

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской академии наук

*на правах рукописи*

**Соколова  
Юлия Яновна**

**БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ И БИОРАЗНООБРАЗИЕ  
МИКРОСПОРИДИЙ**

03.02.11 – Паразитология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
Скарлато Сергей Орестович,  
доктор биологических наук

Санкт-Петербург  
2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b>   | <b>7</b>  |
| <b>ГЛАВА 1. БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, ФИЛОГЕНИЯ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ МИКРОСПОРИДИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.1 Актуальные проблемы цитологии и клеточной биологии микроспоридий</b>   | <b>18</b> |
| 1.1.1 Споры микроспоридий и способ заражения клетки хозяина   | 18        |
| <i>Структурные особенности и предполагаемые функции оболочки споры</i>  | 19        |
| <i>Аппарат экструзии споры и механизм заражения клетки хозяина</i>  | 23        |
| <i>Проникновение в клетку хозяина и особенности внутриклеточного метаболизма спор</i>   | 25        |
| <i>Организация спороплазмы</i>  | 27        |
| <i>Внутриклеточные стадии и их органеллы</i>  | 28        |
| <i>Плазматическая мембрана</i>  | 28        |
| <i>Ядро, мейоз и смена ядерных фаз</i>  | 29        |
| <i>Митосомы</i>   | 32        |
| <b>1.2 Эволюционные связи микроспоридий и положение в системе эукариот</b>  | <b>33</b> |
| 1.2.1 История вопроса: простейшие или грибы?  | 33        |
| 1.2.2 Родственные связи микроспоридий внутри Opisthokonta   | 44        |
| 1.2.3 Родственные связи микроспоридий внутри клады ARM:<br>ультраструктура и филогения «переходных форм» - <i>Paramicrosporidium</i> ,<br><i>Nucleophaga</i> и <i>Mitosporidium</i> , а также «примитивных» микроспоридий семейств<br><i>Metchnikovellidae</i> и <i>Chytridiopsidae</i> | 48        |
| <b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>  | <b>58</b> |
| <b>2.1 Объекты исследований</b>   | <b>58</b> |
| 2.1.1 Природные паразито-хозяинные системы  | 58        |
| 2.1.2 Экспериментальные паразито-хозяинные системы с участием насекомых   | 58        |
| 2.1.3 Клеточная экспериментальная система   | 61        |
| <b>2.2 Методы и методология морфологических исследований</b>  | <b>64</b> |
| 2.2.1 Световая микроскопия  | 64        |
| <i>Визуализация живых организмов</i>  | 64        |
| <i>Окраска микроспоридий для просмотра в светлом поле</i>   | 65        |
| <i>Гистология и цитохимия</i>   | 65        |
| <i>Цитохимический анализ маркеров апоптоза методом TUNEL</i>  | 66        |
| 2.2.2 Флуоресцентная и конфокальная микроскопия   | 67        |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Окраска микроспоридий и ядерные красители</i>  | 67        |
| <i>Иммунофлюоресцентный анализ</i>  | 67        |
| <i>Флуоресцентный анализ маркеров апоптоза методом TUNEL</i>  | 68        |
| 2.2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия   | 69        |
| <i>Метод ультратонких срезов</i>  | 69        |
| <i>Трехмерная реконструкция серийных срезов</i>   | 70        |
| <i>Электронная томография</i>   | 70        |
| <i>Ультраструктурная цитохимия</i>  | 71        |
| 2.2.4 Специальные методические подходы ТЭМ, используемые для доказательства непрерывности секреторного пути микроспоридий и отсутствия везикул  | 71        |
| 2.2.5 Иммуноэлектронная микроскопия на срезах тканей, залитых в LR-White, и на криосрезах по методу Tokuyasu  | 73        |
| 2.2.6 Сканирующая электронная микроскопия   | 75        |
| <b>2.3 Биохимические и молекулярно-биологические методы</b>   | <b>75</b> |
| 2.3.1 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПАГЭ) и иммуноблотинг  | 75        |
| 2.3.2 Флуориметрический анализ активности каспазы-3   | 76        |
| 2.3.3 Выделение ДНК и ПЦР-амплификация  | 76        |
| <i>Выделение геномной ДНК из очищенных спор микроспоридий и из зараженных тканей</i>  | 77        |
| <i>Выделение ДНК из стула для ПЦР-диагностики и идентификация видов и генотипов микроспоридий человека</i>  | 80        |
| 2.3.3 Лазерная микродиссекция и выделение ДНК из индивидуальных спор, вырезанных из мазков зараженных тканей  | 82        |
| 2.3.4 Оценка экспрессии апоптозных генов с помощью количественного ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции в 96-луночных планшетах (RT-qPCR microarray)                             | 86        |
| <b>2.4 Методы филогенетического анализа и статистической обработки</b>  | <b>87</b> |
| <b>ГЛАВА 3. ЦИТОЛОГИЯ, ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И ФИЛОГЕНИЯ МИКРОСПОРИДИЙ, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУППАХ ХОЗЯЕВ</b>   | <b>89</b> |
| <b>3.1 Ультраструктура “низших” микроспоридий-мечниковеллид (Rudimicrosporea, Metchnikovellidae) на примере двух видов рода <i>Metchnikovella</i> и особенности строения «низших» микроспоридий</b> | <b>89</b> |

|   |            |
|---|------------|
| 3.1.1 Ультраструктура стадий жизненного цикла <i>Metchnikovella incurvata</i> Caullery an Mesnil 1914, гиперпаразита грегарин <i>Polyrhabdina</i> sp., кишечного эндобионта полихет <i>Pigospio elegans</i> | 89         |
| 3.1.2. Жизненный цикл и ультраструктура <i>Metchnikovella spiralis</i>  | 90         |
| 3.1.3 Эволюция аппарата экстрюзии: сходство ультраструктуры спор мечниковеллид и <i>Paramicrosporidium</i> . Морфология мечниковеллид в свете геномных данных: предковые формы или боковая ветвь?           | 91         |
| <b>3.2 Микроспоридии морских и пресноводных ракообразных</b>  | <b>100</b> |
| 3.2.1 <i>Agmasoma penaei</i> и <i>Perezia nelsoni</i> – два паразита креветок семейства Penaeidae древней группы морских Decapoda (класс Malacostraca)  | 100        |
| 3.2.2 <i>Apotasporea heleios</i> из пресноводной креветки <i>Palaemonetes paludosus</i> (Decapoda: Caridea: Palaemonidae)   | 103        |
| 3.2.3 Микроспоридии пресноводных ракообразных отрядов Cladocera (класс Branchiopoda) и Cyclopoidea (класс Maxillopoda) и молекулярная филогения «Aquatic Outgroup»  | 110        |
| <b>3.3 Ультраструктура, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспоридий наземных насекомых</b>   | <b>114</b> |
| 3.3.1 Микроспоридии рода <i>Paranosema</i> из клеток жирового тела прямокрылых и жесткокрылых насекомых   | 115        |
| 3.3.2 Микроспоридии рода <i>Liebermannia</i> – специализированные паразиты эпителиев кишечного тракта и его придатков   | 116        |
| 3.3.3 Филогенетическое положение <i>Nosema disstriae</i> и диверсификация близкородственных видов в группе <i>Nosema bombycis</i>   | 122        |
| 3.3.4 Сложный жизненный цикл микроспоридии <i>Kneallhazia solenopsae</i> , адаптированный к паразитизму в колонии общественных насекомых  | 131        |
| <b>3.4 Микроспоридии – паразиты позвоночных животных и человека</b>   | <b>144</b> |
| 3.4.1 Микроспоридии рептилий: <i>Encephalitozoon pogonae</i> – новый вид микроспоридий из бородатой агамы <i>Pogona vitticeps</i> . Диверсификация рода <i>Encephalitozoon</i> по позвоночным хозяевам      | 144        |
| 3.4.2 Микроспоридии – реальные и потенциальные патогены человека  | 148        |
| <b>3.5. Заключение по главе 3</b>   | <b>155</b> |
| <b>ГЛАВА 4. АППАРАТ ГОЛЬДЖИ И СЕКРЕТОРНЫЙ ТРАНСПОРТ МИКРОСПОРИДИЙ</b>   | <b>164</b> |
| <b>4.1 Особенности структурно-функциональной организации аппарата Гольджи (АГ) микроспоридий по сравнению с другими эукариотами</b>   | <b>158</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.2 Ультраструктурная организация тубулярных сетей (ТС) – аппарата Гольджи микроспоридий и модификации ТС в ходе жизненного цикла</b>                         | <b>160</b> |
| <b>4.3 Морфофункциональные доказательства функций Гольджи у ТС</b>   | <b>166</b> |
| 4.3.1 В ТС концентрируются секреторные белки   | 166        |
| 4.3.2 ТС содержат специфические маркеры АГ и, следовательно, обладают его цитохимическими функциями  | 169        |
| <i>Маркеры цис- и транс- Гольджи эукариот идентифицируют соответствующие зоны ТС микроспоридий</i>   | 169        |
| <i>Белки полярной трубки и клеточной стенки гликозилируются в ТС</i>   | 171        |
| <i>В ТС микроспоридий присутствуют резидентные белки АГ</i>  | 171        |
| <b>4.4 Опыты, подтверждающие отсутствие везикул в АГ микроспоридий</b>   | <b>173</b> |
| <b>4.5 Уроки геномных проектов</b>   | <b>174</b> |
| <b>4.6 Микроспоридии как естественные экспериментальные системы для изучения секреторного транспорта</b>   | <b>177</b> |
| 4.6.1 Многообразие моделей структурно-функциональной организации АГ и паразитические протисты в качестве модельных объектов для изучения секреторного транспорта | 177        |
| 4.6.2 Уникальные и универсальные черты «минимальной» секреторной системы микроспоридий (вместо заключения)   | 183        |
| <b>ГЛАВА 5. МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА КАК МЕХАНИЗМ ПАТОГЕНЕЗА МИКРОСПОРИДИЙ</b>  | <b>187</b> |
| <b>5.1 Роль макрофагов в клеточном и гуморальном иммунитете; взаимоотношение микроспоридий с макрофагами; выбор изучаемых видов и задачи работы</b>              | <b>188</b> |
| <b>5.2 Заражение микроспоридиями подавляет активность каспазы-3 (К-3) и ведет к уменьшению количества апоптотных ядер, окрашенных по методу TUNEL</b>            | <b>190</b> |
| <b>5.3 Анализ экспрессии генов, связанных с апоптозом</b>  | <b>193</b> |
| <b>5.4 Обсуждение результатов: сравнительный анализ модуляции индуцированного апоптоза микроспоридиям</b>  | <b>198</b> |
| <b>5.5 Заключение по главе 5 и перспективы исследований модуляции клеточных циклов клеток хозяина микроспоридиями</b>  | <b>203</b> |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>  | <b>206</b> |
| <b>ВЫВОДЫ</b>  | <b>209</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>  | <b>212</b> |
| <b>Список использованных сокращений</b>                           | <b>258</b> |
| <b>Благодарности и источники финансирования</b>                   | <b>259</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>   | <b>260</b> |
| Приложение 1. Список публикаций и презентаций по диссертации..... | 261        |
| Приложение 2. Рисунки ПЗ-1 – ПЗ – 7 к Главе 3.....                | 269        |
| Приложение 3. Таблица П4-1 к Главе 4.....                         | 276        |
| Приложение 4. Рисунок П5-1 к Главе 5.....                         | 278        |

## ВВЕДЕНИЕ

Микроспоридии (тип *Microsporidia Balbiani* 1882) – внутриклеточные облигатные паразиты животных, имеющие большое практическое значение для медицины, ветеринарии и сельского хозяйства, а также важные с точки зрения общей биологии, как пример крайней адаптации к паразитическому образу жизни. Микроспоридии широко распространены в природе: они встречаются практически во всех географических экотопах Земли и известны из представителей большинства классов Metazoa, а также некоторых инфузорий и грегарин (Anonymus, 2014; Sokolova, 2015; Stentiford et al., 2016).

За последние четверть века наблюдается впечатляющий прогресс в изучении микроспоридий. Росту интереса к этой группе со стороны научного сообщества заметно поспособствовали два фактора. Во-первых, в 1990-х годах в Европе и США разразилась эпидемия ВИЧ и был описан первый вид микроспоридий *Enterocytozoon bieneusi*, оказавшийся этиологическим агентом диарей неясной этиологии, одного из опасных осложнений при СПИДе (Desportes et al., 1985), а потом и другие виды микроспоридий человека, вызывающие оппортунистические заболевания (Didier, Weiss, 2006; Weiss, 2014). Во-вторых, в этот период произошел резкий скачок в развитии методологической базы паразитологических исследований. За счет методов конфокальной, иммуноэлектронной микроскопии и сопряженных иммунологических методов был усовершенствован морфологический анализ, и, кроме того, широкое распространение получили молекулярно-биологические подходы, в частности, методы молекулярной филогении, геномного и протеомного анализов. До середины 1990-х годов лишь сравнительно немногочисленная группа протозологов и паразитологов, в основном работающих в прикладных областях защиты растений, пчеловодства, рыбоводства и ветеринарии, публиковали работы по микроспоридиям в специальных журналах. С середины 1990-х годов круг ученых, проявляющих интерес к микроспоридиям, резко расширился и включил в себя сотрудников многочисленных лабораторий, занимающихся биомедицинскими исследованиями, медицинских микробиологов и врачей-инфекционистов. Новый статус микроспоридий как патогенов человека существенно стимулировал финансовые вложения, а значит и повысил уровень исследований, что, в свою очередь, позволило получить новую информацию и выявить ряд характеристик микроспоридий, благодаря которым эти протисты в 21 веке стали важными объектами эволюционной, молекулярной и клеточной биологии (Fedorov, Hartman, 2004; Katinka et al., 2001; Keeling, 2001; Vávra, Lukeš, 2013; Williams et al., 2014). Число публикуемых статей по микроспоридиям по базе данных PubMed претерпело

резкий рост (в 10-ки раз) в первой половине 1990-х годов и до сих пор продолжает уверенно расти.

Американский центр по контролю заболеваний (CDC, Atlanta) и Всемирная организация здравоохранения включили микроспоридий в список возбудителей опасных инфекционных болезней человека, передающихся через воду и пищу (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Priority Parasite List, Category B, Biological Diseases, Food and Water borne Pathogens (Didier, Khan, 2014). Новые данные о губительном для медоносных пчел микроспориidioзе, Colony Culture Disorder, вызванном *Nosema ceranae* (паразитом азиатских пчел) и быстро распространяющемся в Евразии и Америках, стимулировали серию интереснейших исследований по паразитам пчел и шмелей (Fries, 2014). Изучение микроспориidioзов при массовом разведении и добыче рыбы и морских беспозвоночных вылилось в активно развивающееся направление исследований по таксономии и поликсенным жизненным циклам морских микроспоридий, внесших огромный вклад в понимание биологии группы (Stentiford et al., 2013, 2016).

Наиболее значимый прорыв за последние 5-6 лет связан с геномными исследованиями, прояснившими происхождение микроспоридий и подтвердившими их уникальность, обусловленную беспрецедентным уровнем адаптации к паразитическому образу жизни, в том числе и на молекулярном уровне. В то же время, эти исследования показали, что при всей своей уникальности микроспоридии обладают клеточными и геномными признаками типичных эукариот, представляя собой одну из ветвей суперклады Opisthocoonta (Adl et al., 2005; Karpov et al., 2014; Vávra, Lukeš, 2013).

Большинство микроспоридий обладают маленькими геномами (в среднем 2.5-10 Мб) (Biderre et al., 1994; Desjardins et al., 2015; Keeling, 2014), с минимальным среди эукариот количеством кодируемых белков и биохимических путей (Corradi et al., 2009, 2010; Desjardins et al., 2015; Katinka et al., 2001). Эти геномы могут быть относительно быстро и недорого секвенированы и изучены. Микроспоридии оказались на переднем крае работ в области геномики и протеомики, так как фактически они представляют собой естественные клеточные модели для изучения минимальных физиологических потребностей эукариотической клетки и молекулярно-генетических взаимодействий между паразитом и хозяином (Troemel, 2011). Системы с участием микроспоридий демонстрируют все новые тонкие механизмы взаимодействия паразита и хозяина. Так, недавно был продемонстрирован необычайно высокий уровень подвижных элементов в некоторых микроспоридиальных геномах, значительно превосходящий долю транспозонов в геномах других паразитов. Эти элементы, как было показано биохимическими методами, участвуют в использовании паразитом метаболитических

путей хозяина и в инактивации механизма распознавания патогенов, обеспечивая контроль паразито-хозяинных отношений на уровне ДНК (Panek et al., 2014; Parisot et al., 2014; Pombert et al., 2012; Selman et al., 2011). Благодаря новой технологии секвенирования (Next Generation Sequencing), в распоряжении исследователей оказался большой репертуар полностью или частично расшифрованных геномов микроспоридий, и это число продолжает расти и поставлять новую информацию (Akiyoshi et al., 2009; Cornman et al., 2009; Corradi et al., 2009, 2010; Cuomo et al., 2012; Desjardins et al., 2015; Heinz et al., 2012; Katinka et al., 2001; Pan et al., 2013; Panek et al., 2014; Parisot et al., 2014; Pombert et al., 2012; Selman, et al., 2011). Сравнительный анализ геномов стал основным способом изучения функции генов микроспоридий. Для микроспоридий пока не удалось разработать метод трансформации генома и подходы манипулирования генами (включение, выключение генов и визуализация экспрессии с помощью флуорохромов), успешно применяемые при изучении модельных паразитологических объектов, таких как *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Giardia* и др. Локализация антител и гетерологическая экспрессия, в последние годы заметно продвинувшие наши знания в области протеомики микроспоридий (Dolgikh et al., 2009, 2011), все же не представляют собой эквивалентную замену непосредственной манипуляции генами. Применение РНК-интерференции перспективно, но этот метод ещё совершенно не разработан, и, кроме того, многие класы микроспоридий, к которым относятся и виды, паразитирующие у человека, в процессе эволюции потеряли гены, ответственные за эту систему (Williams et al., 2014).

Очевидно, что сейчас и в ближайшем будущем исследования в области фундаментальной микроспоридиологии будут сконцентрированы на секвенировании все большего числа геномов и на анализе огромных объемов биоинформационных данных, с последующей выборочной проверкой виртуальных прогнозов на экспериментальных системах. Обратной стороной увлечения геномикой и протеомикой микроспоридий стало снижение количества и качества публикаций по биоразнообразию и цитологии этой группы. Проекты, не представляющие масштабные геномные исследования микроспоридий, угрожающих здоровью человека, а тем более фаунистические исследования плохо финансируются. И, как следствие, область знаний, посвященная биоразнообразию микроспоридий в различных экосистемах и хозяевах, со времени фундаментальных публикаций В. Спрэга и И.В. Исси (Issi, 1986; Sprague, 1977b) скорее деградирует, чем развивается. Непосредственно связана с человеком лишь ничтожная часть видов микроспоридий. В то же время, в природных экосистемах микроспоридии играют огромную роль, и выяснение этой роли важно как для хозяйственной

деятельности человека, так и для прогнозирования рисков для его здоровья (Sokolova, 2015).

Важная проблема таксономии микроспоридий – типичная в настоящее время и для других живых организмов – переко́с в сторону приоритета «баркодинга» (фактическим «баркодом» вида микроспоридий признан участок гена малой субъединицы рибосомальной РНК (МСрДНК), равный примерно 1000 пар оснований) в ущерб качественному морфологическому анализу. Такой переко́с – вредная тенденция, ставшая следствием не только смены приоритетов, но и утери целого пласта знаний и умений, т.к. специалисты по цитологии и биоразнообразию микроспоридий уходят, а на смену им приходят молекулярные биологи, биоинформатики, генетики и филогенетики, со своими задачами и спектром методических подходов. В результате огромный объем невосполнимой информации, накопленный предыдущими исследованиями, теряется, так как современные специалисты по «омикам» мало читают старую морфологическую литературу, предпочитая «изобретать велосипеды» в интерпретации своих геномных данных. Безусловно, молекулярная филогения обогатила систематику и таксономию микроспоридий – выявила новые филогенетические связи, подтвердила другие и показала ложность третьих (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005; Vossbrinck et al., 2014). В настоящее время необходим синтез морфологического и молекулярного подходов (Desjardins, et al., 2015; Haag, et al., 2014; Larsson, 2005; Vávra, Larsson, 2014), и только их пока недостижимый консенсус, учитывающий особенности жизненных циклов, систематическую принадлежность хозяина, местообитание и тканевую специфичность, позволит создать естественную систему микроспоридий. К счастью, комплексные исследования по морфологии, жизненным циклам, таксономии и молекулярной филогении велись и продолжают вестись в России членами научной школы, основанной Ирой Викторовной Исси (Simakova et al., 2009; Sokolova et al., 2018; Tokarev et al., 2018). В работах по цитологии и филогении отдельных групп микроспоридий, обобщенных в диссертации, я старалась объединить молекулярные, морфологические и экологические характеристики видов. В рамках этой проблемы важнейшим направлением исследований была молекулярная характеристика описанных ранее видов и их локализация на филогенетическом дереве.

