакуоль, мсп — цитоплазматическая мембрана, п — постеросома, нд — полярный диск, nt — полярная трубка, nt₁, nt₂ — соответственно передняя пластинчатая и задняя мелкокамерная части полярнопласта, эк — экоспора, энд — эндоспора, я — ядро зародыша (спороплазмы). Рис. 1, б из: Исси, Воронин, 2007; публикуется с любезного разрешения авторов.

природу. Один из способов морфогенеза ПВ связан с цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума клетки хозяина. Микроспоридии могут развиваться в цистернах, сохраняющих связь со всей ретикулярной системой или же замыкающихся полностью и образующих ПВ (рис. 2) (Tokarev et al., 2012). Для микроспоридии *Crispospora chironomi*, заражающей энтероциты личинок

комара *Chironomus plumosus*, показано участие в формировании ПВ аппарата Гольджи клетки хозяина (Issi et al., 2012). По всей видимости, в образовании ПВ может участвовать и цитоплазматическая мембрана зараженной клетки. Для паразита человека *Encephalitozoon cuniculi* предложена уникальная модель внедрения в клетку хозяина, при которой полярная трубка микроспоридии

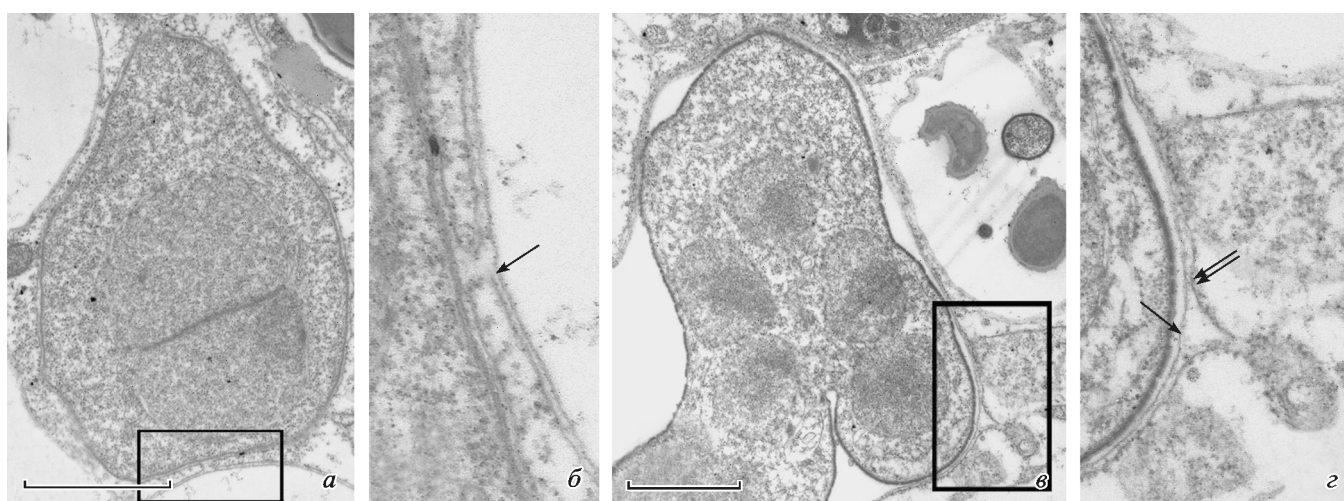


Рис. 2. Формирование паразитофорной вакуоли (ПВ) вокруг деспоровых стадий развития *Helminchia lacustris* в адипоцитах *Chironomus plumosus*.

а — переходная от меронта к споронту стадия. б — увеличенный фрагмент рис. 2, а (выделен прямоугольником), стрелка указывает на дополнительную мембранную оболочку, инкрустированную рибосомами, окружающую клетку паразита. в — спорогональный плазмодий. г — увеличенный фрагмент рис. 2, в (выделен прямоугольником), стрелка указывает на гладкую мембрану спорофорного пузырька, двойная стрелка — на мембрану гранулярной эндоплазматической сети клетки хозяина, образующей ПВ. Масштабные отрезки — 1.92 мкм. По: Tokarev et al., 2012, с изменениями.