Другой аргумент в пользу важности изучения биологии отдельных видов микроспоридий – это накопление материала для интерпретации биоинформатических данных. В настоящее время доля неидентифицированных семейств генов, транскриптов и белков в изученных геномах, транскриптомах и протеомах значительно превышает долю генов с известными функциями (Keeling, 2014). При примерно одинаковом наборе

основных рабочих генов, кодирующих существенные биохимические пути, размеры геномов варьируют многократно – от 2.3 Мб у паразита человека *Encephalitozoon intestinalis* до 51.3 у *Edhazardia aedis*, микроспоридии из комаров. Самые интересные вопросы, на которые еще предстоит ответить: в чем причина таких радикальных различий в геномах и протеомах, как эти различия связаны с жизненными циклами, специфичностью по отношению к хозяевам и тканям, когда и под давлением каких факторов утеряны кластеры генов и целые метаболические пути, т.е. как шла приспособительная эволюция микроспоридий. Ответы на эти вопросы невозможны без подробного изучения биологии и цитологии разных групп микроспоридий. Вслед за эрой аннотаций геномов и *in silico* прогнозов функций генов и белков постепенно приходит этап синтеза, снова востребующий данные по ультраструктуре и биоразнообразию микроспоридий и показывающий, насколько плодотворным может быть сочетание современных молекулярных методов и традиционных подходов (Desjardins et al., 2015).

Настоящая диссертация обобщает собранный автором за 1990 - 2017 годы обширный материал по ультраструктуре и биологии представителей различных групп микроспоридий. Список организмов, с которыми я работала, включает парамикроспоридий (сестринская группа по отношению к Microsporidia, принадлежащая к кладе Rozellamycota), «низших» микроспоридий-мечниковеллид – гиперпаразитов полихет, а также «высших» микроспоридий, паразитирующих в разнообразных хозяевах, преимущественно в членистоногих. Изучение такого разнообразного материала, а также вовлечение в мировую научную деятельность в качестве автора и соавтора обзоров и оригинальных статей, ревьюера протистологических и паразитологических журналов, участника и организатора конференций в течение более чем 20 лет, позволили мне сформулировать некоторые обобщения, касающиеся биологии клетки, происхождения и диверсификации микроспоридий, которые изложены в этой диссертации. Основным и отправным методом исследования был морфологический анализ, преимущественно на ультраструктурном уровне. Структура и функция уникальной клетки микроспоридий всегда были в центре моего научного интереса к микроспоридиям, хотя логика исследований неизбежно уводила меня за пределы клеточного уровня и морфологических методов. Помимо особенностей тонкой морфологии и многообразия организации клетки микроспоридий различных таксономических групп, особое внимание в моих исследованиях было уделено двум ключевым чертам клеточной биологии этих протистов: (1) специфической организации «минимальной» секреторной системы – своеобразному комплексу Гольджи, на базе которого сформировались основные компоненты аппарата экстрезии, и (2) способности микроспоридий модулировать

клеточный цикл хозяев, в частности, ингибировать апоптоз. Именно эти две черты, на мой взгляд, в значительной степени обеспечили беспрецедентный успех группы в качестве внутриклеточных паразитов большинства современных групп животных. При написании диссертационной работы, особенно при обсуждении литературных данных, ставилась задача по возможности интерпретировать наблюдения «классической» морфологии и общей биологии микроспоридий в контексте новейших успехов геномики и молекулярной биологии. Такой подход позволил представить и оценить достижения и идеи практически закончившейся «морфологической» эры с позиции проблем наступившего «геномного» и грядущего «пост геномного» периодов изучения типа *Microsporidia*.

### **Цель исследования**

Цель работы – изучение многообразия клеточной организации и жизненных циклов микроспоридий, паразитирующих в хозяевах из различных систематических и экологических групп, для выявления морфологических коррелятов диверсификации микроспоридий и эволюционных адаптаций, которые обеспечили этим паразитам необычайно широкое распространение среди животных почти всех типов, а также для разработки подходов к изучению микроспорициальных инфекций человека.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить строение и жизненные циклы представителей семейства *Metchnikovellidae*, базальной группы типа *Microsporidia*.

2. Изучить ультраструктуру, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспоридий членистоногих, в том числе: (а) хозяйственно важных морских десятиногих раков (класс *Crustacea*: *Decapoda*) на примере *Agmasoma penaei*, *Perezia nelsoni* и *Apotasporea heleis*, (б) массовых пресноводных ракообразных – циклопов (*Crustacea*: *Cyclopoidea*) и дафний (*Crustacea*: *Cladocera*) на примере *Alfvenia sibirica* и *Agglomerata cladocera*, а также (в) насекомых (класс *Insecta*) различных отрядов на примере (i) представителей рода *Paranosema* – паразитов жирового тела прямокрылых (*Orthoptera*) и жуков (*Coleoptera*); (ii) *Liebermannia* spp, адаптированных к паразитированию в эпителиях кишечного тракта и его придатков кузнечиков (*Orthoptera*); (iii) вида *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (*Hymenoptera*) со сложным полиморфным жизненным циклом, специализированным к паразитированию в колонии социальных насекомых; (iv) *Nosema distriiae* – паразита карантинного вредителя леса, *Malacasoma distria* (*Lepidoptera*), типичного представителя самого распространенного рода микроспориций *Nosema*.

3. Изучить распространение микроспоридий у рептилий и родственные связи *Encephalitozoon pogonae* с видами рода *Encephalitozoon*, патогенными для теплокровных.

4. Используя отработанные методики идентификации микроспоридий, изучить распространение микроспоридиоза у ВИЧ-инфицированных пациентов Больницы им. Боткина, СПб, Россия; отработать и применить на практике методы диагностики микроспоридий человека, определить распространенность и идентифицировать виды у экспериментальной группы пациентов.

5. Изучить функциональную морфологию аппарата Гольджи микроспоридий как структурной основы для образования и дальнейшего совершенствования аппарата экстррузии – синапоморфии, обеспечившей распространение микроспоридий как внутриклеточных паразитов почти всех групп животных.

6. На клеточных моделях «микроспоридии *E. cuniculi* и *V. corneae* – культура макрофагов человека» получить экспериментальное подтверждение гипотезе об ингибировании апоптозного каскада клетки хозяина как универсального механизма патогенеза микроспоридиоза.

#### **Научная новизна исследования**

Описано 12 новых видов и выделено 6 новых родов микроспоридий (M) (*Apotasporea*; *Kneallhazia*, *Larssonia*, *Liebermannia*, *Mockfordia* и *Paranosema*); 30 сиквенсов депонированы в Генбанке. Впервые изучена специфическая организация «минимальной» секреторной системы микроспоридий, на базе которой сформировались основные компоненты аппарата экстррузии. На примере M показано, что секреторная система эукариотической клетки может функционировать в отсутствие системы anterograde и retrograde везикулярного транспорта. Впервые на клеточной системе с 2 видами M, патогенными для человека, методом количественного ПЦР с обратной транскрипцией проанализирована экспрессия 84 генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, выявлены пути модуляции клеточного цикла микроспоридиями и показана способность ингибировать митохондриальный сигнальный путь апоптоза клетки хозяина.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В диссертационной работе обобщены данные по клеточной биологии, эволюции и биоразнообразию микроспоридий, накопленные за 3 последних десятилетия – впервые после трудов И.В. Исси (Исси, 1986, 1987). Материалы диссертации использованы в лекциях и практических занятиях Кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ и для подготовки следующих коллективных монографий: (1) «The Microsporidia and Microsporidiosis», ASM Press, Washington, 1990; (2) «Патогены насекомых: структурные

и функциональные аспекты», Круглый Год, Москва, 2001; (3) «The Golgi Apparatus. State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery», Springer, Wien, 2008; (4) «Microsporidia: Pathogens of Opportunity», Wiley & Sons, New York, 2014. Описанная в диссертации ультраструктура жизненного цикла *Paranosema locustae* и ее интерпретация вошли в учебник паразитологии «Foundation of Parasitology» (Roberts, Janovi, 2004; Schmidt, Roberts, Janovi, 2009, 2013) – базовый учебник паразитологии для университетов США.

Методики идентификации М успешно применены для диагностики микроспоририозов и идентификации видов в экспериментальной группе пациентов Инфекционной больницы им. С.П. Боткина, СПб, Россия.

Описание новых родов и видов М, уточнение жизненных циклов, структурной организации клетки, а также выяснение филогенетического положения и эволюционных связей этих паразитов имеет собственную теоретическую ценность и важно для построения естественной системы микроспоририид, а также оценки их роли в различных биологических сообществах. Изучение М насекомых, вредящих здоровью и хозяйственной деятельности человека, *Kneallhazia solenopsae* – паразитов огненных муравьев и *Nosema disstriae* – паразита кольчатого коконопряда, карантинного вредителя леса в Канаде и России, позволило разработать методы диагностики этих М и помогло оценить их роль в снижении численности хозяев. Изучение микроспоририды *Agmasoma repaei*, паразита креветок *Litopenaeus setiferus*, промышленно добываемых в Мексиканском заливе, выявило широкую распространенность инфекции в Луизиане (США) и необходимость ее диагностики и профилактики. Исследование функциональной морфологии аппарата Гольджи, начатое в рамках проекта, руководимого автором и поддержанного грантом ИНТАС (2000-2003 гг «Structural organization of Golgi compartment in Microsporidians: one more example of a minimal secretory system?»), было пионерским и теоретически важным для изучения секреторного транспорта эукариот. Оно показало, что М представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. Уникальность этой модели состоит, с одной стороны, в гипертрофии транс-компартамента Гольджи и его трансформации в основную органеллу клетки М на стадии споры (аппарат экструзии), а с другой – в «минимизации» секреторного транспорта, выраженной, в частности, в элиминации эндосомального пути, везикулярного транспорта и O-гликозилирования. Сравнительное изучение влияния заражения двумя видами М на индукцию апоптоза в макрофагах и экспрессию генных кластеров,

ответственных за регуляцию апоптоза, проведено впервые и показало подавление митохондриального сигнального пути апоптоза обоими видами при наличии видоспецифичных механизмов регуляции клеточного цикла хозяина. Эти исследования имеют важное теоретическое значение для понимания механизмов патогенеза микроспориоза, а также расширяют представления о многообразии ответных реакций макрофагов на инфекцию эукариотическими микробами.

### **Практические рекомендации**

В результате исследований по диагностике микроспориозов человека разработаны и предложены клинические методы тестирования на микроспориоз, показанные для ВИЧ-инфицированных пациентов с симптомами «диарей неясной этиологии» и с пониженным титром т-лимфоцитов (число CD4 клеток <100). Микроспориоз в России ранее не идентифицировался. Также разработан экспресс-метод оценки зараженности колоний огненных муравьев микроспоридами, который рекомендован и применяется для изучения распространенности *Kneallhazia solenopsae* и других видов микроспориозов муравьев.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

I. Диверсификация микроспориозов, как и других паразитов, в целом, следует за диверсификацией хозяев, а направления приспособительной эволюции представителей всех пяти филогенетических групп типа Microsporidia, изученных автором, определяются: (1) типом паразитируемой ткани; (2) жизненными циклами паразита, которые модулируются экологическими предпочтениями хозяина и реализуются с помощью присутствия (или выпадения) промежуточного хозяина, формирования спор различного строения, а также чередования морфотипов спор и типов развития; (3) местообитанием хозяина: так, для паразитов всемерно распространенных морских Decapoda свойственно менее дискретное видообразование, характеризующееся формированием «клинов» постепенно изменяющихся видов со слабо выраженными морфологическими и генетическими различиями.

II. Род *Encephalitozoon*, три вида которого патогенны для млекопитающих, включая человека, а два других – естественные паразиты рептилий, – это единственный род микроспориозов, имеющий историю паразитирования у позвоночных животных, в отличие от всех других родов микроспориозов, филогенетически связанных исключительно с беспозвоночными хозяевами.

III. Инвазионная трубка парамикроспориозов, манубриум мечниковеллид и совершенная полярная трубка высших микроспориозов, обеспечившая этой группе широкое распространение среди практически всех групп беспозвоночных животных,

представляют собой ряд гомологичных органелл – дериватов транс компартмента аппарата Гольджи. Белки микроспоридий секретируются и транспортируются с помощью тубулярных сетей, которые гомологичны Гольджи компартменту других эукариот и возникают *de novo* на последовательных стадиях жизненного цикла у спороплазм, меронтов и споронтов. Внутриклеточный транспорт осуществляется с помощью механизма прогрессивного созревания цистерн, без участия везикул, что хорошо соответствует редуцированному репертуару белков окаймленных пузырьков в геномах микроспоридий.

IV. Подавление митохондриального сигнального пути апоптоза и модуляция клеточных циклов зараженных клеток – базальные и универсальные механизмы патогенеза микроспоридий, выраженные в разной степени у разных видов. Именно выработка совершенного механизма подавления апоптоза фагоцитирующих клеток, целевых для *Encephalitozoon* spp., вероятно, позволила представителям этого рода перейти к паразитированию в высших позвоночных.

#### **Степень достоверности результатов**

Степень достоверности полученных данных определена статистическим анализом, воспроизводимостью экспериментов, использованием сертифицированных приборов и реактивов надежных производителей, а также сопоставлением полученных данных с данными других авторов, опубликованными в открытой печати, и с сиквенсами, депонированными в Генбанке. Кроме того, материалы, содержащиеся в диссертации, опубликованы в международных журналах, что подразумевает тщательное рецензирование статей экспертами перед публикацией. Материалы диссертации регулярно представлялись и оценивались экспертами на ведущих международных и российских форумах.

#### **Апробация**

Материалы диссертации были представлены на следующих российских и международных форумах: I и II Всероссийских съездах по защите растений (Санкт-Петербург, 1995, 2005); Всероссийской научной конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина» (Москва, 1998); Всероссийском симпозиуме «Клеточная биология на рубеже 21-го века» (Санкт-Петербург, 2000); семинарах Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2005, 2010, 2016); Всероссийском Паразитологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2018); семинаре Лаборатории паразитологии Зоологического института РАН (Санкт-Петербург, 2018), а также на III, IV, VII, VIII, X и XII Международных совещаниях по оппортунистическим инфекциям (Кливленд, США, 1994; Туссон, США, 1996;

Цинциннати, США, 2001; Хило, США, 2003; Бостон, США, 2007; Тэрритаун, США, 2012); III и VII Европейских протистологических конгрессах (Эльсинор, Дания, 1999; Санкт-Петербург, Россия, 2007); Объединенном совещании по микроспоридиям беспозвоночных и позвоночных хозяев (Ческе-Будеёвице, Чехия, 2004); XI Международном протозоологическом конгрессе (Зальцбург, Австрия, 2004); 37-м, 38-м, 42-м, 47-м, 48-м, 49-м и 50-м ежегодных Конгрессах по патологии насекомых (Хельсинки, Финляндия, 2004; Анкоридж, США, 2005; Парк-Сити, США, 2009; Майнц, Германия, 2014; Ванкувер, Канада, 2015; Тур, Франция, 2016; Сан-Диего, США, 2017); 52-м ежегодном Энтомологическом конгрессе (Солтлэйк-Сити, США, 2004); 57-м ежегодном конгрессе Американского общества тропической медицины и гигиены (ASTMH) (Новый Орлеан, США, 2008; 96-й конференции Американской ассоциации иммунологов (Сиэтл, США, 2009).

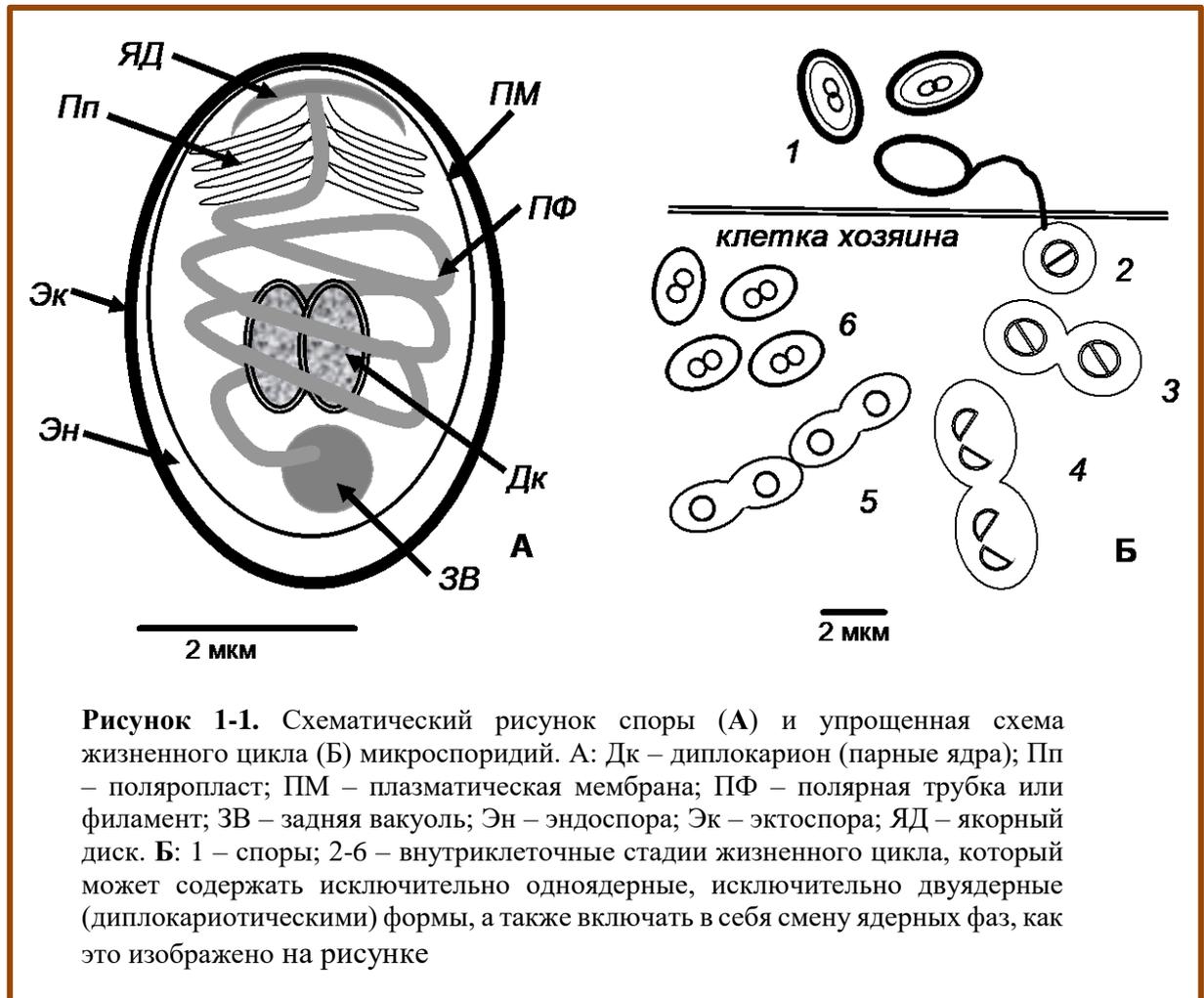
**Публикации.** Материалы диссертации отражены в 68 публикациях, из них 62 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, 2 – в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК. Результаты работы доложены и опубликованы в тезисах более чем 30 международных и российских конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 278 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 53 сложных рисунка (>200 индивидуальных рисунков). Работа состоит из введения, пяти глав: (1) обзора литературы, (2) главы, описывающей материалы и методологию исследований и (3–5) 3-х глав, обобщающих результаты собственных исследований, а также списка литературы (484 источника) и Приложения, содержащего список работ автора по теме диссертации и дополнительный иллюстративный материал к главам №№ 3–5.

# ГЛАВА 1. БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ, ФИЛОГЕНИЯ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ МИКРОСПОРИДИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Актуальные проблемы цитологии и клеточной биологии микроспоридий

### 1.1.1. Спора микроспоридий и способ заражения клетки хозяина



Отличительным признаком представителей типа *Microsporidia* является спора, единственная внеклеточная стадия паразита. Спора оснащена уникальным набором органелл – «аппаратом экстррузии», позволяющим эффективно заражать клетки-мишени и давать начало внутриклеточной пролиферативной части жизненного цикла (Рис.1-1.). Инфицирование хозяина происходит в результате процесса, называемого «герминацией».

Конечный этап герминации - выброс (= выстреливание, экстррузия, эксфиламентация) полярной трубки (также называемой полярным филаментом), через

которую, как через иглу шприца, зародыш-спороплазма инъецируется в цитоплазму клетки хозяина<sup>1</sup>.

Систематика микроспоридий в значительной степени базируется на варибельности морфологии спор. Размеры спор варьируют от 1 мкм у микроспоридии человека *Enterocytozoon bieneusi* до 40 мкм у паразита пресноводных олигохет *Bacillidium filiferum*. Вариации формы спор и разнообразие придатков, особенно у паразитов водных беспозвоночных, поражают своей причудливостью (Issi, 1986; Vávra, Larsson, 1999). Подавляющее большинство видов все же имеют овальные споры 3–8 x 1–4 мкм (Canning, Vávra, 2000). Внутривидовая изменчивость спор одного типа незначительна, однако многие виды микроспоридий полиморфны (что стало известно сравнительно недавно), т.е. формируют несколько типов спор, морфологически не похожих друг на друга. Это давало и дает основание для многочисленных ошибок, когда при находке полиморфного вида на основании различной морфологии спор описываются новые виды. Секвенирование малой субъединицы рибосомального гена (МСрДНК) постепенно становится необходимым атрибутом описания новых форм и позволяет избежать подобных ошибок. Данные по строению спор и других стадий развития, полученные на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях, обобщены ранее (Issi, 1986; Vávra, Larsson, 1999; Vávra, Larsson, 2014). Я же остановлюсь на структурно-функциональных аспектах биологии клетки микроспоридий, пока не обобщенных в обзорах.

#### ***Структурные особенности и предполагаемые функции оболочки споры.***

Оболочка (клеточная стенка) определяет устойчивость спор к неблагоприятным факторам внешней среды и обеспечивает долговременное сохранение инвазионности паразита вне организма хозяина. Она также играет важную и не до конца понятную роль в запуске каскада реакций, приводящих к активации аппарата экстрезии и выбросу полярной трубки. Механические свойства оболочки обеспечивают устойчивость к высокому гидростатическому давлению, которое создается во время экстрезии. Оболочка состоит из плазматической мембраны и двух слоев внеклеточного матрикса: эндоспоры и экзоспоры. Эндоспора, средний слой оболочки споры, на ультратонких срезах имеет низкую электронную плотность и, как было показано методами

---

<sup>1</sup> Для описания механизма проникновения полярной трубки через мембрану клетки хозяина до сих пор не существует приемлемой гипотезы

замораживании-травления, замораживания-замещения и с помощью разнообразных цитохимических подходов, представляет собой сложную пористую структуру, состоящую из  $\alpha$ -хитина и белка. Наружный слой оболочки – электронноплотная экзоспора, состоит, главным образом, из белка, структурированного в виде фибрилл и гранул (Bigliardi et al., 1996; Vávra, Larsson, 1999). В состав экзоспоры, по крайней мере у некоторых видов микроспоридий из морских рыб и беспозвоночных (например, *Spraguea lophii*, *Thelohania* spp. из голубого краба *Callinectes* sp.), входит кератин. Было показано, что у этих видов во время герминации происходит разборка поверхностного высокоорганизованного слоя кератина с высвобождением филаментов толщиной 8-10 нм, состоящих из фосфорилированной формы кератина (Weidner, Halonen, 1993). Эндоспора имеет меньшую толщину в передней части споры, где предположительно располагаются рецепторы, воспринимающие сигналы, запускающие механизм герминации (Weidner et al., 1999). К настоящему времени идентифицировано несколько белков оболочки спор, в основном, у представителей рода *Encephalitozoon*. Мажорный компонент экзоспоры, гликопротеин SWP1 размером 40-55 кДа, выявлен у представителей рода *Encephalitozoon* (Hayman et al., 2001; Southern et al., 2006, 2007) и у *Paranosema grylli* (Dolgikh et al., 2005). Этот белок отсутствует у ранних пролиферативных стадий (меронтов) и начинает экспрессироваться при переходе к спорогонии, когда формируется оболочка будущей споры (Bohne et al., 2000). Он локализуется в оболочке поздних споронтов, споробластов и в незначительном количестве на поверхности экзоспоры зрелых спор (Dolgikh et al., 2005; Hayman et al., 2001). У *P. grylli* при активации спор происходит сольюбилизация этого белка в условиях, идентичных оптимуму герминации. Предполагается, что сольюбилизация мажорного белка – необходимый этап герминации, предположительно способствующий повышению проницаемости оболочки и притоку воды. Кроме того, этот процесс может рассматриваться как дополнительный механизм предотвращения несвоевременной или неспецифической экстрезии, так как сольюбилизация белка происходит только при наличии адекватного стимула (например, повышенных значений pH в кишечнике насекомого, где в норме происходит выстреливание спор *P. grylli*) (Dolgikh, Semenov, 2003; Dolgikh et al., 2005; Hayman et al., 2001). Анализ кодирующих белок SWP1 последовательностей у *Encephalitozoon* spp. показал, что белок состоит из 450 аминокислот и не гомологичен известным белкам, представленным в базах данных Genebank и др. (Bohne et al., 2000; Hayman et al. 2001). У *E. intestinalis* идентифицирован второй белок экзоспоры SWP2, размером 150 кДа, гомологичный белку SWP1. Этот гликопротеин присутствует в поздних споронтах и выявляется в максимальных

количествах в экзоспоре зрелых спор. Ген этого белка содержит десять повторов нуклеотидов, кодирующих цистеин в N-терминальной зоне, и другие многочисленные нуклеотидные повторы с неизвестными функциями. Белки эндоспоры изучались исключительно у *Encephalitozoon* spp. Среди них – O-гликозилированный белок EnP2 размером 20-22 кДа; белок EnP3 (30кДа), связанный с плазматической мембраной споры с помощью глюкозил-фосфатидилиинозитольных (ГФИ) доменов и хитин деацетилаза EcCDA (в двух изоформах 33 и 55 кДа) (Peuvel-Fanget et al., 2006; Xu et al., 2006), и, наконец, EnP1 (39-40 кДа) – наиболее интересный и функционально значимый белок эндоспоры. Этот белок, в отличие от других белков оболочки, не гликозилирован. Он богат цистеином, что может говорить о его структурной функции в укреплении клеточной стенки с помощью бисульфидных связей. Белок локализуется в зрелых спорах – в эндоспоре, на поверхности экзоспоры, а также в якорном диске, структуре, удерживающей основание полярной трубки во время выворачивания трубки. Последовательности, кодирующие EnP1 у *E. cuniculi* и *E. hellem* идентичны на 61.5%, при этом они не имеют существенной гомологии с другими известными белками. Белок содержит сигнальные пептиды, указывающие на транспорт к плазмалемме, однако в нем отсутствуют трансмембранные домены. Недавно также продемонстрировано, что белок EnP1 *E. cuniculi* и *E. hellem* участвует в адгезии спор к поверхностям клетки-мишени, являясь лигандом для сульфатированных гликанов (гликозаминогликанов). Для *Encephalitozoon* spp. адгезия спор к поверхности клетки – начальный этап процесса заражения, предшествующий выбросу полярной трубки. EnP1 взаимодействует с экстрацеллюлярным матриксом с помощью N-концевой группы (N-terminalheparin-bindingmotives) (Hayman et al., 2005; Southern et al., 2006, 2007). Было показано, что EnP1, локализованный в якорном диске, не только осуществляет взаимодействие с поверхностью клетки, но и обеспечивает оптимальную для успешного заражения ориентацию направления выворачивания трубки. Вероятно, наличие «участков связывания гепарина» позволяет этому белку взаимодействовать также с гликанами хитинового компонента эндоспоры, участвуя в формировании белково-хитиновых комплексов в качестве структурного белка (Southern et al., 2007). Высказано пока не подтвержденное предположение, что специфичность микроспоридий по отношению к хозяевам и тканям связана со способностью утилизировать различные гликозаминогликаны для адгезии с помощью специализированных лигандов (Southern et al., 2006).

Важная функция оболочки споры – восприятие внешнего стимула, который запускает сигнальный каскад, приводящий к выстреливанию споры. Механизмы и

последовательность реакций этого сигнального пути остаются, в основном, неясными. Стимулы активации часто видоспецифичны и, видимо, зависят от экологических адаптаций паразита. Это может быть изменение концентрации ионов водорода или других катионов и анионов, например, при попадании споры в кишечник или в непосредственную близость от клетки-мишени, или механическое давление (Keohane, Weiss, 1998, 1999). Роль оболочки в проведении внешнего сигнала, запускающего выброс полярной трубки, наиболее подробно изучена на микроспоридии *Spraguea lophii*, паразитирующей в нейронах морских рыб рода *Lophius*. Сигнальный каскад у этого вида запускается сдвигом рН в щелочную область, что требует присутствия ионов  $Ca^{2+}$  и полианионных молекул типа муцина (воротами инфекции *S. lophii* служат нервные окончания, расположенные в кожных железах, продуцирующих муцин) (Pleshinger, Weidner, 1985; Weidner, Halonen, 1993). Показано, что активация спор у других видов стимулируется повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция и активацией кальциевых каналов, расположенных на внутренней мембранной оболочке споры и мембранах поляропласта (Undeen, 1990; Weidner et al., 1999), и включает в себя связывание кальмодулина на апикальной поверхности споры (Weidner, Byrd, 1982). С помощью иммунофлуоресцентного теста (IFA) и иммуноблотинга в мембране оболочки, подстилающей эндоспору *S. lophii*, выявлены белки, предположительно связанные с сигнальным каскадом: G-белки, кальмодулин и кальмодулин киназа, а также легкая и тяжелые цепи клатрина (Weidner et al., 1999). Эти белки локализованы в инвагинациях мембраны оболочки, напоминающих кавеолы, центры сигнальной трансдукции многих эукариотических клеток (Anderson, 1993). Мембрана оболочки спор содержит кальциевые каналы, так как верапомил, блокатор кальциевых каналов, эффективно блокировал выброс спорами ПТ (Pleshinger, Weidner, 1985). Кальцевые каналы расположены в апикальной части споры – в зоне так называемой полярной апертуры, примыкающей к основанию якорного диска (Weidner et al., 1999). Экспериментально показано, что хлорпромазин и трифлуороперазин, антагонисты кальмодулина и кальциевых каналов, блокировали активацию спор. Эти факты, а также разборка и фосфорилирование поверхностного слоя кератиновых филаментов во время активации спор могут говорить о вовлечении в этот процесс кальций/кальмодулин активирующей киназы (САМ-киназа), сайты связывания которой находятся на кератиновых фибриллах экзоспоры. Характеристики САМ-киназы, продемонстрированные с помощью иммуноблотинга, выявили сходство этой киназы с САМ-киназой II (Weidner, Halonen, 1993), мультифункциональным ферментом, который у млекопитающих ассоциирован с кальций-зависимым сигнальным каскадом (Charman et al., 1995). Следует добавить, что

расшифровка генома *E. cuniculi* выявила гены пяти кальмодулин-зависимых киназ (из 32 протеин-киназ дрожжей), которые могли бы участвовать в этом процессе (Miranda-Saavedra et al., 2007). Как только ионы  $Ca^{2+}$  проникают через оболочку внутрь споры, они запускают внутренний сигнальный каскад, который приводит к выбросу полярной трубки.

**Аппарат экструзии споры и механизм заражения клетки хозяина.** Итак, спора микроспоридий содержит специализированный комплекс органелл, называемый аппаратом экструзии (АЭ), который обеспечивает доставку инфекционного начала (спороплазмы) внутрь клетки хозяина в результате многоступенчатого процесса, называемого герминацией. Этот процесс состоит из серии последовательных событий: (1) «активация» – специфический стимул инициирует передачу сигнала активации внутрь споры, что ведет к биохимическим и структурным перестройкам, в первую очередь, к повышению внутриспорового давления, изменению конформации белков полярной трубки, разбуханию поляропласта и задней вакуоли; (2) собственно выброс полярного филамента и его превращение в полую трубку благодаря способности белков трубки к самосборке; (3) прохождение спороплазмы через просвет этой трубки (экструзия спороплазмы) (Keohane, Weiss, 1999). При оптимальных для паразита условиях процесс герминации заканчивается попаданием спороплазмы в клетку хозяина.

Центральный элемент АЭ – полярный филамент или полярная трубка<sup>2</sup>, основание которого – якорный диск, служит для закрепления трубки внутри споры во время выстреливания. Наличие полярной трубки в споре – основной признак принадлежности организма к типу Microsporidia. В выброшенном состоянии длина трубки варьирует от 50 до 500 мкм, а ее диаметр – от 0.1 до 0.2 мкм (может достигать 0.6 мкм в месте прохождения спороплазмы). Скорость выстреливания полярной трубки примерно 105 мкм/сек (Frixione et al., 1992; Keohane, Weiss, 1999). Следует отметить, что у отдаленных родственников микроспоридий со сходным образом жизни – одноклеточных паразитических грибов – также имеются внешне сходные трубковидные структуры, предназначенные для заражения клетки-мишени, такие как аппресориум паразитических

---

<sup>2</sup> Термины полярная трубка и полярный филамент обозначают одну и ту же органеллу и используются как синонимы. Более правильно, однако, использовать термин «полярный филамент», если органелла находится внутри клетки. При «выстреливании» происходит превращение филамента в полую трубку согласно механизму, предложенному Ваврой (Vavra, J., Larsson, R., Structure of Microsporidia. In: M. Wittner, L. M. Weiss, Eds.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington DC, 1999, pp. 55-77.

аскомицетов (например, у *Magna porthegrisea*) или герминальная трубка хитрид (например, *Rozella allomyces*). Однако у грибов эти структуры представляют собой видоизмененные клеточные выросты, окруженные плазматической мембраной (de Jong et al., 1997). У микроспоридий же полярная трубка – это самостоятельная клеточная органелла, формирующаяся в ходе внутриклеточного развития паразита из модифицированного аппарата Гольджи (см. Главу 4). Белки полярной трубки относятся к особому семейству белков, специфичных исключительно для микроспоридий. В настоящее время выделены и охарактеризованы три белка этого семейства, РТР1 (polar tube protein 1), РТР2 и РТР3. Эти белки не гомологичны ни одному из белков, представленных в базах данных BLAST и PFAM. Между собой белки полярной трубки также демонстрируют низкую степень сходства. Их объединяет наличие сиквенсов, кодирующих N-терминальные сигнальные последовательности, которые характерны для белков, транспортируемых через плазматическую мембрану (т.е. в клетку хозяина) (Delbac et al., 1997, 1998a, 1998b, 2001; Dolgikh, Semenov, 2003; Dolgikh et al., 2005, Katinka et al., 2001; Peuvel et al., 2002). Белки полярной трубки взаимодействуют друг с другом во время выстреливания, что играет важную роль в сборке и функционировании органеллы (Bouzahzah et al., 2010). По-видимому, именно в результате такого взаимодействия во время выброса изменяется текучесть белкового матрикса и происходит его структурная стабилизация в виде полой трубки, что было описано более 30 лет назад (Findley et al., 2005; Keohane, Weiss, 1999; Weidner, Byrd, 1982; Weidner et al., 1984).

Процессу повышения внутриспорового давления при гермиации, вероятно, предшествует быстрая транспортировка воды внутрь споры через внутримембранные аквапориновые каналы (Frixione et al., 1997). Косвенным доказательством участия аквапоринов в водном транспорте служит наличие в геноме *E. cuniculi* гена, кодирующего белок-аквапорин (Katinka et al., 2001), а также способность этого гена вызывать увеличение проницаемости мембран ооцита *Xenopus laevis* в гетерологичной клеточной системе (Ghosh et al., 2006).

Вода, возможно, направляется внутрь споры вследствие повышения внутриспорового осмотического давления. По крайней мере у нескольких видов микроспоридий, паразитирующих в пресноводных насекомых, повышение осмотического давления происходит благодаря расщеплению запасящего дисахарида трегалозы на две молекулы глюкозы ферментом трегаллазой (Undeen et al., 1987). В спорах таких видов демонстрировали высокие концентрации трегалозы и трегаллазы (Weidner et al., 1999). Экспериментально показано, что во время герминации спор

микроспоридии *Anncaliia* (= *Brachiola*) *algerae* содержание трегаллозы падает, концентрация глюкозы возрастает, при этом осмотическое давление внутри споры поднимается в 3.5 раза (Undeen, Vander Meer, 1994, 1999). В повышении внутриспорового давления, по-видимому, также принимает участие задняя вакуоль, которая при выстреливании споры значительно увеличивается (Lom, Vávra, 1963). Согласно теории, разработанной на микроспоридии *Spraguea lophii* из морских рыб, ключевым моментом герминации служит разбухание задней вакуоли в результате резкого увеличения содержания перекиси водорода, мгновенно расщепляющейся на воду и кислород. Авторы этой теории предполагают, что задняя вакуоль представляет собой видоизмененную пероксисому, в которой под действием адекватного стимула начинает продуцироваться  $H_2O_2$  в результате расщепления длинноцепочечных жирных кислот. В задней вакуоли выявлены ключевые ферменты пероксисом (каталаза и ацил-КоА оксидаза), которые выходят во внешнюю среду после выброса полярной трубки (Findley et al., 2005). Косвенным доказательством распространенности такого механизма может служить тот факт, что добавление перекиси водорода вызывает выброс полярных трубок у многих видов микроспоридий (Keohane, Weiss, 1999; собственные наблюдения).

Возросшее внутриспоровое давление вызывает разрыв переднего наиболее тонкого участка оболочки, раскручивание и выброс полярной трубки. Этот процесс сопровождается выворачиванием наружу внутренних слоев трубки и расширением ее просвета (Lom, Vávra, 1963). В просвет трубки втягиваются последовательно мембраны поляропласта, цитоплазма зародыша и, в последнюю очередь, ядро зародыша. Спороплазма внутри споры не имеет собственной мембраны, а плазмалемма, подстилающая стенку споры, остается внутри пустой оболочки после экструзии. Спороплазма продвигается по полярной трубке и входит в сформированный мембранами поляропласта пузырек (Weidner et al., 1984, 1995, 1999).

**Проникновение в клетку хозяина и особенности внутриклеточного метаболизма спор.** Выброс полярной трубки происходит с силой, достаточной для прохождения через клеточную мембрану клетки хозяина. Механизм прохождения полярной трубки и спороплазмы через мембрану остается неясным. В культуре клеток млекопитающих показано, что для успешного заражения *E. cuniculi* клетки хозяина необходимо взаимодействие между гликозилированным участком РТР1 в дистальном участке полярной трубки и лектиновыми рецепторами, расположенными на поверхности клетки-мишени (Xu et al., 2003). Предполагается, что такое взаимодействие приводит к фагоцитозу кончика трубки и, возможно, спороплазмы. Для *Encephalitozoon* spp.

продемонстрировано, что белки оболочки спор взаимодействуют с глюкозаминогликанами клеточной поверхности, способствуя «правильной» ориентации спор для успешного заражения (Southern et al., 2006).