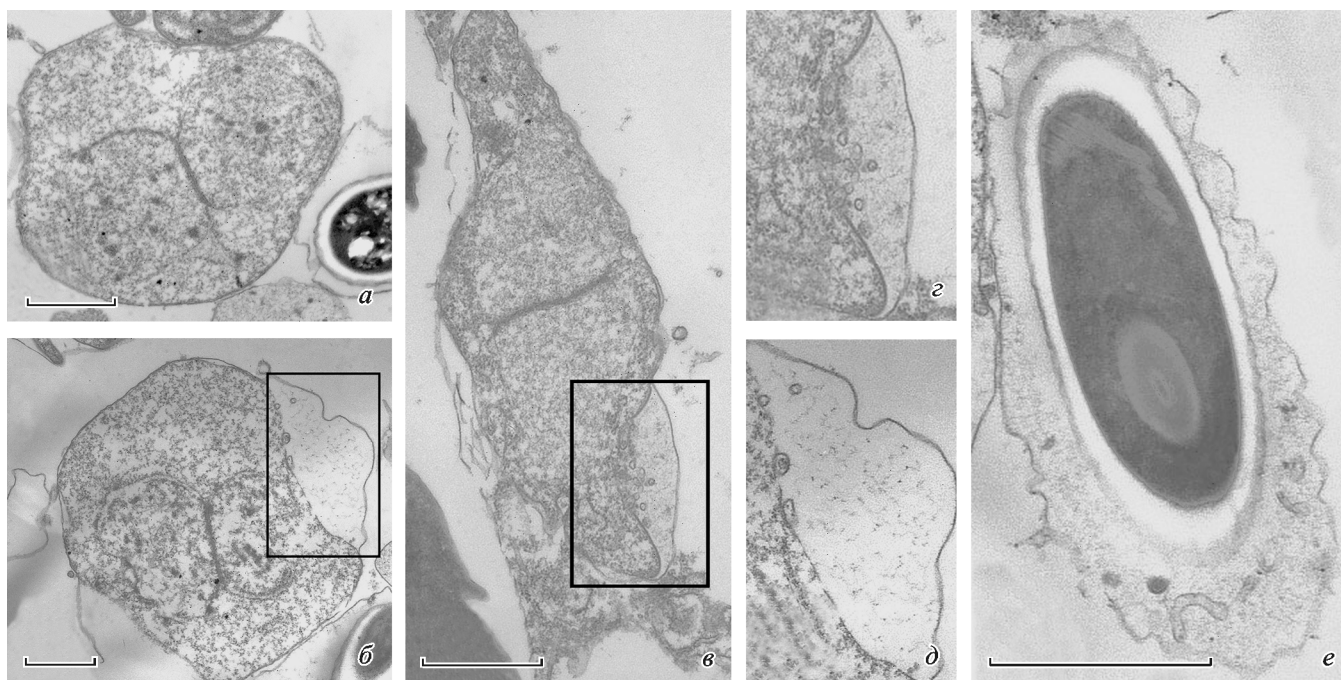


Рис. 3. Образование спорофорного пузырька у *Mrazekia macrocyclopis*.

a — переходная стадия от меронта к споронту; *b* — споронт; *v* — споробласт; *z, d* — увеличенные фрагменты рис. *v, b* соответственно, показывающие отслоение дополнительной мембраны; *e* — спора в полностью сформированном спорофорном пузырьке. Масштабные отрезки — 1.92 мкм. По: Issi et al., 2012 с изменениями.

не пробивает цитоплазматическую мембрану, а образует в ней инвагинацию, которая затем замыкается в вакуоль, содержащую спороплазму паразита (Bohne et al., 2011).

На первый взгляд ПВ представляется дополнительным барьером для транспорта метаболитов из клетки хозяина. Однако, как показано на примере *E. cuniculi*, мембрана ПВ содержит многочисленные поры, способные пропускать вещества с мол. массой 3—10 кДа. Это позволяет свободно диффундировать из цитоплазмы в пространство ПВ нуклеотидам, углеводам, аминокислотам и другим веществам, жизненно необходимым микроспоридиям (Bohne et al., 2011).

При формировании спор некоторые виды микроспоридий могут самостоятельно формировать дополнительную оболочку вокруг своих клеток — спорофорный пузырек. Типичный способ образования спорофорного пузырька заключается в постепенном отслоении дополнительной мембраны (по-видимому, образующейся путем мембраногенеза de novo) на отдельных участках поверхности транзитной стадии микроспоридий (рис. 3), в результате чего спорофорный пузырек содержит споронт и в дальнейшем — его потомство (споробласты). По нашему мнению, спорофорный пузырек представляет собой адаптацию, обеспечивающую передачу предполагаемому хозяину не одной, а нескольких спор для повышения вероятности его заражения. Не случайно у многих микроспоридий из хозяев, обитающих в водной среде, спорофорные пузырьки содержат десятки и сотни спор (Canning, Vavra, 2000).

На протяжении внутриклеточного развития микроспоридии могут образовывать ассоциации с различными органеллами клетки хозяина. Представители рода *Chytridiopsis* развиваются в инвагинации внешней ядерной оболочки зараженной клетки. Подобный тесный контакт с

ядром также часто наблюдается у *Enterocytozoon bienersi*. Микроспоридии рода *Enterospora*, а также паразит лосося *Nucleospora salmonis* обнаружены непосредственно в ядрах клеток хозяина (Vavra, Larsson, 2014). Кроме того, для многих видов микроспоридий показана тесная связь с митохондриями зараженных клеток (подробнее см. раздел «Взаимодействие с системой энергетического метаболизма клетки хозяина»).

Гипертрофия зараженных клеток и образование «ксеном»

Типичным проявлением микроспоридиоза является гипертрофическое разрастание инфицированных клеток и их ядер. Наибольшего развития этот процесс достигает у микроспоридий рыб и некоторых членистоногих, которые могут вызывать трансформацию зараженных клеток в «ксеномы» — цисто-подобные структуры, в сотни и тысячи раз превосходящие по объему незараженные клетки (Williams, 2009). Разные виды микроспоридий могут формировать ксеномы различных размеров и строения, вызывать гипертрофию ядра клетки хозяина или его многократное деление. Например, в ксеномах, образуемых *Glugea anomala* у колюшковых рыб, можно обнаружить сотни ядер хозяина и миллионы спор паразита (Vavra, Larsson, 2014). Механизм образования данных структур неизвестен. Так как оболочка ксеномы полностью изолирует очаг инфекции от других клеток и органов хозяина, их формирование может быть полезно как паразиту (защита от иммунного ответа хозяина), так и хозяину (концентрация микроспоридий в одном месте, препятствие их диссеминации по всему организму) (Rodriguez-Tovar et al., 2011).