Выброс полярной трубки происходит менее чем за 2 секунды (Fraxione et al., 1992) и требует энергетических затрат, источник которых не определен. Предполагается, что этот процесс в значительной степени происходит механически за счет резкого повышения осмотического давления. Однако очевидно, что отдельные этапы герминации, например, полимеризация белков полярной трубки при ее удлинении во время выброса, не могут обходиться без участия АТФ (Keohane, Weiss, 1999; Weidner, Byrd, 1982). В отличие от внутриклеточных стадий, транспортирующих АТФ из клетки хозяина (Tsaousis, et al., 2008), споры должны сами восполнять потребности в АТФ, например, за счет гликолиза. Споры микроспоридий нельзя назвать “покоящейся стадией”, т.к. уровни метаболической активности изученных ферментов, в том числе – пяти ферментов гликолиза, в спорах достоверно выше, чем во внутриклеточных стадиях (Dolgikh et al., 1997), а активность пируватдегидрогеназы E1, единственного фермента, связанного с катаболизмом пирувата, представленного в геноме микроспоридий, выявлена исключительно в спорах (Dolgikh et al., 2009). Вероятно, именно катаболизм глюкозы обеспечивает энергией жизнеспособность спороплазмы и постоянную готовность споры к выбросу полярной трубки. В спорах отсутствуют запасные питательные вещества, типичные для переживающих стадий других одноклеточных паразитов – амёб, грегаринов, аделиновых кокцидий. Как же запасается энергия, поддерживающая существование споры, иногда в течение нескольких лет, в состоянии “боевой готовности”? Для спор микроспоридий, паразитирующих в насекомых, основным запасным “топливом” служит дисахарид трегалоза. Высокие концентрации трегалозы и трегаллазы (фермента, расщепляющего трегалозу) показаны для спор *Nosema apis* (Vandermeer, Gochner, 1971) и *Anncaliia algerae* (Undeen et al., 1987). Количественный анализ изменения соотношения трегалоза/глюкоза указывает на высвобождение значительного количества моносахарида в процессе выброса полярной трубки (Undeen, 1990; Undeen, Vandermeer, 1994). Возможно, именно высвобождение субстрата для катаболических процессов в результате расщепления трегалозы имеет универсальное значение для физиологии микроспоридий (Weidner et al., 1999). Использование резкого возрастания осмотического давления за счет повышения концентрации глюкозы как триггера для выброса полярной трубки характерно лишь для нескольких видов, паразитирующих в пресноводных беспозвоночных (Undeen, 1990), и может рассматриваться как вторичная адаптация.

**Организация спороплазмы.** Спороплазму можно рассматривать и как клетку-зародыш, содержащую ядро, окруженное участком цитоплазмы, и как специализированную органеллу для переноса генетической информации из споры в клетку хозяина. Наиболее интересная особенность спороплазм – отсутствие собственной плазматической мембраны. На нескольких видах микроспоридий показано, что спороплазма ограничена «тонкой» (70 нм) мембраной, подобной мембранам внутриклеточных органелл, например, эндоплазматического ретикулума. Другая структурная особенность спороплазм – наличие специализированной органеллы, называемой MIN (Multilayered Interlaced Network, многослойная переплетающаяся сеть) (Cali et al., 2002; Takvorian et al., 2005). Эта структура хорошо заметна в спороплазмах, оказавшихся во внешней среде, например, в культуральной жидкости при заражении культуры клеток. Она расположена на периферии спороплазмы и ассоциирована с концом полярной трубки. На основании структурного сходства авторы предполагают, что эта структура идентична транс-Гольджи сети (Trans-Golgi Network), располагающейся на заднем полюсе споры. Позже было показано, что MIN – дериват Гольджи, и, по мнению авторов, именно эта структура ответственна за морфогенетические и синтетические процессы, протекающие в органеллах клетки микроспоридий на ранних этапах внутриклеточного развития, в том числе и за модификацию плазмалеммы (Takvorian et al., 2013). На экспериментальной системе микроспоридия *Anncaliia (Brachiola) algerae* – культура клеток млекопитающих показано, что после внедрения в клетку хозяина уже через несколько минут внешняя мембрана спороплазмы утолщается, MIN исчезает или трансформируется в крупные толстостенные пузырьки, клетка увеличивается в размере и приобретает вид ранней пролиферативной стадии – меронта. Через 30 минут после добавления инициированных спор в культуру (т.е. не более чем через 15-20 минут после внедрения в клетку) меронты приступает к делению. Спороплазма – кратковременная и поэтому малоизученная стадия, крайне редко попадающая на срезах инвазированных тканей при ультраструктурных исследованиях зараженных хозяев. Мне удалось исследовать структуру спороплазм микроспоридии *Kneallhazia solenopsae* (Sokolova, Fuxa, 2008) в половой системе самок огненного муравья, и она оказалась сходной с таковой *A. (Brachiola) algerae*. Экспериментально показано, что, когда спороплазма попадает в клетку хозяина, ее внешней мембраной служат мембраны поляропласта, т.е. внутренние (по происхождению) мембраны споры (Weidner et al., 1999). Меньшая по сравнению с плазмалеммой толщина, отсутствие холестерина и сайтов связывания лектина, а также наличие динактин-динеиновых комплексов (Weidner et al., 2001), которые в

эукариотических клетках обеспечивают связь между «-» концом микротрубочек и мембранами органелл, свидетельствуют о принадлежности оболочки спороплазмы к пулу внутренних мембран. Такая уникальная структура клеточной мембраны спороплазм, по-видимому, предотвращает атаку лизосомной системы хозяина и способствует интеграции паразита в инвазированную клетку. Этот аспект клеточной биологии микроспоридий чрезвычайно интересен и требует дальнейшего изучения. Интересные данные получены при попытках кратковременного культивирования выделенных спороплазм (Scarboroughbull, Weidner, 1985; Weidner, Trager, 1973). В обогащенной культуральной среде RPMI 1640 удалось достичь стабилизации спороплазм *Spraguea lophii* в течение нескольких часов и даже наблюдать начало деления и эндоцитозную активность. Необходимым условием поддержания жизнеспособности спороплазм было наличие в культуральной жидкости АТФ, НАД, ГТФ, а также сахаров, глюкозы и рибозы.

**Внутриклеточные стадии и их органеллы.** Внутриклеточные стадии развития, меронты (ранние пролиферативные стадии) и споронты (поздние пролиферирующие стадии), в отличие от спор, устроены просто: рутинная электронная микроскопия выявляет в них лишь несколько базовых органелл – плазматическую мембрану, ядро, эндоплазматический ретикулум и немногочисленные тубулярно-везикулярные структуры. Упрощенная ультраструктура этих клеток подтверждала заключение о «примитивности» микроспоридий (Vossbrinck et al., 1987), а позже привела к взгляду на микроспоридий как на модель «минимальной клетки», сохранившей лишь самые необходимые функции (Fedorov, Hartman, 2004).

**Плазматическая мембрана (ПМ).** ПМ на ранних пролиферативных стадиях (меронтах) представляет собой стандартную для эукариотических клеток трехслойную плазмалемму толщиной 7-8 нм. Часто она несет многочисленные трубчатые выросты, увеличивающие площадь контакта с клеткой хозяина (Vávra, 1976a). Почти у всех видов ПМ образует контакты с внешней мембраной митохондрий клетки хозяина и реже с эндоплазматическим ретикулумом, что хорошо согласуется с энергетической зависимостью микроспоридий от клетки хозяина и наличием в ПМ микроспоридий многочисленных мембранных переносчиков, в том числе, АДП/АТП транслоказ (Williams et al., 2014). У некоторых видов, в частности, у представителей Tubulonosematidae, ПМ покрыта слоем электронноплотного гликокаликса, формирующего трубчатые структуры (Franzen et al., 2005). На определенной стадии жизненного цикла на поверхности ПМ начинает откладываться электронно-плотный материал, в дальнейшем участвующий в формировании оболочки споры и ее выростов.

Появление электронноплотного материала на ПМ обычно (но не всегда) указывает на окончание мерогонии и начало второй стадии жизненного цикла – спорогонии, которая представлена тремя основными клеточными морфотипами: делящимися споронтами, неделящимися сопоробластами, постепенно дифференцирующимися в зрелые споры (Vávra, Larsson, 1999, 2014).

**Ядро, мейоз и смена ядерных фаз.** Ядро микроспоридий имеет круглую, овальную или подковообразную форму; окружено двухслойной оболочкой с многочисленными порами, как у других эукариот. Две мембраны ядерной оболочки, разделенные перинуклеарным пространством, представляют собой важный компартмент клетки микроспоридий, активно участвующий в секреторном транспорте меронтов и споронтов (Sokolova et al., 2001; Соколова и др., 2001). Размеры ядер значительно варьируют в ходе жизненного цикла: от одного до 5 мкм в диаметре. На протяжении большей части жизненного цикла хроматин не конденсирован, нуклеоплазма выглядит однородной. Хромосомы слабо конденсируются при делении клеток паразита. Основной тип деления пролиферирующих стадий: закрытый криптомитоз. Центры организации микротрубочек представлены центриолярными пластинками, встроенными в ядерную оболочку (Vávra, Larsson, 2014). Методом электрофореза в пульсирующем поле (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) количество хромосом определено лишь у нескольких видов микроспоридий; так, у *Encephalitozoon cuniculi* их 11 (Biderre et al., 1999), а у *Paranosema grylli* – 17 (Nassonova et al., 2005). Отличительная черта ядерного аппарата многих видов микроспоридий – его организация в виде диплокарионов, т.е. двух прилежащих друг к другу, морфологически идентичных и синхронно делящихся ядер в одной клетке. Аналогичное расположение ядер известно для дипломонады *Giardia lamblia*. Но если у лямблий диплокариотическое состояние ядер неизменно, то у микроспоридий имеет место чередование фаз с дипло- и монокариотической структурой ядра. Впрочем, многие виды микроспоридий имеют одно ядро или, наоборот, сдвоенные ядра на протяжении всего жизненного цикла. Наиболее интригующие вопросы, связанные с ядерным аппаратом микроспоридий, – это проблема наличия мейоза и полового процесса в группах с отсутствием чередования поколений и проблема ploidy ядер диплокариона.

Ранее предполагалось, что половой процесс и мейоз – плезиоморфная черта, сохранившаяся в тех группах, где имеется чередование монокариотической и диплокариотической фаз, например, у представителей родов *Amblyospora* или *Vairimorpha*. В таких группах наблюдается диссоциация ядер, которой предшествует мейоз (Canning, 1988). Восстановление диплокариона происходит в ходе процессов,

интерпретируемых как гаметогенез и плазматомия, хотя гаметогенез и сингамия отмечены лишь у *Amblyospora* spp. (Becnel et al., 1987; Hazard et al., 1985) и, вероятно, у *Kneallhazia solenopsae* (Sokolova, Fuxa, 2008). Считалось, что в остальных группах, предположительно продвинутых, с простыми без смены ядерных фаз жизненными циклами, половой процесс и мейоз утеряны в ходе редуccionной эволюции в соответствии с общим трендом эволюции микроспоридий на минимизацию размеров, геномов, протеомов и т.д. Все оказалось сложнее: мейоз в той или иной форме, с различной частотой и степенью завершенности присутствует и у видов, считавшихся ранее асексуальными. Например, детальный морфологический анализ выявил кратковременную одноядерную стадию (Sokolova et al., 2003) и синаптонемальные комплексы (Nassonova, Smirnov, 2005) у *Paranosema grylli* – вида, считавшегося строго диплокариотичным и асексуальным. Анализ геномов показал, что гомологи генов мейоза (Spo11, Rad50, Mre11, and Rad51 и др.) имеются у *Encephalitozoon cuniculi*, *Paranosema* (*Antonospora*) *locustae*, *Enterocytozoon bieneusi* и *Nematospora parisii*, т.е. у микроспоридий, относящихся к филогенетически неродственным кладам. Тот факт, что микроспоридии в ходе приспособительной эволюции к внутриклеточному паразитизму потеряли множество важных функциональных генов, при этом сохранив специфические гены мейоза, говорит о том, что наличие мейоза и полового процесса входит в фундаментальную характеристику типа Microsporidia, и потенциальная способность к мейозу есть у всех современных видов этой группы (Lee et al., 2014). Мейоз у диплокариотических видов микроспоридий может происходить крайне редко. При этом очевидно, что рекомбинация генетического материала между генетически неоднородными ядрами диплокарионов способствует биологическому успеху вида (Nassonova, Smirnov, 2005).

На основании изучения мейоза у амблиоспориид (Becnel et al., 1987; Hazard et al., 1985) сделано заключение, что мейоз у микроспоридий – совершенно особенный, и он включает фазы расхождения и схождения/слияния ядер диплокариона (Canning, 1988). Позже Flegel и Pasharawipas (Flegel, Pasharawipas, 1995) весьма убедительно продемонстрировали, что эти же данные могут использоваться для поддержки стандартной схемы мейоза эукариот, которая состоит в следующем. Два гаплоидных ядра диплокариотического меронта сливаются и формируют одно диплоидное ядро, которое затем подвергается двум стандартным мейотическим делениям, за которыми следует митотическое деление, в результате чего образуется 8 гаплоидных ядер. Я неоднократно наблюдала этот процесс при исследованиях микроспоридий, образующих октоспоры (Sokolova, Fuxa, 2008; Sokolova, Overstreet, 2018; Sokolova et al., 2016). За

слиянием ядер диплокариона следуют диссоциация ядер и плазматомия, а образующиеся клетки обычно подвергаются трем раундам ядерного деления с формированием двух восьми ядерных плазмодиев (см. Главу 3). Не понятным остается тот факт, что синаптонемальные комплексы микроспоридий, за единственным исключением (Andreadis, 1983), наблюдались в ядрах диплокарионов, например, у *Amblyospora* spp. (Hazard, et al., 1979), *K. solenopsae* (Sokolova, Fuxa, 2008) или *Paranosema grylli* (Nassonova, Smirnov, 2005). Ряд авторов объясняли это явление «абортным мейозом», который начинается в ответ на внутриклеточные стимулы, но не заканчивается формированием гаплоидных «гамет» (Canning, 1988). Получается, что «абортивный мейоз» наблюдается чаще, чем нормальный, что странно и нелогично. Загадку синаптонемальных комплексов в индивидуальных ядрах диплокарионов микроспоридий можно хотя бы отчасти объяснить следующим образом. В клетках, где наблюдаются синаптонемальные комплексы, имеет место нарушение ядерной оболочки в зоне контакта между ядрами диплокариона – «разрывы» или «бреши», которые неоднократно наблюдались мною и другими авторами (Nassonova, Smirnov, 2005; Sokolova et al., 2003; Sokolova, Fuxa, 2008). Через эти бреши может происходить обмен генетическим материалом между соседними ядрами диплокариона. Последнее предположение требует экспериментальной проверки так же, как и соответствие синаптонемальных комплексов микроспоридий аналогичным структурам других эукариот, например, с помощью иммуномечения (Lee et al., 2014).

Широко обсуждаемым и все еще нерешенным вопросом остаётся взаимосвязь между диплокариотическим состоянием ядра и плоидностью. Поскольку микроспоридии делятся с помощью криптомитоза, отдельные хромосомы не видны отчетливо и не могут быть подсчитаны во время деления клетки. Большинство исследователей придерживаются точки зрения, что диплокарион образован двумя гаплоидными ядрами и, соответственно, представляет собой функциональный диплоид (Besnel et al., 1987). Этот вывод подтверждается подсчетом хромосом на окрашенных препаратах (Chen, Barr, 1995; Hazard et al., 1979). Более того, измерение содержания ДНК также указывает на функциональную диплоидность диплокариона. Например, суммирование длин хромосом в гаплоидном геноме микроспоридии *Paranosema grylli* методом импульсного гель-электрофореза (PFGE) дает оценку количества ДНК, которая согласуется с оценкой, полученной в результате цитологических измерений флуоресценции каждого ядра диплокариона (Nassonova, Smirnov, 2005). Представление о том, что каждое ядро диплокариона гаплоидно, как отмечено выше, противоречит наблюдению синаптонемальных комплексов в отдельных ядрах диплокариона, учитывая

то, что синапс происходит между гомологичными хромосомами. Интересно, что подробные исследования плоидности в диплокарионе *Giardia lamblia* показывают, что каждое ядро диплокариона в ходе жизненного цикла меняет состояние от диплоидного на тетраплоидное (Bernander et al., 2001). Поскольку другой аналог микроспорициальных диплокарионов – это дикарионы высших грибов подцарства Dikarya (Ascomycota+Basidiomycota), возникает вопрос, аналогичны ли микроспорициальные диплокарионы тетраплоидным ядрам дипломонад или диплоидным дикарионам грибов. С одной стороны, микроспорициии определенно родственны грибам, и последнее кажется более логичным. С другой стороны, морфологически диплокарионы микроспорициидий похожи на ядра лямблий, а не на дикарионы грибов. Кроме того, дикарионы присутствуют только у высших грибов, которые филогенетически далеки от микроспорициидий, а сдвоенные ядра могли независимо возникать в различных группах в ходе эволюции полового процесса. Гаплоидность мономорфных монокариотических организмов, таких как модельный вид *Encephalitozoon cuniculi*, также весьма сомнительна. С помощью гибридизации ДНК выявлены гомологичные хромосомы в ядре *E. cuniculi* (Biderre et al., 1999). Кроме того, гетерозиготность по нескольким локусам независимо продемонстрирована в нескольких исследованиях на различных изолятах этого вида (Katinka et al., 2001; Pombert et al., 2013; Selman et al., 2013), что служит убедительным доказательством диплоидности генома *E. cuniculi*. Анализ генома другого мономорфного и монокариотического вида – *Nematocida parisii*, микроспорициидии нематод, также выявил множество гетерозиготных генов, что опять указывает на диплоидию (Cuomo et al., 2012). Скорее всего, состояние индивидуальных ядер микроспорициидий может варьировать от гаплоидного до диплоидного, а диплокарионов – от диплоидного до тетраплоидного в зависимости от видовой принадлежности и фазы жизненного цикла

**Митосомы** – органеллы, гомологичные митохондриям эукариот, идентифицированы с помощью иммуноцитохимии в меронтах *Trachipleistophora hominis* (Williams et al., 2002) и *E. cuniculi* (Tsaousis et al., 2008; Williams et al., 2008), а также в спорах *Paranosema (Antonosporea) locustae* (Dolgikh et al., 2011). Эти органеллы по своим размерам (50-200 нм), морфологии и числу в клетке (10-30) сопоставимы с митосомами *Entamoeba histolytica* (Амoebozoa) и *Giardia intestinalis* (Metamonada) (Regoes et al., 2005; Tovar et al., 1999). В митосомах микроспорициидий отсутствует геном, белки окислительного фосфорилирования и цикла Кребса. Основная функция митосом микроспорициидий так же, как и митосом лямблий и энтамеб – это биосинтез Fe-S кластеров (Dellibovi-Ragheb et al., 2013). Гены, кодирующие составные элементы этого пути,

выявлены во всех изученных микроспорициальных геномах (Akiyoshi et al., 2009; Cornman et al., 2009; Corradi et al., 2009, 2010; Cuomo et al., 2012; Heinz et al., 2012; Katinka et al., 2001; Pan et al., 2013), а сами белки локализованы в митосомах *E. cuiculi* in situ (Goldberg et al., 2008). Геномный анализ также выявил в геномах микроспорицидий *E. cuiculi* и *N. bombycis* сильно редуцированный, но функциональный набор генов для компонентов митохондриального транспорта (только 6 генов кодируют белки, ответственные за транспорт в митосомах микроспорицидий в отличие от 25 генов, выявленных в митохондриях дрожжей). Эти компоненты выполняют ключевые функции распознавания (Tom70), транспорта через наружную и внутреннюю мембраны (Tom40, Tim50, Tim22), вставку во внешнюю мембрану (Sam50) и транслокацию в матрикс митосом (Pam18, mtHsp70) (Heinz, Lithgow, 2013; Lin et al., 2012). Кроме того, в геномах нескольких микроспорицидий выявлен ген альтернативной оксидазы (АО) (убихинон-кислород-оксидоредуктазы, локализуемой на внутренней мембране митохондрий грибов и высших растений) (Heinz et al., 2012; Williams, Keeling, 2005). АО и глицерол-фосфат дегидрогеназа (mtG-3-PDH) микроспорицидий экспрессировались в гетерологичной дрожжевой системе (Burri et al., 2006; Williams et al., 2010). Кроме того, АО была иммуно-локализована в митосомах спор *Paranosema locustae* (Dolgikh et al., 2011). Это говорит о том, что конечным акцептором электронов, по крайней мере у некоторых микроспорицидий, служит кислород, и что, возможно, перенос электронов с продукта гликолиза, глицерол-3-фосфата, на O<sub>2</sub> осуществляется в митосомах с помощью челночного глицеролфосфатного механизма (Williams et al., 2014). Интересно, что микроспорицидии, относящиеся к филогенетической суперкладе Clade IV Terresporidia (*E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. bieneusi*, *N. bombycis* и *N. ceranae*) утратили гены АО, в то же время сохранив ген митохондриальной формы G-3-PDH. Предполагается, что особенности углеводного метаболизма, характерные для этой группы, и потеря альтернативной дыхательной цепи стали физиологической адаптацией при переходе к наземному образу жизни (Williams et al., 2014).

**Мембранные структуры**, выявляемые в цитоплазме пролиферативных стадий, как правило, связаны с секреторным транспортом микроспорицидий, и некоторые из них можно считать гомологами аппарата Гольджи. Этим органеллам посвящена глава 4 диссертации.

## 1.2 Эволюционные связи микроспорицидий и положение в системе эукариот

### 1.2.1 История вопроса: простейшие или грибы?

Микроспорицидиологическую летопись принято вести с описания микроскопического возбудителя пембрины тутового шелкопряда, грозившего уничтожить

шелководство в Южной Европе в начале 19 века.<sup>3</sup> Паразит описан как *Nosema bombycis* Nägeli в 1857 году и отнесен к Schizomycetes (цит. по Becnel, Andreadis, 1999; Sprague, 1977a). Этот факт сегодня звучит иронично. Понадобилось полтора века, чтобы микроспоридии, побывав в качестве семейства отряда Мухосporidia (Thelohan, 1892, цит. по Issi, 1986), отряда или подкласса в составе типа Sporozoa (Kudo, 1924; Labbe, 1899), таксона равного ранга с микроспоридиями и актиномиксидиями в составе класса Cnidosporidia (Kudo, 1966), независимого типа в составе царства Protozoa (Levine et al., 1980), а затем Archezoa (Cavalier-Smith, 1993), нашли свое место на древе жизни в качестве ближайших родственников грибов (Adl et al., 2005, 2012; Corsaro et al., 2014a; James et al., 2006; Karpov et al., 2014; Mikhailov et al., 2017).

Ранг группы и положение микроспоридий в системе эукариот неоднократно менялись в ходе их изучения и всегда вызывали дискуссии. Нет необходимости здесь останавливаться на этом вопросе, т.к. он подробно рассмотрен в нескольких публикациях (Issi, 1986; Keeling, Fast, 2002; Sprague, 1977b; Sprague et al., 1992). Примечательно, что еще в 1990-х микроспоридий относили к Archezoa – сборному супертаксону низших эукариот, объединяющему амитохондриальных простейших, якобы отделившихся от эукариотического ствола до приобретения митохондрий (Cavalier-Smith, 1993; Corliss, 1994; Vossbrinck et al., 1987). В пользу первичной «примитивности» и принадлежности к Archezoa<sup>4</sup> микроспоридий говорили следующие характеристики: (1) упрощенное строение вегетативных стадий микроспоридий, в частности, закрытый тип митоза, отсутствие митохондрий, пероксисом, диктиосом аппарата Гольджи, 9+2 микротубулярных структур и запасяющих гранул; (2) 70S рибосомы «прокариотного типа» (в отличие от 80S у большинства эукариот) с коэффициентом седиментации малой рибосомальной субъединицы 16S, как у прокариот, а не 18S, как у эукариот; (3) структура рибосомального РНК оперона, в котором 5.8S рРНК ковалентно связана с 23S рРНК как у прокариот, в отличие от других эукариот, у

---

<sup>3</sup>Наиболее ранняя находка микроспоридии принадлежит Gluge (1838), который описал паразитический микроорганизм из рыб, позже названный *Glugea anomalia* (Moniez 1887) (цит. по: Becknel and Andreadis, 1999).

<sup>4</sup>К супертаксону Archezoa относятся следующие группы протистов: дипломонады (*Giardia*), трихомонады (*Trichomonas*), микроспоридии (*Nosema*), энтамебы (*Entamoeba*) и пелобионты (*Naegleria*, *Valkhampia*). A 6-kingdom classification and a united phylogeny. Cavalier-Smith T. A 6-kingdom classification and a united phylogeny // *Endocytobiology II* / Schwemmler W., Schenk H. – Berlin: de Gruyter, 1983. – С. 265-279.

которых эти участки рРНК представлены отдельными молекулами (Vossbrinck, Woese, 1986); (4) отсутствие у микроспоридий интронов, которые по гипотезе Кавалье-Смита были привнесены в геном эукариотической клетки пре-митохондриальными эндосимбионтами (Cavalier-Smith, 1991), и системы сплайсинга. Первые филогении, основанные на анализе сиквенсов гена малой субъединицы рибосомальной РНК (Vossbrinck et al., 1987), генов факторов элонгации трансляции 1 $\alpha$  и 2 (Kamaishi et al., 1996a, b) и гена изолейцин РНК синтетазы (Brown, Doolittle, 1995), указывали на базальное положение микроспоридий на древе эукариот.

Следует отметить, что «архезойная» природа микроспоридий неоднократно подвергалась сомнению самими же авторами архезойной гипотезы (Cavalier-Smith, 1993), т.к. упрощенность строения вегетативной клетки микроспоридий, как и представителей других групп Archezoa, большинство из которых представлены паразитическими формами, могла быть связана с приспособлениями к внутриклеточному паразитизму, а сложное строение спор микроспоридий невозможно было назвать примитивным. Именно перемещение микроспоридий от основания филогенетического древа (Vossbrinck et al., 1987) к его вершине (Keeling, Fast, 2002) стало первым сокрушительным ударом по «архезойная гипотезе», которая оказалась несостоятельной также и в отношении других групп – энтамеб, диплонад и парабазалид (Dacks, Doolittle, 2001), но при этом необычайно плодотворной с точки зрения прогресса в изучении эволюционных связей низших эукариот.

Редукционная эволюция генома микроспоридий, характеризующаяся необычайно высокой частотой мутаций, направлена на компактизацию за счет делеций нетранслируемых участков, выпадения кластеров нефункциональных генов и укорочения функциональных генов (Cavalier-Smith, 2005; Corradi et al., 2007; Keeling, Slamovits, 2004; Slamovits et al., 2004; Williams et al., 2005), что объясняет происхождение уникальной структуры рибосом и РНК микроспоридий и позволяет считать конвергентным сходство с бактериями по этим признакам (Keeling et al., 2005). В частности, считается, что одна из делеций затронула сайт процессинга оперона рибосомальной РНК, что вызвало слияние большой и малой субъединиц (Keeling, Fast, 2002). Усовершенствование алгоритмов и уточнение параметров филогенетического анализа выявило ошибки в ранних филогенетических построениях (Arisue et al., 2005; Fischer, Palmer, 2005). Наиболее типичная расчетная ошибка, характерная для ранних филогений, «артефакт взаимного притяжения длинных ветвей» (long-branch attraction artifact) (Felsenstein, 1978; Philippe, Laurent, 1998; Philippe et al., 2000), основана на ложном предположении, что один и тот же ген в разных организмах эволюционирует с

одинаковой скоростью. Классическим примером такой ошибки оказалось заключение о древности происхождения микроспоридий на основании сравнительного филогенетического анализа сиквенсов генов малой субъединицы РНК и фактора элонгации транскрипции 2. Эти гены характеризуются повышенной скоростью дивергенции, что зачастую приводит к неправильной оценке позиций таксонов старших рангов (отряды и выше) в филогенетических построениях (Liu et al., 2006).

Предположение о наличии общего предка у грибов и микроспоридий высказывались неоднократно (Issi, 1986). Однако первые филогении, основанные на молекулярных данных, опровергающие базальное положение микроспоридий и группирующие их с грибами, основывались на анализе сиквенсов генов  $\alpha$ - и  $\beta$ - тубулинов (Edlind et al., 1996; Keeling, Doolittle, 1996; Keeling, Fast, 2002). Учитывая, что гены тубулинов значительно быстрее эволюционируют в таксонах, лишенных 9+2 структур, например, в нехитридиевых грибах и микроспоридиях, сближение двух групп могло быть связано также с артефактом взаимного притяжения длинных ветвей; однако при исключении нехитридиевых грибов из анализа микроспоридии все равно объединялись с хитридиевыми грибами (Keeling, Doolittle, 1996). Результаты «тубулиновых» филогений немедленно привели к переоценке других характеристик микроспоридий. Например, у микроспоридий давно были отмечены уникальные для грибов черты организации ядра, митоза и мейоза (Flegel, Pasharawipas, 1995; Issi, 1986). Также наличие инсерции в гене фактора элонгации транскрипции 1-альфа сближает микроспоридий с Opisthokonta (Fungi+Metazoa+Choanoflagellata) (Keeling, McFadden, 1998), несмотря на то, что в филогениях, построенных на основании этого гена, микроспоридии занимают базальную позицию по отношению ко всем Eukarya (Kamaishi et al., 1996a, b).

Более совершенные алгоритмы анализа, позволяющие минимизировать влияние «длинных ветвей», убедительно показали принадлежность Microsporidia и Fungi к одной суперкладе эукариот на филогениях, построенных на основании сиквенсов различных генов (Табл. 1.1), включая гены малой и большой субъединиц рРНК, и факторов элонгации трансляции (Fischer, Palmer, 2005). В дальнейшем полигенный и геномный анализы безоговорочно подтвердили наличие общего предка у микроспоридий и грибов (ссылки в обзоре Keeling, 2014)

Наиболее сильным аргументом против предположения о первичном отсутствии митохондрий в клетках микроспоридий было выявление генов митохондриальных белков-шаперонов mt HSP70 и пируватдегидрогеназы в геномах *Nosema locustae* (Germot et al., 1997) и *Vairimorpha necatrix* (Hirt et al., 1997), а позже – генов целой серии митохондриальных белков в геномах этих и других микроспоридий (Arisue et al., 2002;

Burri et al., 2006; Katinka et al., 2001; Williams, Keeling, 2005). Характерно, что некоторые из этих генов демонстрировали наибольшую гомологию с генами митохондриальных белков *Saccharomyces cerevisiae*. Таким образом, факты неопровержимо указывали на наличие митохондрий у предков микроспоридий и вторичную утрату этих органелл в связи с паразитическим образом жизни. Более того, рудиментарные митохондрии (митосомы) обнаружены в вегетативных стадиях *Trachipleistaphora hominis* (Williams et al., 2002).

В геномах представителей микроспоридий (Biderre et al., 1998; Fast et al., 1998) так же, как и других архезойных таксонов, выявлены интроны и гены факторов сплайсинга (Dacks, Doolittle, 2001; Fast, Doolittle, 1999). Также получены доказательства наличия функционально активных пероксисом в *Spraguea lophii* (Findley et al., 2005; Weidner, Findley, 2002, 2003). Кроме того, следует считать доказанным, что аппарат Гольджи в явном или скрытом виде имеется в клетках всех современных эукариот, включая микроспоридий (Beznoussenko et al., 2007), а его морфологическая организация подвержена значительным модификациям, связанным со специфическими функциями (Dacks et al., 2003; Sokolova, Mironov, 2008; Sokolova et al., 2007).

В настоящее время принадлежность микроспоридий к «кроне» филогенетического древа и родство микроспоридий и грибов не вызывают сомнения. Аргументы в поддержку этих положений можно суммировать следующим образом. (1) Metazoa, грибы и микроспоридии имеют сходную структуру генов факторов элонгации EF 1 и 2, отличающуюся от таковой в других группах эукариот. (2) Только Metazoa, грибы и микроспоридии кодируют тимидин синтазу и редуктазу дигидрофолиевой кислоты двумя генами, в то время как растения и все изученные представители простейших имеют один ген, с которого транслируются оба белка. (3) Хитин в оболочке спор и трегалоза как основное запасящее вещество, помимо микроспоридий, встречается только у грибов. (4) Клетки микроспоридий и грибов похожи цитологически. Например, для представителей обеих групп характерно наличие дикарионов; сходный характер митоза и мейоза; деление ядер без диссоциации ядерной мембраны (закрытый внутриядерный криптомитоз) и встроенные в ядерную мембрану центры организации микротрубочек (spindle plaques), а также аппарат Гольджи в виде тубулярных кластеров. (5) Фундаментальные молекулярные механизмы 5'-кэпинга матричной РНК в ходе транскрипции сходны у грибов и микроспоридий (Hausmann et al., 2002). (6) Филогенетический анализ большинства генов – маркеров эволюционного родства помещает микроспоридий в один супертаксон с грибами либо как сестринскую группу по отношению к Fungi, либо как часть Fungi (Табл. 1.1).

Таким образом, к началу 21-го века стало очевидным, что микроспоридий невозможно считать базальной и архаичной группой эукариот, и некоторые молекулярные и клеточные биологи стали рассматривать микроспоридий как эволюционно молодую группу грибов, родственных дрожжам, специализированную к внутриклеточному паразитизму, аналогично *Pneumocystis carinii* (Van de Peer et al., 2000)<sup>5</sup>. *P. carinii* относили к Protozoa до 1988 года, когда с помощью молекулярной филогении доказали принадлежность к аскомицетам этого опасного патогена человека (Edman et al., 1988). Несомненно, филогенетические судьбы микроспоридий и *Pneumocystis* похожи. Они говорят о том, что адаптации к паразитизму способны изменять до неузнаваемости признаки родственных связей как на морфологическом, так и на молекулярном уровне. Существенное различие между двумя группами состоит в том, что род *Pneumocystis* – небольшая группа высших грибов (тип Ascomycota), специализированных к паразитизму в теплокровных организмах. Для эволюции аскомицетов характерны неоднократные переходы от автотрофности к паразитизму, и *Pneumocystis* представляет собой один из наиболее эффективных примеров крайней адаптации к паразитизму. Микроспоридии же – тип протистов, представленный исключительно паразитическими формами. Многочисленные (более 1200 описанных видов) представители этого типа паразитируют почти во всех таксонах Bilateria, в Microzoa и более чем в 40 видах Alveolata (в инфузориях и грегаринах), что само по себе говорит о достаточно древнем происхождении микроспоридий (Issi, 1986).

Для большинства исследователей, принимающих гипотезу родства микроспоридий с грибами, остается неясным, образуют ли Microsporidia сестринскую группу по отношению ко всему царству Fungi (т.е. обе группы имеют общего предка), или же тип Microsporidia принадлежит царству Fungi, т.е. сформировался как обособленный таксон низших грибов уже после дивергенции грибной ветви от эукариотического дерева. В пользу последнего предположения свидетельствуют некоторые уникальные для грибов и микроспоридий морфологические признаки. Так, наличие дикарионов сближает микроспоридий с Duclatia. Механизм выстреливания полярной трубки микроспоридий напоминает быстрое «прорастание» покоящихся спор у представителей рода

---

<sup>5</sup> Причиной такого «перегиба» было отсутствие сиквенсов представителей зигомицетов и хитридиомицетов в большинстве филогенетических анализов, опубликованных в 1998-2002 гг, и, как следствие, ошибочная группировка микроспоридий с дрожжами (Tanabe, 2002).

**Таблица 1-1.** Гипотезы о положении типа Microsporidia на древе эукариот, предложенные в зависимости от использованных генов-маркеров филогенетического родства в «догеномный» период молекулярной филогенетики микроспоридий (1987-2006) (по: Соколова, 2008)

| Гены,<br>кодирующие<br>следующие белки<br>и РНК             | Гипотезы: тип <b>Microsporidia</b> это:                            |  |  |
|---|--|--|--|
|   | Сестринская группа по отношению к Opisthokonta или Eukarya в целом | Сестринская группа по отношению к царству Fungi              | Принадлежит царству Fungi  |
|   | <i>Литературные источники</i>                                      |  |  |
| <b><math>\alpha</math>- и <math>\beta</math>- tubulines</b> |  |  | Edlind et al., 1996;<br>Keeling et al., 2000;<br>Keeling, 2003         |
| <b>EF 1<math>\alpha</math></b>                              | Kamaishi et al., 1996a, b; Tanabe et al., 2002;                    | James et al., 2006;<br>Liu et al., 2006                      | Gill, Fast, 2006;<br>James et al., 2006                                |
| <b>EF 1<math>\gamma</math></b>                              | Kamaishi et al., 1996b   |  |  |
| <b>EF 2</b>   | Kamaishi et al., 1996b   |  |  |
| <b>Gln-tRNA synthetase</b>                                  | Brown, Doolittle, 1999   |  |  |
| <b>Glu-tRNA synthetase</b>                                  |  |  | Brown, Doolittle, 1999   |
| <b>Pe-tRNA synthetase</b>                                   | Brown, Doolittle, 1999   |  |  |
| <b>LSUrRNA</b>  | Peyretailade, 1998a  | Peyretailade, 1998a  | Van de Peer et al., 2000   |
| <b>mtHSP70</b>  | Hirt et al., 1997;<br>Peyretailade, 1998b                          | Peyretailade, 1998b  | Germot et al., 1997;<br>Hirt et al., 1997;<br>Williams, Keeling, 2005. |
| <b>mtPDH <math>\alpha</math>, <math>\beta</math></b>        |  | Fast, Keeling, 2001;<br>Gill, Fast, 2006                     | Gill, Fast, 2006   |
| <b>Proteosome <math>\alpha</math></b>                       | Buzat et al., 2000   |  |  |
| <b>RPB 1,2</b>  | Tanabe et al., 2002  | Gill, Fast, 2006;<br>James et al., 2006;<br>Liu et al., 2006 | Hirt et al., 1999; Gill, Fast, 2006; James et al., 2006                |
| <b>SSUrDNA</b>  | Vossbrinck et al., 1987  |  | Fisher, Palmer, 2005   |
| <b>TBP</b>  |  | Gill, Fast, 2006   | Fast et al., 1999; Gill, Fast, 2006                                    |

**Сокращения:**  $\alpha$ - и  $\beta$ - tubulines, альфа, бета тубулины; EF 1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , фактор элонгации трансляции, субъединицы альфа, бета, гамма; EF 2, фактор элонгации трансляции 2; Gln-tRNA synthetase, глутаминил тРНК синтетаз; Glu-tRNA synthetase, глутамил тРНК синтетаз; Pe-tRNA synthetase, (транс) изолейцил тРНК синтетаз; LSUrRNA, БСрРНК; mtHSP70, митохондриальный белок теплового шока; mtPDH  $\alpha$ ,  $\beta$ , митохондриальная пируватдегидрогеназа, субъединицы альфа и бета; Proteosome  $\alpha$ , белки семейства протеосом альфа; RPB 1,2, РНК-полимераза II, большая (1) и малая (2) субъединицы; SSUrDNA, МСрРНК; TBP, ТАТА box-связывающий протеин. **Примечание:** Наибольшую статистическую поддержку имеют три позиции: 1) группа внутри, Zygomycota (Keeling, 2003); 2) базальная ветвь Chytridiomycota (James et al., 2006); 3) сестринская группа по отношению к Dikarya (Gill, Fast, 2006).

*Conidiobolus* (Zygomycota, Entomophthorales), которое, как и у микроспоридий, включает выворачивание мембранных структур и запускается изменением осмотического давления (Ingold, 1972; Keohane, Weiss, 1999). К тому же, подавляющее большинство видов энтомофторовых грибов, как и микроспоридии – паразиты членистоногих. Кавалье-Смит рассматривал другую группу паразитических зигомицетов – Harpellales (Zygomycota, Trichomycetes,) в качестве возможных предков микроспоридий (Cavalier-Smith, 2001) на основании сходства морфологии полярной трубки микроспоридий и придатков трихоспор, а также учитывая сходные экологические адаптации.<sup>6</sup> И все же, несмотря на некоторые аналогии, следует признать, что структура споры микроспоридий и механизм дисперсии уникальны и не имеют аналогов ни среди грибов, ни среди других групп эукариот, и поэтому не могут служить основанием для включения микроспоридий ни в один из существующих таксонов грибов.

Филогении, основанные на молекулярных данных, противоречивы (Табл. 1.1). Так, некоторые филогении, базирующиеся на сиквенсах генов HSP 70 и митохондриальных пептидаз (Keeling, Fast, 2002; Williams, Keeling, 2005), помещали микроспоридий как сестринскую группу дрожжей (Ascomycota). Однако разрешающая способность этих анализов была низкой из-за недостаточного количества таксонов грибов, а статистическая поддержка кластера, объединяющего микроспоридий и дрожжей, явно недостаточной. Альтернативной позицией микроспоридий в этом же исследовании было расположение в основании кроны эукариотического древа (Williams, Keeling, 2005).