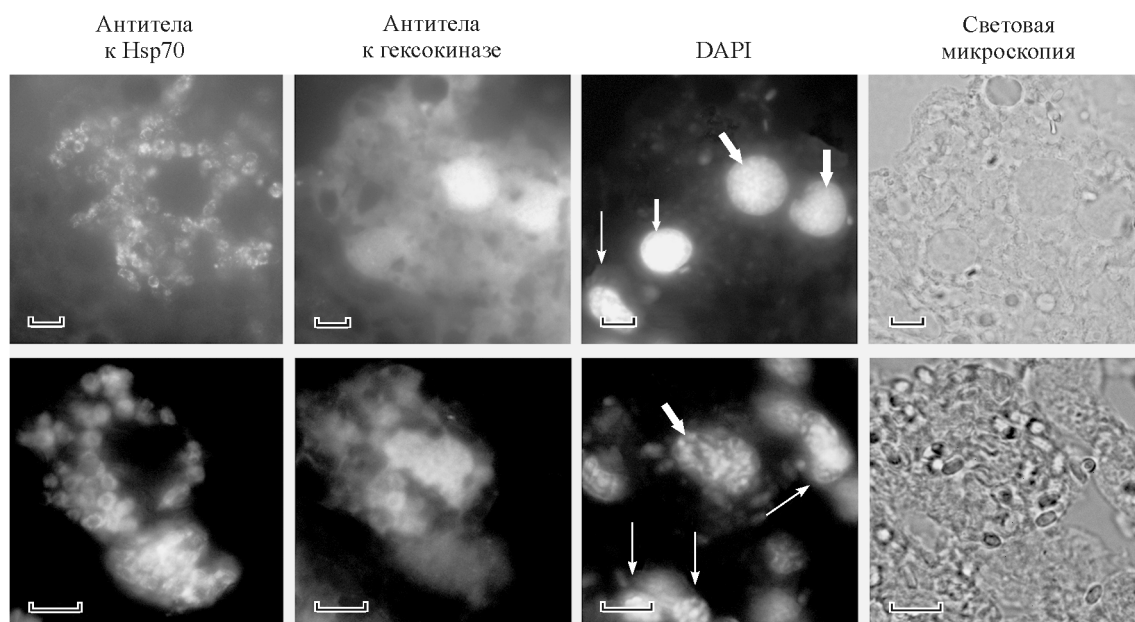


Рис. 4. Иммунолокализация гексокиназы *Paranosema locustae* в клетках зараженного жирового тела саранчи *Locusta migratoria*.

Накопление паразитического фермента в ядрах зараженных клеток было доказано с помощью анализа замороженных 10-микрометровых срезов зараженной ткани с использованием иммунофлуоресцентной и конфокальной микроскопии. Толстыми стрелками обозначены ядра в зоне инвазии, средней толщины стрелкой — ядро на границе зоны инвазии, тонкая стрелка указывает на ядро вне зоны инвазии *P. locustae*. Клетки микроспоридий визуализированы с помощью антител против белка теплового шока Hsp70 *P. locustae*. Масштабные отрезки — 5 мкм. По: Senderskiy et al., 2014, с изменениями.

Взаимодействие с системой энергетического метаболизма клетки хозяина

В процессе адаптации к внутриклеточному паразитизму микроспоридиями были утрачены многие элементы метаболической системы, пути синтеза жизненно необходимых соединений — нуклеотидов, аминокислот. У всех видов микроспоридий (за исключением одного) митохондрии редуцированы до крохотных двухмембранных структур — митосом, утративших собственный геном и способность к окислительному фосфорилированию (Долгих и др., 2011; Naag et al., 2014). Исключением является обнаруженный в 2014 г. представитель анцестральных микроспоридий *Mitosporidium daphniae* (занимающий базальное положение на филогенетическом дереве по отношению ко всем остальным представителям типа Microsporidia) (Naag et al., 2014). Наиболее ярким примером редукции функционального аппарата у микроспоридий можно служить вид *Encephalitozoon intestinalis*, геном которого сопоставим по размеру с геномом бактерий (около 2.3 млн пар нуклеотидов) и содержит менее 2000 генов, утратив большинство путей синтеза аминокислот, нуклеотидов и других важных соединений (Keeling et al., 2014).