Сравнительный филогенетический анализ генов альфа и бета тубулинов указывает на родственные отношения микроспоридий с зигомицетами и отвергает их родство с *Ducarya* и *Trichomycetes* (Keeling, 2003). В тубулиновых филогениях микроспоридии группируются с представителями Entomophthorales или Zoopagales, большинство которых – симбионты других грибов или беспозвоночных. Однако выводы об эволюционном родстве групп на основании сходства тубулинов и их генов ненадежны, т.к. известно, что тубулины подвержены конвергентным изменениям, и их макромолекулярные свойства, отраженные в аминокислотных последовательностях, играют важную роль в определении формы клетки, признака высоко варибельного и адаптивного у низших грибов. Таким образом, весьма вероятно, что родство между тубулинами двух групп

---

<sup>6</sup> Харпелиевые трихомицеты - облигатные полостные паразиты артропод и многоножек

связано со сходными ответными реакциями на условия существования. Кроме того, как упоминалось выше, гены тубулинов характеризуются неравномерными темпами эволюции, особенно в группах, лишенных жгутикоподобных (9+2) структур.

Топологии эволюционных деревьев зависят от используемых генов-маркеров филогенетического родства, и проблема их адекватного выбора – центральная проблема современной эволюционной биологии. В большинстве случаев желательно или даже необходимо использование нескольких генов для более надежной оценки взаимоотношений между таксонами. Гены РНК оперона и факторов элонгации трансляции, как и гены тубулинов – не слишком хороший выбор для установления родственных связей микроспоридий из-за насыщенности мутациями и относительно высокой изменчивости, что затрудняет их корректное сравнения с аналогичными генами других организмов (Hirt et al., 1999; Tanabe et al., 2002). В настоящее время наиболее подходящим «эволюционным маркером» для грибов считаются гены двух субъединиц ДНК-зависимой РНК полимеразы 2 (RPB), характеризующиеся низкой частотой мутаций. Эти гены присутствуют в клетках всех эукариот и обеспечивают универсальный механизм транскрипции (James et al., 2006; Liu et al., 2006; Tanabe et al., 2002). Сравнительный филогенетический анализ гена большой субъединицы RPB, включающий сиквенсы двух видов микроспоридий, двух видов грибов (*Sacharomyces crevisiae* и *Schizosacharomyces pombe*) и одиннадцати представителей других типов эукариот, сгруппировал микроспоридий с грибами, добавив аргумент в пользу заключения о «позднем» происхождении микроспоридий (Hirt et al., 1999). Серьезнейший недостаток этого анализа, как и большинства других, доказывающих якобы «позднее» происхождение микроспоридий – отсутствие репрезентативного представительства таксонов низших грибов (хитридиевых и зигомицетов).

Характерно, что чем большее количество сиквенсов низших грибов включалось в анализ, тем более базальным оказывалось положение микроспоридий. Например, включение сиквенсов RPB, принадлежащих 17 представителям Zygomycetes и Chitridiomycetes, в филогенетический анализ снизило статистическую поддержку группировки микроспоридий с грибами с приблизительно с 0.9 (Hirt et al., 1999) до 0.6 (Tanabe et al., 2002). В анализе Tanabe с соавторами (2002) более достоверной оказалась группировка микроспоридий с животными (Metazoa) и базальная позиция по отношению к грибам. Tanabe с соавторами (2002) также выявили отсутствие характерной для всех грибов делеции двух аминокислот в микроспоридиальном гене фактора элонгации трансляции EF 1 alpha; эта находка, по мнению автора, ставит под сомнение близкое родство микроспоридий с грибами.

Увеличение количества сравниваемых генов и включение в анализ большего числа таксонов позволило значительно повысить разрешающую способность и надежность филогенетического анализа. Мультигенные филогении подтвердили принадлежность микроспоридий к «кроне» и их родственные отношения с грибами, но не разрешили окончательно положение микроспоридий. Неожиданной оказалась группировка микроспоридий с Chytridiomycota в опубликованном в журнале Nature филогенетическом анализе шести генов 199 представителей различных таксонов грибов и двух видов микроспоридий (James et al., 2006). Этот анализ со значительной поддержкой поместил микроспоридий в один кластер с наиболее базальным представителем типа Chytridiomycota – внутриклеточным паразитом хитридиевых грибов, *Rozella allomyces* (Bruns, 2006). Хитридиевые сами по себе – базальная и обособленная ветвь низших грибов, отмеченная анцестральным признаком – присутствием в жизненном цикле жгутиковых зооспор. Предками остальных групп современных грибов зооспоры утеряны в процессе приспособления к наземному образу жизни (Cavalier-Smith, 2001). На основании сравнения сиквенсов нескольких генов Джеймс с соавторами (James et al., 2006) делают выводы о парафилетичности хитридиевых грибов, объединенных, по их мнению, лишь на основании наличия анцестральных признаков, и как минимум, четырехкратной потере жгутика в процессе эволюции.<sup>7</sup> Авторы предполагают, что микроспоридии произошли от эндопаразитического предка одной из групп хитридиевых, подобного *R. allomyces*, и представляют собой наиболее рано ответвившуюся ветвь филогенетического древа грибов (Bruns, 2006; James et al., 2006). Характерно, что сходное исследование, включающее анализ генов двух субъединиц RPB (Liu et al., 2006), с высокой статистической поддержкой указывает на позицию микроспоридий как сестринской группы по отношению к царству грибов, отвергая все другие позиции.

Анализ протеомов микроспоридий, с одной стороны, подтвердил, что значительное количество микроспоридиальных белков и белковых кластеров гомологичны грибным, а с другой – выявил несколько существенных различий, ставящих под сомнение родство

---

<sup>7</sup> Существует не менее убедительные доказательства единократной потери жгутика и монофилитичности зооспоровых грибов (Liu, Y. J. J., Hodson, M. C., Hall, B. D., 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *Bmc Evolutionary Biology*. 6.), так что этот вопрос остается открытым.

с грибами и свидетельствующих скорее в пользу «древнего» (базального) положения микроспоридий. Наиболее яркий пример – наличие у микроспоридий немитохондриальной АТФ-транспортирующей АТФ/АДФ транслоказы, которая также выявлена в растительных хлоропластах и внутриклеточных бактериях (*Rickettsia*, *Chlamydiaceae*). Предполагается, что микроспоридии и растения могли приобрести этот ген независимо в результате горизонтального переноса генов (Koonin et al., 2004). Альтернативная точка зрения основана на филогенетическом анализе, который подтверждает очень древнее происхождение митохондриальных и немитохондриальных транслоказ (Amiri et al., 2003). Согласно этой точке зрения, ген переносчика присутствовал в бактериальных предшественниках митохондрий, *Chlamydiales* и *Rickettsia*, а затем переместился в ядерный геном «про-эукариотической» клетки. Во многих группах эукариот ген был постепенно утерян и сохранился только в растениях, где обеспечивал функцию транспорта АТФ из цитозоля в пластиды, и в микроспоридиях для транспорта АТФ из клеток хозяина. Другой фермент столь же древнего происхождения, отсутствующий у грибов, но функционирующий у микроспоридий – 3-метил-аденин ДНК гликозилаза (гликозилирует связи между аденином и дезоксирибозой в процессе удаления поврежденных нуклеотидов). Кроме того, экспрессия в спорах *Paranosema locustae* фосфолиазы класса II (метазойного типа) – фермента, участвующего в репарации ДНК, поврежденной ультрафиолетом (Keeling, et al., 2005), и цитоплазматической (не пероксисомальной) каталазы протеобактериального типа (Fast et al., 2003) также не вполне согласуется с представлением о «грибных» корнях микроспоридий. Сторонники «грибных связей» обычно объясняют наличие этих и других «негрибных» генов и белков латеральным переносом генов и аргументируют эту точку зрения присутствием гена обратной транскриптазы в геномах *E. cuniculi*, *S. lophii* и *P. locustae*.

Таким образом, еще десять лет назад анализ филогенетических деревьев, построенных на основании как одиночных рибосомальных генов, так и нескольких конкатенированных генов (мультигенные филогении), позволял только констатировать тот факт, что микроспоридии относятся к супертаксону Opisthokonta, объединяющему царства грибов, животных и хоанофлагеллят. Предполагалось, что потеря подвижных спор, произошедшая независимо как минимум в четырех группах грибов – предках *Rozella*, *Olpidium*, *Blastocladyomycota*, собственно хитрид (“core chytrids”) – и у *Microsporidia*, сопровождалась эволюцией новых механизмов распространения, в частности, с помощью воздушной дисперсии спор и/или роста гифов (Bruns, 2006; Hibbett et al., 2007; James et al., 2006). Механизм экстрезии спор микроспоридий мог

сформироваться как альтернативный способ дисперсии в одной из предковых групп, давшей начало микроспоридиям, и помог ей освоить нишу внутриклеточного паразитизма. Исчезновение жгутика во всех группах сопровождалось потерей центриоли и возникновением встроенного в ядерную оболочку центра организации микротрубочек.

### 1.2.2 Родственные связи микроспоридий внутри Opisthokonta

Филогенетическое положение микроспоридий в системе эукариот существенно уточнено в последние годы (Corsaro et al., 2016, 2014b; Cuomo et al., 2012; Naag et al., 2014; James et al., 2013; Jones et al., 2011; Karpov et al., 2014; Letcher et al., 2013; Mikhailov et al., 2017; Quandt et al., 2017; Toruella et al., 2018). Прорыв связан с развитием (1) метагеномики, т.е. с методологиями, позволяющими извлекать и анализировать генетическую информацию об организмах из окружающей среды в основном в виде сиквенсов 18S РНК (short-gun, high-throughput sequencing, и др.) и (2) геномики (и «транскриптомики») – секвенированию и анализу больших фрагментов и целых геномов эукариот благодаря усовершенствованию технологий секвенирования, таких как NGS (New Generation Sequencing) и метод EST (Expressed Sequence Tag). С помощью этих методов получена генетическая информация, позволяющая строить надежные филогении на основании либо большого числа генов (>100), либо большого числа «природных» сиквенсов МСрРНК из разнообразных экосистем – подходы, называемые соответственно «филогеномикой» и «метагеномикой». С точки зрения клеточной биологии Opisthokonta, существенно также стремительное накопление данных по функциональной геномике микроспоридий и родственных групп, что позволило проследить эволюцию некоторых биохимических путей, сделать выводы о смене функций органелл и верифицировать имеющиеся морфологические и биохимические данные (Табл. 1-2) (Williams et al., 2014).

Понимание эволюционных корней микроспоридий тесно связано с реконструкцией ранних этапов эволюции грибов и Metazoa. В связи с накоплением генных, геномных и транскриптомных данных, которые позволили достоверно выявить родственные связи между таксонами протистов, расположенными около корня супертаксона Opisthokonta, эта тема стала «горячей точкой» исследований последнего десятилетия. Не углубляясь в детали, результаты многочисленных работ можно обобщить следующим образом. Opisthokonta разделяется на две ветви, одна из которых, Holomycota (=Nucleomyces) (Brown et al., 2009; Corsaro et al., 2014b, 2016; Liu et al., 2009; Quandt et al., 2017), включает в себя царство Fungi, другая (Holozoa) – все таксоны Metazoa. Большинство одноклеточных таксонов, например, Choanoflagellata и Ichtiosporea, входят в Holozoa, однако *Rozella* и Microsporidia, несомненно, относятся к Holomycota. Интересно, что к

Holomycota относится и отряд Nucleariidae (Cavalier-Smith, 1993), который объединяет филозных (с нитевидными псевдоподиями) амёб рода *Nuclearia*, в прошлом относящихся к Sarcodina, и *Fonticula* spp. – амёбоидных организмов, образующих многоклеточные фруктовые тела и ранее считавшихся слизевиками, родственными *Dictyostelium* (Brown et al., 2009; Liu et al., 2009). Если свободноживущих фаготрофных нуклериид, у которых отсутствует хитиновая оболочка, ни по каким признакам нельзя отнести к грибам (Fungi), то относительно микроспоридий и *Rozella* вопрос оставался открытым (Liu et al., 2009).

Решающим фактором для выявления филогенетических связей микроспоридий было открытие того факта, что *Rozella allomyces* – лишь верхушка айсберга ошеломляющего разнообразия розеллид, которое, по-видимому, сравнимо с разнообразием всех других грибов вместе взятых (Keeling, 2014). Метагеномный анализ образцов из различных экотопов показал, что в природе существует огромное количество организмов, родственных *Rozella*, но в то же время диверсифицированных на несколько групп (Bass et al., 2018). Большинство этих организмов в настоящее время известно только по сиквенсам МСрПНК, депонированным в Генбанке. Новая эволюционная клада получила название сначала Cryptomycota (Jones et al., 2011), а позже Rozellomycota (Corsaro et al., 2014a; Quandt, et al., 2017). Биология этой группы известна лишь по представителям рода *Rozella* (James et al., 2013; Letcher et al., 2017, 2018), внутриклеточным паразитам хитридиевых грибов, оомицетов (Chromista) и некоторых зеленых водорослей. Все известные представители рода *Rozella* имеют сходный жизненный цикл. Паразит распространяется с помощью жгутиковых зооспор. Спора инцистируется на поверхности хозяина, приобретает хитиновую оболочку, формирует трубку проникновения и инъецирует содержимое споры в цитоплазму клетки хозяина. В клетке паразит развивается в виде амёбоидного протопласта, который захватывает и переваривает цитоплазму клетки хозяина предположительно с помощью фагоцитоза. Цикл завершается формированием спорангия или покоящихся спор, оболочка которых формируется из клеточной стенки хозяина. Надо сказать, что по биологии и морфологии *Rozella* весьма сходна с Chitridiomycota (к которым этот род раньше и относили), а также с афелидами, представителями класса Aphellidea (Gromov, Mamkaeva, 1968), позже переведенного в тип (Karpov et al., 2013), но разительно отличается от микроспоридий. Однако серия независимых филогенетических анализов (в основном на основании МСрДНК), включающих многочисленные природные сиквенсы Rozellomycota, репрезентативные выборки сиквенсов грибов (включая зигомицеты и хитридиевые) и микроспоридий (всего >100 таксонов), выявила близкое родство Microsporidia и

Cryptomycota (Bass et al., 2018; Capella-Gutierrez et al., 2012; Corsaro et al., 2014a, b, 2016.), что полностью подтверждалось и филогеномным анализом (James et al., 2013; Quandt et al., 2017). Интересно, что анализ генома *Rozella allomyces* показал наличие некоторых сходных с микроспоридиями генов, например, 4-х генов хитин-синтазы, специфических для грибов и микроспоридий, генов для деградации хитина, а также ген АДФ/АТФ транслоказы бактериального типа, среди эукариот выявленный еще только у микроспоридий. С микроспоридиями представителей рода *Rozella* (как и афелид) сближает также отсутствие хитиновой оболочки на внутриклеточных стадиях (у Fungi все стадии хитинизированы), а способность этих стадий к фагоцитозу отличает *Rozella* и от грибов, и от микроспоридий, но сближает с афелидами. Наличие канонического рибосомального цистрона (18S-ITS1- 28S- ITS2-5.8S), а также митохондриального (хотя и редуцированного) генома и способность к окислительному фосфорилированию подчеркивает сходство с грибами и отличие от микроспоридий (James et al., 2013). Наконец, жгутиковые споры имеются у *Rozella* spp. и афелид, но отсутствуют во всех группах Fungi, кроме Chitridiomycota.

Выявление родства Aphelidea с Rozellomycota и Microsporidia (Karpov et al., 2013; Letcher et al., 2013) было другим важным этапом на пути понимания эволюционных связей микроспоридий. Афелиды, внутриклеточные паразиты микроскопических зеленых водорослей, которые, как и *Rozella*, инвазируют своих хозяев с помощью герминальных трубок, имеют фаготрофную амeboидную стадию и дисперсионные стадии в виде зооспоры с задним жгутиком (Aphelidium, Pseudoaphelidium), которые могут трансформироваться в амeboиды с рудиментным жгутиком (Amoeboaphelidium). Афелиды так же, как и *Rozella*, не синтезируют оболочку спорангия, а используют для этого клеточную стенку хозяина (Gromov, Mamkaeva, 1968; Karpov et al., 2013). В некоторых мультигенных и геномных филогениях Aphelidea, Rozellamycota и Microsporidia образуют кладу ARM (Letcher et al., 2013), или супертаксон ранга надтипа Opisthosporidia (James et al., 2013; Karpov et al., 2013), причем таксон Aphelidea занимает базальную позицию по отношению к дихотомии Rozellamycota-Microsporidia. Включение данных недавно опубликованного транскриптома *Paraphelidium tribonetae* в мультигенный филогенетический анализ указывает на базальное положение афелид по отношению к Fungi и говорит о том, что грибы произошли от афелидо-подобного фаготрофного предка, который в процессе эволюции перешел к осмотрофному питанию, а кладу Rozellamycota-Microsporidia (RM) образует сестринскую группу по отношению к дихотомии Fungi-Aphelida (Toruella et al., 2018) (Рис. 1.2).

Общий признак, который объединяет афелид, микроспоридий и *Rozella*-подобные организмы — это использование хитиновой клеточной стенки для генерации внутриспорового давления во время внедрения зародыша/протопласта в клетку хозяина. Этот механизм, впрочем, унаследован от грибов, у которых направленный клеточный рост включает создание тургорного давления на эластичный конец гифы, перестройку цитоскелета и активный синтез хитина, так что, по сути, грибная цитоплазма движется в постоянно синтезированной хитиновой трубке. У *Rozella*, афелид и микроспоридий процесс «инъекции» зародышевой протоплазмы включает проникновение воды в спору (=цисту) и образование задней вакуоли (James et al., 2013). Базальная позиция афелид подтверждается рядом плезиоморфных черт жизненного цикла и биохимии (Karpov et al., 2014), а также геномными и транскриптомными данными *Paraphelidium tribonemae* (Torruella et al., 2018). Таким образом, актуальный консенсус относительно положения микроспоридий в макросистеме эукариот можно сформулировать следующим образом: Тип Microsporidia входит в супертаксон Holomycota либо в составе клады ARM, сестринского таксона по отношению к царству Fungi (Karpov et al., 2013; Letcher et al., 2013) или, как часть клады RM, сестринской по отношению к Fungi-Aphelida (Toruella et al. 2018; Corsaro et al., 2019). Вывод о принадлежности микроспоридий к грибам, в конечном счете, зависит от трактовки понятия «грибы» (Keeling, 2014) – как Fungi, Fungi-Aphelida, Fungi-Aphelida-RM или как Holomycota в целом (Рис. 1.2). Учитывая, что нуклеариид все-таки трудно отнести к грибам, можно рассматривать «опистоспоридий» (представителей ARM клады, по Karpov et al., 2013, 2014) как промежуточные формы между амeboидными предками грибов типа *Nuclearia* и собственно грибами (Fungi или Eumycota). Следует также помнить, что все известные представители ARM ведут паразитический образ жизни, в отличие от нуклеариид. Вероятно, переход к паразитизму произошел внутри анцестрального таксона, представленного мелкими инцистирующимися амebo-флагеллатами, содержащими хитин в оболочке цисты и ассоциированными с другими одноклеточными или многоклеточными обитателями пресных водоемов. Их потомки диверсифицировались по группам хозяев – хитридевым грибам, диатомовым, водорослям, амeboам, разнообразным беспозвоночным и т.д., сформировав постепенно современные таксоны, из многообразия которых нам (исследователям) удалось выделить пока три клады, Aphelidea, Rozellamycota и Microsporidia. Интересно, что один из видов базальных Holomycota, *Nuclearia pattersoni*, выделен из жабер плотвы обыкновенной (*Rutilus rutilus*) и, по-видимому, представляет собой факультативного или облигатного симбионта. Кроме того, этот вид имеет filamentозную экстрацеллюлярную оболочку, состоящую из двух слоев (Dykova et al.,

2003), которая, возможно, гомологична эволюционному предшественнику оболочки спор опистоспоридий. Переход к паразитизму мог происходить многократно. В любом случае еще предстоит открыть разнообразные переходные формы между свободноживущими амебоидными предковыми формами и представителями группы *Opisthosporidia* – совершенными паразитами водорослей (*Aphelidea*), хитридиевых и оомицетов (*Rozella*) и животных (*Microsporidia*).