Подобные особенности делают микроспоридий чрезвычайно зависимыми от субстратов клетки хозяина. У данных паразитов обнаружен целый ряд переносчиков, функционирующих на цитоплазматической мембране клеток деспоровых стадий внутриклеточного развития и способных поглощать из цитоплазмы зараженной клетки ионы металлов, полиамины, аминокислоты, сахара и многие другие соединения (Williams, 2009; Williams et al., 2014). Особый интерес представляют уникальные переносчики нуклеотидов. В настоящее время микроспори-

дии являются единственной среди всех эукариот группой паразитов, для которых была показана способность транспортировать АТФ напрямую из цитоплазмы клетки хозяина. Гены, кодирующие транспортеры, ответственные за это, по всей видимости, были приобретены микроспоридиями за счет горизонтального переноса генов от бактерий (Tsaousis et al., 2008; Долгих и др., 2011). В 2013 г. последовательности, кодирующие переносчики подобного типа, были также обнаружены в геноме внутриклеточного паразита хитридиевых грибов *Rozella allostercus* (данный вид относится к сестринской микроспоридиям группе Cryptomycota), однако способность кодируемых ими белков к транспорту АТФ из цитоплазмы клетки хозяина еще не подтверждена экспериментально (James et al., 2013).

Имея возможность напрямую поглощать АТФ из цитоплазмы зараженной клетки, микроспоридии модулируют клетку хозяина для максимизации данного процесса. Для многих видов микроспоридий показаны модификация и концентрация митохондрий клетки хозяина вокруг развивающегося патогена. Например, у микроспоридии *Senoma globulifera* (Simakova et al., 2005) можно наблюдать многочисленные митохондрии клетки хозяина (число которых увеличивается в зараженных клетках по сравнению с незараженными), образующие плотный слой вокруг внутриклеточных стадий развития паразита. Кроме того, можно увидеть соприкосновение участков мембран клеток микроспоридий и митохондрий хозяина, сопровождающееся характерным изменением формы последних, а именно образованием выпячиваний на поверхности митохондрий в зоне соприкосновения. Взаимодействие с митохондриями зараженной клетки продемонстрировано и для микроспоридий, развивающихся в ПВ, например для *Encephalitozoon cuniculi*. В этом случае митохондрии клетки хозяина образуют монослой вокруг

ПВ паразита, прикрепляясь к последней за счет электроно-плотных структур, вероятно имеющих белковую природу. При этом авторам данного исследования удалось показать концентрацию на прилегающей к ПВ паразита поверхности митохондрии порина VDAC, через который во внешнюю среду транспортируется АТФ, генерированный в данной органелле (Hacker et al., 2014). Таким образом, за счет концентрации и модификации митохондрией микроспоридии увеличивают количество поглощаемого АТФ хозяина, что способствует интенсификации развития и размножения паразитов.

Микроспоридии, по-видимому, способны также напрямую стимулировать систему энергетического метаболизма зараженной клетки для увеличения продукции доступного АТФ. Для *Paranosema locustae* мы продемонстрировали секрецию в цитоплазму пораженных клеток жирового тела саранчи *Locusta migratoria* метаболических ферментов — трегалазы и гексокиназы, катализирующих соответственно разложение трегалозы (одного из основных запасных веществ клеток жирового тела) до глюкозы и фосфорилирование последней (первая реакция гликолиза). Интересно, что гексокиназа микроспоридии была обнаружена нами в ядрах клеток хозяина (рис. 4). У дрожжей этот фермент играет двойную роль и помимо участия в гликолизе также может транспортироваться в ядро, участвуя в регуляции экспрессии генов метаболизма углеводов (Pelaez et al., 2009). Вполне вероятно, что и в случае микроспоридий гексокиназа взаимодействует с метаболической системой хозяина не только напрямую, но и на уровне транскрипции генов (Senderskiy et al., 2014).

Эксплуатация системы везикулярного транспорта и цитоскелета клетки хозяина

Для подавляющего большинства видов микроспоридий выход спор паразита из зараженной клетки хозяина сопряжен с ее разрушением (Исси, Воронин, 2007). Однако микроспоридии, паразитирующие в организмах, имеющих малое число клеток и неспособных к регенерации, по-видимому, выработали адаптацию к максимально эффективной продукции спор и приобрели способность выводить инвазионное начало из клеток хозяина без разрушения последних. Ярким примером является микроспоридия *Nematocida parisii*, поражающая клетки кишечного эпителия нематоды *Caenorhabditis elegans*. Число клеток у *N. parisii* и их состав строго детерминированы, покров кишечника образован всего 20 клетками, при этом источник возобновления в случае их гибели отсутствует (Szumowski et al., 2016). Было показано, что *N. parisii* рекрутирует систему везикулярного транспорта клетки хозяина для вывода спор в просвет кишечника с помощью экзоцитоза. Для этого процесса паразит активно перестраивает цитоскелет зараженной клетки. Апикальная поверхность энтероцитов *C. elegans* несет многочисленные микроворсинки, которые в основании укреплены мощным цитоскелетным образованием, так называемой терминальной сетью. Эта структура образована актином особого типа (ACT-5), а также различными формами промежуточных филаментов. *N. parisii* индуцирует релокализацию ACT-5 на базолатеральную часть клетки хозяина, что вызывает разрывы в его терминальной цепи, позволяя везикулам со спорами свободно достигать апикальной поверхности энтероцита (Szumowski et al., 2012).

Кроме того, показано, что ACT-5 покрывает некоторые везикулы со спорами паразита, облегчая их слияние с апикальной мембраной клетки хозяина и ускоряя процесс вывода спор в просвет кишечника. Вдобавок данный покров облегчает рециркуляризацию мембран клетки хозяина с помощью экзоцитоза (Szumowski et al., 2016). Ключевую роль в регуляции перестроек цитоскелета и стимуляции везикулярного транспорта играют сигнальные молекулы хозяина — малые ГТФазы Rho. Например, работа ГТФазы RAB-11 необходима для формирования вakuолей вокруг спор паразита, их транспорта и слияния с апикальной мембраной зараженной клетки (Szumowski et al., 2014). Вполне возможно, что, взаимодействуя именно с этими молекулами, *N. parisii* модулирует клетку хозяина для обеспечения непрерывного вывода спор во внешнюю среду.

Взаимодействие с защитными системами клетки хозяина

Одним из клеточных механизмов защиты животных от заражения микроспоридиями является оксидативный стресс. Микроспоридия *Encephalitozoon cuniculi* может инфицировать макрофаги млекопитающих и таким образом распространяться по всему телу хозяина. Однако активация данных клеток интерфероном гамма приводит к продукции в них реактивных форм кислорода и азота, что в свою очередь приводит к элиминации патогена (Didier et al., 2010). По всей видимости, микроспоридии способны подавлять эту защитную реакцию хозяина. Анализ транскриптома культуры фибробластов человека, инфицированных микроспоридией *Anncalia algerae*, показал снижение транскрипционной активности генов, кодирующих белки и вовлеченных в процесс в зараженных клетках, по сравнению с контрольными (незараженными) клетками. Кроме того, в инфицированных клетках наблюдается увеличение экспрессии антиоксидантов глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы, позволяющих снизить воздействие оксидативного стресса на паразита и клетку хозяина (Panek et al., 2014).

Другим важным элементом защиты животных от внутриклеточных паразитов является индукция апоптоза зараженных клеток. Ряд исследований, выполненных на различных организмах и культурах клеток, демонстрирует, что микроспоридии способны блокировать этот процесс (Higes et al., 2013). Для представителей рода *Encephalitozoon*, культивируемых на линии клеток Vero, показано снижение в зараженных клетках экспрессии каспазы-3, а также ингибирование транслокации в ядро фактора p53, необходимого для ее активации (Del Águila et al., 2006).

При культивировании микроспоридии *Nosema bombycis* в клетках BmN (*Bombyx mori*) в зараженных клетках наблюдаются снижение экспрессии генов, кодирующих компоненты апоптосомы — белка APAF-1 и цитохрома c, а также увеличение экспрессии антиапоптотического фактора Buffy (He et al., 2015). Повышенная транскрипционная активность другого ингибитора апоптоза — IAP-2 — обнаружена в энтероцитах пчел *Apis mellifera*, зараженных микроспоридией *Nosema ceranae*. Весьма любопытно, что подобного эффекта не наблюдали при экспериментальном заражении популяции пчел, устойчивой к *N. ceranae*. Авторы данного исследования продемонстрировали, что зараженные энтероциты этих пчел

подвергаются апоптозу и выводятся при дефекации до того, как паразит успеет завершить полный цикл развития. Таким образом, устойчивость популяции обусловлена возможностью избежать механизмов блокировки апоптоза паразитом, что свидетельствует о ключевой роли данных систем и их необходимости для жизнедеятельности микроспоридий (Kurze et al., 2015).

Для нематоды *Caenorhabditis elegans* показано участие системы убиквитинирования в защитной реакции, возникающей в ответ на поражение микроспоридией *Nematocida parisii*. Убиквитинирование представляет собой присоединение небольшого регуляторного белка убиквитина к субстрату, который может быть в дальнейшем убиквитинирован повторно с образованием полиубиквитиновых цепей. Судьба данных субстратов может быть различна, чаще всего можно наблюдать их деградацию в протеасомах, однако, более крупные субстраты могут разрушаться посредством автофагии с участием лизосом (Bakowski et al., 2014). Авторы продемонстрировали, что нокдаун экспрессии субъединиц протеасомы, так же как и фактора автофагии ATG-18, приводит к увеличению скорости и эффективности репродукции микроспоридий. Кроме того, была показана концентрация убиквитина и факторов автофагии вокруг некоторых клеток паразита. В этой же работе показано, что количество убиквитинированных субстратов в зараженных клетках резко возрастает по сравнению с незараженными, при этом локализация этих субстратов часто отлична от локализации патогена (Bakowski et al., 2014). Вероятно, механизм убиквитинирования позволяет хозяину не только разрушать часть клеток паразита с помощью автофагии, но и нейтрализовать секреторные эффекторы микроспоридий с помощью протеасомной деградации.

По всей видимости, микроспоридии способны подавлять подобные защитные реакции хозяина. Было показано, что доля убиквитинированных клеток *N. parisii* резко возрастает при нарушении жизнедеятельности микроспоридии с помощью антипаразитарных препаратов (Bakowski et al., 2014). Для *Nosema bombycis* описана цистеиновая протеаза особого типа (otubain-like protease), обладающая деубиквитинирующей активностью. Авторы показали, что в спорах паразита этот фермент локализуется на поверхности цитоплазматической мембраны, и предположили, что он секретируется в цитоплазму зараженной клетки (Wang et al., 2015). Этот вид протеаз обнаружен во всех расшифрованных геномах других видов микроспоридий, включая *N. parisii*, и, вероятно, является универсальным компонентом системы подавления защитных реакций клеток хозяев, основанных на убиквитинировании (Wang et al., 2015). Кроме того, в геномах микроспоридий *Edhazardia aedis* и *Vavraia culicis* обнаружены гены, кодирующие потенциально секреторную форму фермента убиквитингидролазы (Desjardins et al., 2015).