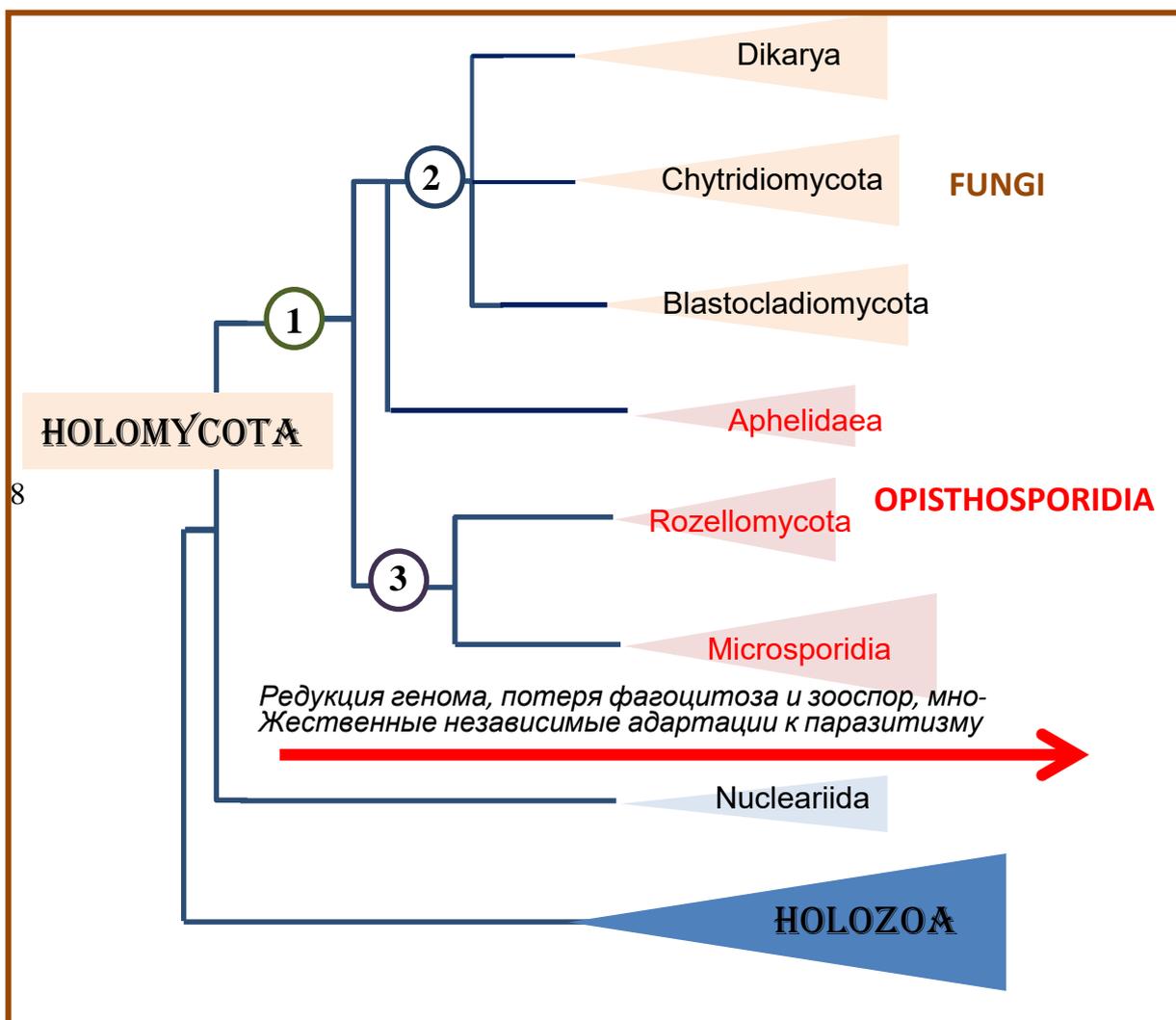
1.2.3 Родственные связи микроспоридий внутри клады *Rozellomycota-Microsporidia* (RM): ультраструктура и филогения «переходных форм»: *Paramicrosporidium*, *Nucleophaga* и *Mitosporidium*, а также «примитивных» микроспоридий семейств *Metchnikovellidae* и *Chytridiopsidae*

Итак, на большинстве моногенных, полигенных и геномных филогенетических деревьев микроспоридии группируются с *Rozella* и кладой родственных сиквенсов (James et al., 2006, 2013). При этом морфологические черты, экологические предпочтения и биохимические особенности у микроспоридий и розеллы настолько различны, что поначалу это открытие вызвало недоумение и скепсис среди научного сообщества. Морфологический разрыв между хитридиевым морфотипом представителей рода *Rozella* и микроспоридиями был впервые заполнен *Paramicrosporidium* spp. По ультраструктуре, включая наличие полярного филамента, двуслойной хитиновой оболочки и эндогенной спорогонии, эти внутриядерные паразиты свободноживущих амёб поразительно напоминают «низших» микроспоридий – мечниковеллид и хитридиописид (Corsaro et al., 2014, 2019; Sokolova et al., 2013; Mikhailov et al., 2016). Однако на всех филогенетических деревьях, построенных на основании генов рибосомального цистрона, *P. saccamoebae* группируется *Rozellomycota*. Эта позиция хорошо согласуется со структурой гена рибосомальной ДНК, которая у *P. vanellae* устроена так же, как и у *Rozella* и всех других эукариот (SSU+its+5.8S+its+LSU). В то же время, у *P. saccamoebae* на всех стадиях отсутствуют жгутики или гомологичные структуры. Анализ генома *P. saccamoebae* (Quandt et al., 2017) продемонстрировал наличие митохондриального генома, включая полный набор генов для окислительного фосфорилирования, в отличие от *Rozella*, не говоря о микроспоридиях, у которых вообще отсутствует митохондриальный геном. В целом, геном *P. saccamoebae* демонстрирует серию альтернативных (по отношению к микроспоридиям и *Rozella*) адаптаций к внутриклеточному паразитизму, например, независимую потерю различных генных кластеров. У *P. saccamoebae* отсутствуют гены АТФ/АДФ транслоказ, что можно объяснить наличием функциональных митохондрий и полного цикла Кребса (хотя ультраструктурный анализ митохондрий не выявил). *P. saccamoebae* не может синтезировать нуклеотиды, т.к. не имеет генов для *de novo* синтеза пуринов и

пиримидинов. Пути биосинтеза аминокислот у *P. saccamoebae* также значительно редуцированы: например, в геноме этого вида нет генов для синтеза гистидина и триптофана. Любопытно, что несмотря на наличие полярного филамента или его аналога, в геноме не обнаружено генов белков полярного филамента, характерных для всех микроспорициальных геномов. Авторы делают вывод о независимой редукации ядерного и митохондриального геномов у *Paramicrosporidium*, *Rozella* и *Microsporidia*.

Интересно, что некоторые филогенетические анализы с включением генов *Paramicrosporidium*, микроспорицидий и природных сиквенсов розеломикот показывают, что, хотя ветвь *Paramicrosporidium* несомненно принадлежит к *Rozellomycota* и группируется с *Microsporidia*, но при этом она не группируется с *Rozella*. Это указывает на парафилию *Rozellomycota* и одновременно на происхождение микроспорицидий от одной из базальных групп розеломикот (Corsaro et al., 2014b, 2016). Новые метагеномные данные, включающие огромный массив природных сиквенсов *Rozellomycota* и базальных микроспорицидий, убедительно подтвердили предположение о парафилии *Rozellomycota* и выделении внутри этого супертаксона огромной и абсолютно неизученной клады (Bass et al., 2018), одной из длинных ветвей которой являются современные микроспорицидии (Рис. 1-3).

Еще одной промежуточной формой, раскрывающей загадку происхождения и ранней эволюции микроспорицидий, стали *Nucleophaga* spp., как и *Paramicrosporidium*, паразитирующие в ядрах свободноживущих амёб (Corsaro et al., 2014a, b, 2016). Споры *N. terricola* и, особенно, *N. amoebae* мало напоминают споры микроспорицидий, за исключением мелких размеров и наличия двуслойной оболочки, содержащей хитин. Однако при более тщательном электронно-микроскопическом анализе в спорах обоих видов *Nucleophaga* выявлены якорный диск и атипичный (как у мечниковеллид) полярный филамент (Corsaro et al., 2016). *Nucleophaga* spp., подобно *Paramicrosporidium*, попадают в хозяина в результате фагоцитоза, а затем доставляются в ядро внутри паразитофорной вакуоли. *Nucleophaga* spp. предположительно используют полярную трубку для выхода из паразитофорной вакуоли и/или попадания в ядро (Corsaro et al., 2016). Внутри ядра *Nucleophaga* развивается как амёбоидная трофическая стадия, окруженная плазматической мембраной и, вероятно, способная к фагоцитозу. Амёбоид увеличивается в размере, заполняет собой большую часть ядра и трансформируется в многоклеточный спорангий. На 18S RNA филогенетических деревьях именно ветвь *Nucleophaga* spp. образует дихотомию с микроспорицидиями, а *Paramicrosporidium* в этих филогениях группируется с природными сиквенсами *Rozellomycota* (=Cryptomycota) (Corsaro et al., 2014b, 2016) (Рис. 1-3). Характерно, что *Nucleophaga* spp. образует кластер



**Рисунок 1-2.** Положение микроспоридий внутри Opisthokonta (Holozoa + Holomycota), филогения Holomycota и эволюция морфотипов предковых форм. Цифры в кружках: 1, общий предок Fungi и Opisthosporida: свободноживущий фаготроф – жгутиковая амеба, подобная апланоспорам афелид, содержит хитин в покоящихся цистах; 2, предок грибов: свободноживущий осмотроф, содержит хитин на вегетативных стадиях и в цистах/спорах, предназначенных для дисперсии; 3, базальная «опистоспоридия»: эндобионт, фаготроф с жгутиковой дисперсионной стадией, содержит хитин только в инфекционных цистах. По: Toruella et al., 2018; Quandt et al., 2017; Corsaro et al., 2016.

с другими природными клонами Cryptomycota из водных образцов, возможно, богатых амебами (Bass et al., 2018). Таким образом, сопоставление морфологических и молекулярно-филогенетических данных говорит о том, что некоторые морфологические черты, считающиеся уникальными для микроспоридий, вероятно, возникали и у розелломикот типа *Paramicrosporidium* (Corsaro et al., 2016). В 18S РНК филогениях Opisthokonta *Nucleophaga* образуют длинную ветвь быстро эволюционирующих сиквенсов. Не является ли объединение нуклеофагов и микроспоридий следствием артефакта «притяжения длинных ветвей»? Точно это можно будет сказать, только когда и другие гены *Nucleophaga* будут доступны для филогенетического анализа. Но хорошим

доводом в пользу достоверности этой группировки говорит тот факт, что при элиминации сиквенсов микроспоридий из анализа, *Nucleophaga* spp. группируются с *Mitosporidium daphniae*, еще одной «промежуточной формой» между Rozellomycota и Microsporidia

*Mitosporidium daphniae* (Rozellomycota) – это вид микроспоридия-подобных розеломикот, паразитирующий в кишечнике дафний. Он, также как *Nucleophaga* spp., на филогенетических деревьях группируется с микроспоридиями, занимая наиболее базальное положение (Рис. 1-3). *M. daphniae* обладает характерной для микроспоридий структурой споры. Внутриклеточные пролиферативные стадии *Mitosporidium* образуют выросты, подобные псевдоподиям, проникающим в цитоплазму хозяина (Haag et al., 2014). Аналогичные структуры описаны у *Rozella allomyces* и у *Nucleophaga*, но отсутствуют у большинства микроспоридий.<sup>8</sup> Они рассматриваются как рудиментарные остатки амeboидной фаготрофной стадии, присутствующей у афелид и, предположительно, характерной для предковой *Nuclearida*-подобной формы (Corsaro et al., 2014a, b, 2016; Quandt et al., 2017). При значительном морфологическом сходстве *M. daphniae* с микроспоридиями этот вид сохранил митохондриальный геном, а его ядерный геном в большей степени напоминает грибной, чем микроспоридийный. Важно отметить, что в митохондриальном геноме *M. daphniae*, как и в редуцированном митохондриальном геноме *Rozella allomyces*, отсутствуют гены Комплекса 1 окислительного фосфорилирования. Характерно также, что, как у *Paramicrosporidium*, в ядерном геноме *M. daphniae* не выявлены АТФ переносчики, а митохондрии не идентифицированы морфологически (Haag et al., 2014). Наличие дегенерированного митохондриального генома у *M. daphniae* и *R. allomyces* говорит о постепенной дегенерации дыхательной цепи у *Rozellomycota*, которая, вероятно, коррелирует с приобретением АТФ переносчиков. Митосомы микроспоридий, в которых вообще отсутствует геном – конечный результат этого эволюционного процесса.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о кладе *Rozellomycota-Microsporidia*, представленной широким разнообразием морфотипов – от форм, подобных *R. allomyces*, напоминающих хитридиевые грибы и афелид, которые заражают

---

<sup>8</sup>«Протоплазматические выросты», характерные для меронтов и споронтов микроспоридий рода *Anncaliia* (Cali et al., 1998; Tokarev et al., 2017), являются исключением из этого правила и, возможно, также рудиментарным признаком, отражающим родство микроспоридий с *Mitosporidia*-подобным предком.

хозяина с помощью жгутиковых зооспор, до микроспоридия-подобных безжгутиковых форм, инфицирующих хозяев с помощью полярной трубки. Все члены этой клады подверглись редукции генома и потере различных генов, и все они произошли от грибоподобного предка. Морфологические, молекулярные и геномные характеристики мозаично распределены между изученными представителями этой клады (Табл. 1-2), что свидетельствует, скорее всего, о малой изученности группы и о существовании большого числа ныне живущих и/или вымерших форм с разнообразными приспособлениями к внутриклеточному паразитизму, из которых нам известна лишь малая толика. Картина эволюционных связей между таксонами клады *Rozellomicota-Microsporidia* будет постепенно проясняться по мере описания новых форм и выявления недостающих звеньев.

Наиболее вероятно, что микроспоридии произошли от эндопаразитического организма, подобного *Rozella*, лишённого жгутиковых зооспор, но сохранившего амебодную трофическую стадию и способность к фагоцитозу, утерянную на более поздних этапах. Предковые формы микроспоридий были паразитами простейших и беспозвоночных животных, обитающих в водной, предположительно пресноводной среде (Corsaro et al., 2016, 2019; Gromov, Mamkaeva, 1968; Quandt et al., 2017). Не исключено, что предки, по крайней мере, некоторых групп микроспоридий были внутриядерными паразитами, подобными *Paramicrosporidium* и *Nucleophaga*. Кроме отчетливого морфологического сходства «низших» или «базальных» микроспоридий – мечниковеллид и хитридиопсид – с внутриядерными паразитами амёб *Paramicrosporidium* и *Nucleophaga*, ассоциация микроспоридий с ядром клетки хозяина прослеживается в некоторых группах *Microsporidia*. Представители 3-х родов, относящихся к одной и той же филогенетической кладе морских микроспоридий (*Marinosporidia*): *Nucleospora*, *Desmozoon (Paranucleospora)* и *Enterospora*, облигатно развиваются внутри ядра клетки хозяина (Stentiford, Dunn, 2014). Случайное развитие внутри нуклеоплазмы характерно также для представителей рода *Nosema* и *Vairimorpha* (Maddox et al., 1999; Takizawa et al., 1973; Tsai et al., 2009; Ефименко и др., 1990). Необычная транслокация паразитарной гексокиназы в ядро клетки хозяина и ее роль как фактора транскрипции во время внутриклеточного развития *Paranosema locustae*, выявленная группой В.В. Долгих (Senderskiy et al., 2014), возможно, свидетельствует о существовании специализированных путей манипулирования геномом, связанных с внутриядерным паразитизмом предковой формы.

«Примитивные микроспоридии»: мечниковеллиды и хитридиопсиды. Ронналд Ларсон, крупнейший специалист по цитологии микроспоридий, приводит две основные

группы примитивных микроспоридий: *Metchnikovella*-подобные микроспоридии, которые он группирует в семейство Metchnikovellidae, и *Chitridiopsis*-подобные микроспоридии – представители семейства Chitridiopsidae.<sup>9</sup> Эти две группы микроспоридий обладают сходными чертами цитологии и жизненных циклов (Larsson, 2014). Большинство видов хитридиопсид и мечниковеллид описано в начале 20-го века в качестве побочного продукта изучения грегариин и других кишечных комменсалов беспозвоночных. Ранние описания чрезвычайно кратки, и идентификация организмов по ним весьма затруднена. Интересно, что ни один вид мечниковеллид и хитридиопсид не выбрасывает полярных трубок, т.е. у них отсутствует фундаментальный признак, по которому микроспоридий идентифицировали на уровне световой микроскопии. Соответственно, все виды мечниковеллид и хитридиопсид изначально не были идентифицированы как микроспоридии – вплоть до эры электронной микроскопии (Vivier, 1965).

Мечниковеллиды, как недавно предполагалось, наиболее древняя группа микроспоридий (класс Rudimicrosporea, отряд Metchnikovellida, Sprague 1977) (Sprague, 1977a) – гиперпаразиты грегариин семейства Leucudinidae, обитающих в пищеварительном тракте морских полихет, сипункулид и эхиурид (Larsson, 2000). Мечниковеллиды обладают набором «примитивных» морфологических признаков, в частности, короткой полярной трубкой характерного строения и отсутствием полярнопласта (Larsson, 2000; Larsson, Kjøie, 2006). Большинство видов мечниковеллид открыто и описано Caullery and Mesnil в период между 1897 и 1914 годом. Мечниковеллиды считались обособленной группой живых организмов (Caullery, Mesnil, 1919) и были отнесены к микроспоридиям лишь в 1965 году в работе, посвященной электронно-микроскопическому описанию *Metchnikovella hovassei* (Vivier, 1965). Описано 3 рода мечниковеллид, *Metchnikovella*, *Amphiamblys*, *Amphiacantha*. Из 25 известных видов только 8 видов изучены ультраструктурно, два из которых – автором диссертации (см. Главу 3). В таблице 3-2 суммированы морфологические признаки различных видов микроспоридий, описанных к настоящему времени.

Группой ученых из Московского университета отсекувенирована и проанализирована большая часть (90%) генома беломорской мечниковеллиды

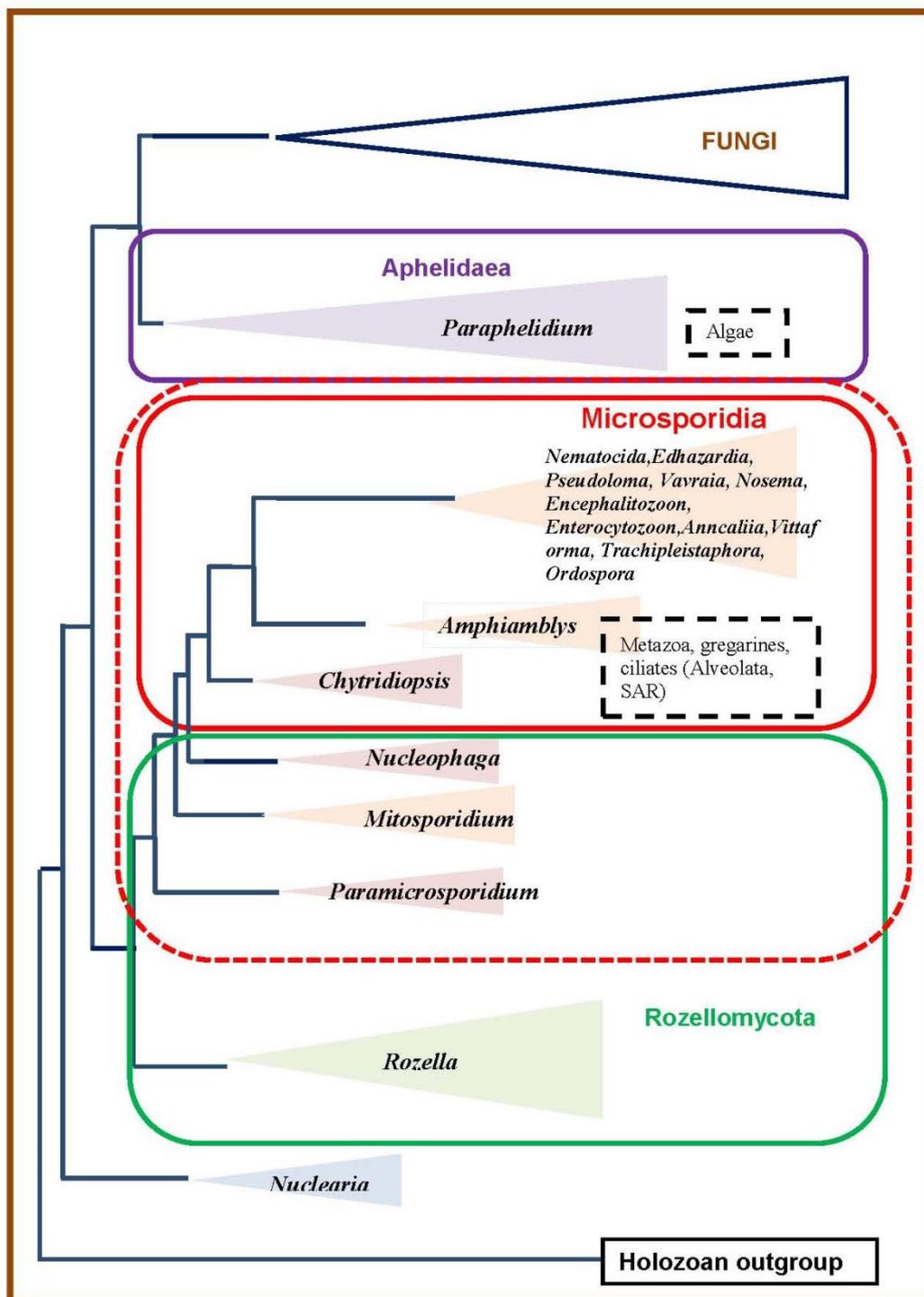
---

<sup>9</sup>Вслед за Ларсоном мы будем традиционно называть эти таксоны семействами, хотя их истинный иерархический уровень (т.е. семейство, отряд или подтип) пока не определен.