Еще одним механизмом, обеспечивающим защиту от некоторых микроспоридиальных инфекций, является система связанных с иммунитетом ГТФаз (IFN γ -inducible, immunity-related GTPases — IRG proteins), которая была показана на примере заражения мышей микроспоридией *Encephalitozoon cuniculi*. IRG являются эффекторными молекулами, способными прямо разрушать мембрану ПВ и уничтожать паразита. Эта обнаруженная у млекопитающих система активируется интерфероном γ и обеспечивает специфическую защиту от внутриклеточных паразитов, развивающихся в ПВ (Ferreira-da-Silva et al., 2014).

Стратегии внутриклеточного паразитизма у видов-специалистов и генералистов

Характер взаимоотношений микроспоридий с клеткой одного и того же хозяина может сильно варьировать в зависимости от специфичности вида паразита. Это было продемонстрировано на примере двух патогенов комара *Aedes aegypti* — *Edhazardia aedis* и *Vavraia culicis*. Первый вид патогена может развиваться только в *A. aegypti*, тогда как второй поражает широкий круг видов комаров и москитов. Проанализировав геномы этих паразитов, а также оценив транскрипционную активность в клетках микроспоридий и хозяина, авторы обнаружили, что характеры взаимоотношений клетки хозяина с *E. aedis* и *V. culicis* различаются (Desjardins et al., 2015). Вид-специалист *E. aedis* продемонстрировал гораздо большую степень зависимости от метаболитов клетки хозяина. Например, им были утрачены многие присутствующие у *V. culicis* гены, кодирующие белки, связанные с метаболизмом фолатов (DFR1, SHM и CDC21), синтезом и взаимопревращением пиримидинов (URA6 и URA7). В то же время в геноме *E. aedis* обнаружено в 2 раза большее, чем у *V. culicis*, число генов, кодирующих потенциально секреторные эффекторы (335 против 169). При этом повышенная транскрипционная активность большинства из этих молекул на стадии внутриклеточного развития наблюдалась только у вида-специалиста, но не у вида-генералиста, что, однако, не касалось генов, связанных с интенсификацией метаболизма зараженной клетки, например секреторных форм гексокиназы и трегалазы. На основании полученных данных сделан вывод о том, что стратегия паразитирования вида *V. culicis* сфокусирована в первую очередь на быстром росте и размножении в клетках хозяев (круг которых широк), в то время как высокоспециализированный вид *E. aedis* характеризуется более тонкими взаимоотношениями с клеткой хозяина, что и обуславливает его крайнюю специфичность (Desjardins et al., 2015).

Секреторные белки микроспоридий как инструмент воздействия на зараженную клетку

Как можно видеть из предыдущих разделов, спектр воздействий микроспоридий на клетку хозяина чрезвычайно разнообразен, однако молекулярные механизмы, лежащие в их основе, зачастую остаются неизученными. Одним из наиболее вероятных механизмов целенаправленного воздействия внутриклеточных паразитов на клетку хозяина является секреция белков, способных вмешиваться в регуляторные пути и сигнальные каскады зараженной клетки. Такие механизмы широко описаны у споровиков родов *Theileria*, *Plasmodium* и *Toxoplasma* (Ravindran, Boothroyd, 2008). У микроспоридий, геномы которых были расшифрованы, обнаружены сотни генов, кодирующих потенциально секреторные белки (Campbell et al., 2013; Desjardins et al., 2015). Эффекторные молекулы микроспоридий также были обнаружены при исследованиях протеома зараженных клеток (Campbell et al., 2013; Panek et al., 2014).

Для того чтобы продемонстрировать, что микроспоридии действительно секретируют факторы патогенности в цитоплазму зараженных клеток, мы изучили локализацию в клетках паразита и хозяина восьми потенциально секреторных белков микроспоридии *Paranosema locustae*,

паразита саранчи *Locusta migratoria* (Тимофеев и др., 2014; Senderskiy et al., 2014). Все исследуемые молекулы обладали предсказанным N-концевым сигнальным пептидом, что подразумевало их секрецию в мембранные компартменты клетки паразита или за ее пределы. С помощью иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии нам удалось продемонстрировать накопление пяти изученных молекул паразита в зараженных клетках саранчи: гексокиназы, трегалазы, α/β -гидролазы и двух белков, содержащих богатые лейцином повторы (LRR-proteins). Три секреторных фермента (гексокиназа, трегалаза и α/β -гидролаза), вероятно, участвуют в стимуляции системы энергетического обмена саранчи, тогда как LRR-белки взаимодействуют с белками сигнальных каскадов зараженной клетки. Данные молекулы имеют сходство с ГТФ-связывающими белками, и, поскольку ГТФазы хозяина активно участвуют в защитных реакциях и перестройке цитоскелета зараженной клетки, весьма вероятно, что эти процессы модулируются паразитом за счет секреции LRR-белков (Тимофеев и др., 2014; Senderskiy et al., 2014).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 15-04-04968-а и 15-34-20567-мол_а_вед).

Список литературы

- Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Наумов А. М. 2011. Уникальные особенности энергетического обмена микроспоридий как результат длительной адаптации к внутриклеточному развитию. Паразитология. 45 (2): 147—157. (Dolgikh V. V., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Naumov A. M. 2011. Unique characteristics of the energy metabolism in Microsporidia as a result of durational adaptation to the intracellular development. Parazitologiya. 45 (2): 147—157.)
- Иссу И. В., Воронин В. Н. 2007. Тип Microsporidia (Микроспоридии). В кн.: Протисты (Protista): руководство по зоологии. СПб.: Наука. 994—1045. (Issi I. V., Voronin V. N. 2007. Phylum Microsporidia. In: Protista: Handbook on zoology. S-Petersburg: Nauka. 994—1045.)
- Тимофеев С. А. 2015. Современные представления о микроспориозе человека. Вестн. РАМН. 70 (2): 257—263. (Timofeev S. A. 2015. Current concepts of human microsporidiosis. Vestnik RAMS Nauk (Annals of the Russian Acad. Med. Sci. 70 (2): 257—263.)
- Тимофеев С. А., Сендерский И. В., Павлова О. А., Долгих В. В. 2014. Особенности экспрессии, структуры и локализации субтилизин-подобной протеиназы микроспоридии *Paranosema locustae*. Паразитология. 48 (5): 337—347. (Timofeev S. A., Senderskiy I. V., Pavlova, O. A., Dolgikh V. V. 2014. Peculiarities of the expression, structure, and localization of the subtilisin-like protease in the microsporidium *Paranosema locustae*. Parazitologiya. 45 (2): 147—157.)
- Bakowski M. A., Desjardins C. A., Smelkinson M. G., Dunbar T. A., LopezMoyado I. F., Rifkin S. A., Cuomo C. A., Troemel E. R. 2014. Ubiquitinmediated response to microsporidia and virus infection in *C. elegans*. PLoS Pathog. 10: e1004200.
- Bohne W., Bottcher K., Gross U. 2011. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. Int. J. Med. Microbiol. 301: 395—399.
- Campbell S. E., Williams T. A., Yousuf A., Soanes D. M., Paszkiewicz K. H., Williams B. A. P. 2013. The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions. PLoS Genet. 9: e1003676.
- Canning E. U., Vavra J. 2000. Phylum Microsporida Balbiani, 1882. In: An illustrated guide of the Protozoa. Lawrence, Kansas, USA: Society of Protozoologists/Allen Press. 1: 39—126.
- Del Águila C., Izquierdo F., Granja A. G., Hurtado C., Fenoy S., Fresno M., Revilla Y. 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. Int. J. Parasitol. 36: 869—876.
- Desjardins C. A., Sanscrainte N. D., Goldberg J. M., Heiman D., Young S., Zeng Q., Madhani H. D., Becnel J. J., Cuomo C. A. 2015. Contrasting host-pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. Nat. Commun. 6: 7121.
- Didier E. S., Bowers L. C., Martin A. D., Kuroda M. J., Khan I. A., Didier P. J. 2010. Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection *in vitro* and *in vivo*. Microbes Infect. 14—15: 1244—1251.
- Ferreira-da-Silva M. F., Springer-Frauenhoff H. M., Bohne W., Howard J. C. 2014. Identification of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* as a new target of the IFN γ -inducible IRG resistance system. PLoS Pathog. 10: e1004449.
- Haag K. L., James T. Y., Pombert J. F., Larsson R., Schärer T. M., Refardt D., Ebert D. 2014. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111: 15 480—15 485.
- Hacker C., Howell M., Bhella D., Lucocq J. 2014. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. Cell. Microbiol. 16: 565—579.
- He X., Fu Z., Li M., Liu H., Cai S., Man N., Lu X. 2015. *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in BmN cells (*Bombyx mori*). Acta biochim. biophys. sin. (Shanghai). 47: 696—702.
- Higes M., Juarranz A., Dias-Almeida J., Lucena S., Botias C., Meana A., Garcia-Palencia P., Martin-Hernandez R. 2013. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). Environ. Microbiol. Rep. 5: 530—536.
- Issi I. V., Tokarev Y. S., Seliverstova E. V., Voronin V. N. 2012. The parasite-host interface between *Crispospora chironomi* (Microsporidia, Terresporidia) and *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae) enterocytes. Euroasian Entomol. J. 11: 395—400.
- Issi I. V., Tokarev Y. S., Voronin V. N., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Dolgikh V. V. 2010. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Mrazekia macrocyclops* sp. n. (Microsporidia, Mrazekiiidae), a microsporidian parasite of *Macrocyclops albidus* (Jur.) (Crustacea, Copepoda). Acta Protozool. 49: 75—84.
- James T. Y., Pelin A., Bonen L., Ahrendt S., Sain D., Corradi N., Stajich J. E. Stajich. 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and Microsporidia. Curr. Biol. 23: 1548—1553.
- Keeling P. J., Fast N. M., Corradi N. 2014. Microsporidian genome structure and function. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. USA: Wiley-Blackwell. 221—229.
- Kurze C., Le Conte Y., Dussaubert C., Erler S., Kryger P., Lewkowski O., Muller T., Widder M., Moritz R. F. 2015. *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. PLoS ONE. 10: e0140174.
- Panek J., Alaoui H., Mone A., Urbach S., Demetere E., Texier C., Brun C., Zanzoni A., Peyretaillade E., Parisot N., Lerat E., Peyret P., Delbac F., Biron D. G. 2014. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the Microsporidian *Anncaliia algerae*. PLoS ONE. 9: e100791.
- Peláez R., Herrero P., Moreno F. 2009. Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway. J. Biol. Chem. 284: 20 548—20 555.
- Ravindran S., Boothroyd J. C. 2008. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. Traffic. 9: 647—656.
- Rodriguez-Tovar L. E., Speare D. J., Markham R. J. 2011. Fish microsporidia: immune response, immunomodulation and vaccination. Fish Shellfish Immunol. 30 (4—5): 999—1006.
- Senderskiy I. V., Timofeev S. A., Seliverstova E. V., Pavlova O. A., Dolgikh V. V. 2014. Secretion of *Antonosporea* (*Paranosema*) *locustae* proteins into infected cells suggests an active role of

microsporidia in the control of host programs and metabolic processes. PLoS ONE. 9 : e93585.

Simakova A. V., Pankova T. F., Tokarev Y. S., Issi I. V. 2005. New genus of microsporidia *Senoma* gen. n. with type species *Senoma globulifera* comb. n. (syn. *Issia globulifera* Issi, Pankova, 1983) from malaria mosquito *Anopheles messae* Fall. Protistology. 4 : 134—145.

Szumowski S. C., Botts M. R., Popovich J. J., Smelkinson M. G., Troemel E. R. 2014. The small GTPase RAB-11 directs polarized exocytosis of the intracellular pathogen *N. parisii* for fecal-oral transmission from *C. elegans*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111 : 8215—8220.

Szumowski S. C., Estes K. A., Popovich J. J., Botts M. R., Sek G., Troemel E. R. 2016. Small GTPases promote actin coat formation on microsporidian pathogens traversing the apical membrane of *Caenorhabditis elegans* intestinal cells. Cell. Microbiol. 1 : 30—45.

Szumowski S. C., Estes K. A., Troemel E. R. 2012. Preparing a discreet escape: Microsporidia reorganize host cytoskeleton prior to non-lytic exit from *C. elegans* intestinal cells. Worm. 1 : 1—5.

Tokarev Y. S., Voronin V. N., Seliverstova E. V., Grushetskaya T. A., Issi I. V. 2012. Ultrastructure and molecular phyloge-

netics of *Helmichia lacustris*, a microsporidium with an uncoiled isofilar polar filament. Parasitol. Res. 110 : 1201—1208.

Tsaousis A. D., Kunji E. R., Goldberg A. V., Lucocq J. M., Hirt R. P., Embley T. M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. Nature. 453 : 553—556.

Vavra J., Larsson J. I. R. 2014. Structure of Microsporidia. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. USA: Wiley-Blackwell. 1—70.

Wang Y., Dang X., Luo B., Li C., Long M., Li T., Li Z., Pan G., Zhou Z. 2015. Characterization of a novel otubain-like protease with deubiquitination activity from *Nosema bombycis* (Microsporidia). Parasitol. Res. 114 : 3759—3766.

Williams B. A. P. 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. Cell. Microbiol. 11 : 1551—1560.

Williams B. A. P., Dolgikh V. V., Sokolova Y. Y. 2014. Microsporidian Biochem. Physiol. In: Microsporidia: pathogens of opportunity. USA: Wiley-Blackwell. 245—260.

Поступила 22 I 2016

INTERACTIONS OF MICROSPORIDIA WITH INFECTED HOST CELL

S. A. Timofeev,¹* Yu. S. Tokarev,¹ A. V. Simakova,² A. A. Tsarev,¹ V. V. Dolgikh¹

¹ All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg—Pushkin, 196608,
and ² Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, 634050;
* e-mail: ts-bio@yandex.ru

Microsporidia comprise a group of fungi-related obligate intracellular eukaryotic pathogens with extremely wide host range: from protists to mammals. Adaptation to intracellular parasitism drives these parasites towards significant reduction and modification of the genome and functional apparatus, which causes extreme dependence on the host cell, as well as sophisticated host-parasite relationships. In this review we summarize our results and recent literature data about microsporidian interactions with the host at the cellular level. The impacts of these pathogens to infected cells include induction of hypertrophy, restructuring and modification of the cytoskeleton and the vesicular transport system of the host cells. Microsporidians also able to stimulate the metabolic processes in the infected cells and inhibit their defensive reactions. The main tool of the direct regulatory impact of microsporidia on the host cell apparently is the secretion of the special protein effectors capable to interfere to regulatory and signaling pathways of the host cell.

Key words: microsporidia, intracellular parasites, host-parasite interactions, metabolism, cytoskeleton, apoptosis.