*Amphiamblys* sp. – гиперпаразита грегарины *Lecudina* sp. из кишечного тракта полихет (Mikhailiov et al., 2016). Авторы провели филогенетический анализ на основании выравнивания 303 генов особей из 38 таксонов Holomycota. Результаты говорят о базальном положении мечниковеллид по отношению к другим изученным микроспоридиям. Ветвь, ведущая к *Mitosporidium*, дивергировала раньше мечниковеллид. Микроспоридии, мечниковеллиды и митоспоридии группируются с розеллой и все вместе объединены в сестринскую группу по отношению к грибам. Недавно была отсекинирована и аннотирована значительная часть генома еще одного представителя группы, *Metchikovella incurvata*. Сравнительный анализ двух геномов подтвердил основные геномные черты мечниковеллид, выявленные у *Amphiamblys* (Galindo et al., 2018). Сиквенсы малой субъединицы гена рРНК нескольких других видов мечниковеллид, появившиеся недавно в Генбанке, группируются с *Amphiamblys* и *M. incurvata*., образуя монофилетическую группу с высокой поддержкой (Bass et al., 2018).

Семейство Chytridiopsidae (класс Microsporea, отряд Chytridiopsida, Sprague, 1977) включает три рода: *Chytridiopsis*, *Nolleria* и *Intexta*. Хитридиопсиды известны из насекомых, многоножек и клещей. Первый вид хитридиопсид, *C. socious* Schneider 1884, описан из кишечного эпителия жука-чернотелки *Blaps* sp. (Tenebrionidae). Интересно, что паразит развивался вблизи ядра с образованием сферических спор диаметром 1.5 мкм. Позднее было описано еще три вида рода *Chytridiopsis* из жуков и один вид из многоножек. Французские исследователи (Manier, Ormières, 1968) описали ультраструктуру *Chytridiopsis socious* Schneider 1884, паразитирующего в кишечнике *Blaps lethifera*, и показали наличие полярного филамента, уложенного в два кольца. Авторы также отметили необычное строение полярного филамента и отсутствие поляропласта. Позднее описано тонкое строение еще двух представителей рода, *C. typographi* из жуков-короедов (Coleoptera, Scolytidae) и *C. trichopterae* из ручейников (Trichoptera). К хитридиопсидам примыкают несколько родов микроспоридий – *Buxtehudea*, *Jiroveciana*, *Burkea* и *Hessea*, представители которых морфологически могут рассматриваться как переходные формы между хитридиопсидами и «высшими» микроспоридиями (Larsson, 2014). До недавнего времени положение Chytridiopsida относительно Metchnikovellida и «высших» (core) Microsporidia было не ясно. Предполагалось, что мечниковеллиды и хитридиопсиды – родственные группы, но, судя по морфологии и спектру хозяев, считалось, что вторые генетически ближе к высшим микроспоридиям, чем первые (Larsson, 2014). Недавно удалось амплифицировать ген рРНК *Chytridiopsis typographi*, паразита жука короеда *Ips typographus*. Филогенетический анализ на основании рДНК показал, что хитридиопсиды представляют собой более

базальную ветвь Microsporidia, чем Metchikovellida (Corsaro et al., 2019) (Рис. 1-3). Данные филогенетического анализа хорошо подтвердились сравнительным анализом структуры гена рРНК: только у «высших» микроспоридий присутствует 16S МСрРНК и произошло слияние 5.8S с БСрРНК. У мечниковеллид и хитридиопсид наблюдается стандартная (18S МСрРНК с типичной вторичной структурой и ITS2 спэйсером, отделяющим 5.8S от БСрРНК), хотя и редуцированная структура рибосомального гена, а дегенерация гена рРНК сильнее выражена у мечниковеллид, чем у хитридиопсид (Corsaro et al., 2019). Мечниковеллиды формируют на филогенетических деревьях



### **Рисунок 1-3. Современные представления о структуре клады *Microsporidia-Rozellomycota***

(По: Corsaro et al., 2016; 2019; Qiant et al., 2018; Toruello et al., 2017; Bass et al., 2018)

Схема филогенетических связей микроспоридий с другими таксонами Ophisthosporidia на основании геномных данных представителей родов (жирный курсив) и массива неидентифицированных сиквенсов МСрДНК из метагеномных проб (треугольники на конце ветвей). В прямоугольных боксах, ограниченных прерывистой линией, приведена таксономическая принадлежность хозяев. Метагеномные данные указывают на парафилию *Rozellomycota*. Часть таксонов *Rozellomycota*, эволюционно связанная с *Microsporidia*, на схеме ограничена точками. Предполагается, что среди организмов – носителей этих сиквенсов могут быть разнообразные промежуточные формы между морфотипами *Rozella*, *Paramicrosporidium*, мечниковеллид, хитридиопсид и микроспоридий – эндобионтов Amoebozoa, других протистов и беспозвоночных. Большая часть сиквенсов, принадлежащих этой кладе, получены из ДНК, выделенной из местообитаний, предположительно богатых амебами, таких как влажные почвы тропического леса. «Высшие» микроспоридии и мечниковеллиды (“Long Branch Microsporidia”) образуют на филограммах длинные ветви. По мнению некоторых авторов, таксон *Microsporidia* должен быть расширен, чтобы включить в себя эти еще неописанные эндобионты (Bass et al., 2018).

длинную ветвь, отражающую долгий эволюционный путь, сравнимый по длине с «высшими» микроспоридиями. Скорее всего, мечниковеллиды, считавшиеся ранее анцестральной группой микроспоридий, представляют собой специализированную деривантную ветвь, эволюция которой была связана с переходом к обитанию в морской воде и приспособлениями к гиперпаразитизму (Corsaro et al., 2019).

Короткий «атипичный» полярный филамент, отсутствие поляропласта и эндогенная спорогония (у мечниковеллид и хитридиопсид ведущая к формированию толстостенных цист) – это три анцестральных признака, которые роднят мечниковеллид и хитридиопсид со специализированными представителями *Rozellomycota*, *Paramicrosporidium* spp. и *Nucleophaga* spp. Рудиментарными признаками также можно считать мелкие размеры, округлую форму, продолговатое или подковообразное ядро, внутриядерную или околядерную локализацию и наличие псевдоподия-подобных выростов цитоплазмы у пролиферативных стадий. Все эти признаки, за исключением атипичного полярного филамента и отсутствия поляропласта, как показали, в том числе, исследования автора, периодически встречаются у микроспоридий, не относящихся к «примитивным» микроспоридиям. «Высшие» микроспоридии, т.е. представители класса *Microsporea*, отряд *Microsporida* по классификации Виктора Спрэга (Sprague, 1977a), представляют собой монофилетическую группу паразитов животных и человека. Их клеточной биологии, путям приспособительной эволюции и биоразнообразию посвящена большая часть этой диссертации.

**Таблица 1-2.** Морфологические, биохимические и молекулярные признаки микроспоридий и родственных групп (по: Bass et al., 2018; Quandt et al., 2017; Mikhailov et al., 2016; Toruella et al., 2017)

| Высшие таксоны ARM<br>(Opisthosporidia) | Microsporidia<br>(M)                      |                                      |   | Rozellamycota<br>(R)      |                    |                          | Aphelidea<br>(A)     |
|---|---|--------------------------------------|---|---------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
|   | «Высшие» M<br><i>Encephalitozoon (En)</i> | «Низшие» M<br>( <i>Amphiamplys</i> ) | «Базальные» M<br>( <i>Mitosporidium</i> ) | М-подобные R              |                    | А-подобные R             |                      |
| Признаки                                |   |                                      |   | <i>Paramicrosporidium</i> | <i>Nucleophaga</i> | <i>Rozella allomyces</i> | <i>Paraphelidium</i> |
| жгутик / зооспоры                       | –   | –                                    | –   | –                         | –                  | +                        | +                    |
| пальцевидные выросты цитоплазмы         | –*  | –**                                  | +   | +                         | +                  | +                        | +                    |
| двуслойная оболочка цисты/споры         | +   | +                                    | +   | +                         | +                  | –                        | –                    |
| задняя вакуоль                          | +   | –                                    | +   | –                         | –                  | +                        | +                    |
| полярный филамент «продвинутый»         | +   | –                                    | +   | –                         | –                  | –                        | –                    |
| полярный филамент «примитивный»         | –   | +                                    | –   | +                         | +                  | –                        | –                    |
| полярный филамент отсутствует           | –   | –                                    | –   | –                         | –                  | +                        | +                    |
| трубка проникновения (покрыта хитином)  | –   | –                                    | –   | –                         | –                  | +                        | +                    |
| стандартный набор рибосомальных генов   | –   | –                                    | +   | +                         | +                  | +                        | +                    |
| редуцированный рибосомальный цистрон    | +   | +                                    | –   | –                         | –                  | –                        | –                    |
| АТФ/АДФ транслоказа                     | +   | –***                                 | –   | –                         | нд                 | +                        | –                    |
| митохондриальный геном                  | –   | –                                    | +   | +                         | нд                 | +                        | +                    |
| ферменты Цикл Кребса                    | –   | –/+                                  | +   | +                         | нд                 | +                        | +                    |
| дыхательная цепь переноса электронов    | –   | –                                    | +/-                                       | +                         | нд                 | +/-                      | +                    |
| размер генома (Мб)                      | 2.9****                                   | 6.2                                  | 5.6                                       | 7.3                       | нд                 | 12                       | нд                   |

**Обозначения:** +, признак присутствует; –, признак отсутствует; нд, нет данных

\*Выросты цитоплазмы меронтов и споронтов описаны «протоплазматическими выростами» для *Anncaliia* spp. из человека, насекомых (Cali et al., 1998) и ракообразных (Tokarev et al., 2017).

\*\* У *Metchnikovella incurvata* спорогональный плазмодий неправильной формы с многочисленными широкими выростами. Это может говорить об амeboидной форме материнской клетки.

\*\*\*У *Amphiamplys* найдены гены альтернативного переносчика АТФ, не встречающиеся ни в одной из групп клады ARM (Mikhailov et al., 2016).

\*\*\*\*Размеры геномов микроспоридий варьируют от 2.3 Мб до 51 Мб за счет некодирующих элементов и повторов (Williams et al., 2014).

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объекты исследований

#### 2.1.1 Природные паразито-хозяйные системы

Объектами исследований были более 30 видов микроспоридий, относящихся к базальной группе «низших» микроспоридий – мечниковеллид (2 вида), и к «высшим микроспоридиям» (28 видов). Большая часть этих видов была выделена из природы, описана и/или охарактеризована автором морфологически и генетически. Хозяевами изучаемых микроспоридий были представители 13 надродовых таксонов Animalia. Наибольшее число изученных видов – паразиты членистоногих (тип Arthropoda) (22 вида). Семь видов М были выделены из представителей класса Crustacea (отряд Decapoda, 3 вида; Copepoda, 2; Cladocera, 2); 15 видов – из насекомых (класс Insecta) (Odonata, 1; Psocoptera, 4; Orthoptera, 6; Hymenoptera, 2; Lepidoptera, 1; Coleoptera, 1). Еще один вид был выделен из форонид (тип, отряд Phoronida), два вида микроспоридий семейства Metchnikovellidae были гиперпаразитами кольчатых червей (Polychaeta) и паразитам грегариин (Apicomplexa), и 3 вида были ассоциированы с позвоночными (тип Chordata): 1 вид был выделен из рептилий, а два других изучались в культуре клеток млекопитающих, а изначально были изолированы из кролика и человека (см. Раздел 2.1.3). Полный список изученных видов микроспоридий с ссылками на соответствующие публикации представлен в таблице 2.1.

#### 2.1.2 Экспериментальные паразито-хозяйные системы с участием насекомых

Большая часть экспериментальных исследований, описанных в диссертации, проводилась на лабораторных культурах сверчка *Gryllus bimaculatus* Deg. (Orthoptera, Gryllidae) и саранчи *Locusta migratoria migratorioides* R. & F (Orthoptera, Acrididae), зараженных микроспоридиями *Paranosema* (= *Nosema*) *grylli* (Sokolova et al., 1994, 2003) и *Paranosema* (= *Nosema*, *Antonospora*) *locustae* (Canning, 1953) (Sokolova et al., 2003). Оба вида микроспоридий развиваются преимущественно в жировом теле и гемоцитах хозяев в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки хозяина, обладают диплокарионом и образуют овально-цилиндрические споры одного типа размером 4-5.2 x 1.8-2.5 мкм с 18-20 витками полярной трубки, расположенными в один или два ряда. Вид *Paranosema grylli* был выявлен нами в инсектарии ИЭФиБ. им. И.М. Сеченова в 1993 г. в популяции сверчков, привезенных из Средней Азии (Туркмения, горный массив Копет-Даг, вблизи г. Ашхабад), и описан автором диссертации (Соколова и др., 1994). Паразито-хозяйная система *P. grylli*-*G. bimaculatus* оказалась чрезвычайно удобной экспериментальной моделью для изучения биохимии, клеточной биологии микроспоридий и особенностей

паразито-хозяйственных взаимоотношений на клеточном, субклеточном и организменном уровнях. Культура сверчков поддерживалась в инсектарии лаборатории Микробиологической защиты растений в Всероссийском институте защиты растений (ВИЗР) круглый год по методикам, разработанным в инсектарии Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (ИЭФБ РАН) (Князев, 1985). Вкратце: насекомые содержались в пластиковых контейнерах при 28 °С, 12 ч./12 ч. день/ночь фотопериоде, 40-45% относительной влажности; на диете, включающей проростки пшеницы, сезонные злаки и пеллетированный корм для крыс. Сверчков заражали добавлением спор в воду в расчете  $10^2$ - $10^6$  спор на особь в зависимости от задач эксперимента. В стандартных экспериментах личинки 3-4 возраста заражались дозой равной приблизительно  $10^5$  спор на особь. В этом случае формирование следующей генерации спор занимало 7-9 недель. При пероральном заражении микроспоридией в жировом теле и гемоцитах накапливается огромное количество внутриклеточных стадий и спор (порядка  $10^9$  - $10^{10}$  спор на особь) за счет высокой интенсивности инвазии, сопровождающейся гипертрофией зараженной ткани. Это позволяет получать достаточное для цитологических и биохимических исследования количество биологического материала: спор, стадий и зараженных клеток. Было налажено получение гемолимфы из зараженных сверчков и саранчи (с помощью укола в бедренную часть лапки насекомого) для изучения ответных реакции гемолимфы и гемоцитов на микроспоридиоз (Tokarev et al., 2005; Соколова, Сундуков, 1999; Соколова и др., 2000) и поддержания кратковременных клеточных культур зараженных гемоцитов *G. bimaculatus* (Tokarev et al., 2005).

Интерес к микроспоридии *Nosema locustae*, переведённой автором в род *Paranosema* на основании молекулярного филогенетического анализа (Sokolova et al., 2003), объясняется широкой специфичностью и высокой патогенностью этого паразита по отношению ко многим видам саранчовых (Sokolova, Lange, 2002). Это единственный представитель микроспоридий, на основе которого был создан коммерческий инсектицид под торговой маркой Nolobait (Henry, 1990), также см. ссылки в обзорах (Henry, 2017; Lange, Sokolova, 2017). Nolobait в настоящее время успешно применяется против стадных и нестатных саранчовых на пастбищах Северной Америки, Аргентины и Китая (Lange, Sokolova, 2017). Практическая значимость этой микроспоридии послужила основной причиной поддержки проекта по расшифровке генома *P. locustae*, выполняемого американскими исследователями (Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, funded by NSF award number 0135272, <http://jbpc.mbl.edu/Nosema/index.html><http://gmod.mbl.edu/perl/site/antonospora01?page>

=intro). Доступность аннотированного на 80% генома *P. locustae* добавляет ценности *P. locustae* в качестве объекта экспериментальных исследований. Лабораторная популяция перелетной саранчи была получена из Московского зоопарка, содержалась в садках при температуре 30 °С, 16 ч./8 ч. день/ночь фотопериоде, 40-45% относительной влажности; на диете, состоящей из проростков пшеницы с добавлением листьев тростника обыкновенного (*Phragmites communis*) в летний сезон (Sokolova, Lange, 2002). Споры *N. locustae* для заражения были предоставлены нам Проф. J. E. Henry и Др. D. A. Streett (USDA, Rangeland Insect Laboratory, Bozeman, Montana, USA). Заражение микроспоридиями проводилось с помощью нанесения суспензии спор на кормовое растение в расчете  $10^4$ - $10^6$  спор на особь.

*P. grylli* и *P. locustae* филогенетически очень близки, что подтверждается 95 % идентичности последовательностей малой субъединицы рРНК обоих видов (Sokolova, et al., 2003). Для выделения спор из жирового тела, насекомых обоих видов препарировали, выделяли жировое тело и гомогенизировали его в воде с помощью тefлонового пестика. Гомогенаты центрифугировали 10 мин со скоростью 200 г в 1.5 мл центрифужных пробирках. Белый осадок, содержащий зрелые споры, собирали и промывали водой 2-4 и более раз центрифугированием до тех пор, пока осадки не содержали суспензию спор, чистоту которой оценивали с помощью микроскопирования при увеличении 400X с применением фазово-контраста. Водные суспензии спор хранились в холодильнике до 1 года без потери инвазионных свойств. Стадии внутриклеточного развития (меронты и споронты) отделяли от спор и элементов ткани хозяина с помощью центрифугирования в градиенте плотности Перколла (Seleznev et al., 1995; Селезнев и др., 1994; Соколова и др., 1994). Экструзию спор микроспоридий *P. grylli* стимулировали согласно методу, разработанному Курти и соавторами (Kurtti et al., 1994). Споры инкубировали 30 мин при комнатной температуре в растворе 1 (1 mM Трис, 10 mM ЭДТА). После центрифугирования спор в течение 10 мин при 600 g осадок ресуспензировали в 12 объемах раствора 2 (10 mM КОН, 170 mM КСl) и инкубировали еще 30 мин. После очередного центрифугирования споры ресуспензировали в 6 объемах раствора 3 (25 mM Трис, 10 mM ЭДТА, 170 mM КСl). Перенос спор в последний раствор вызывал выброс полярных трубок и выход спороплазм в течение 1-15 мин (Sokolova et al., 2003).

Другим объектом экспериментальной работы, проводимой в США в лаборатории известного патолога насекомых Джеймса Фуксы, были колонии огненных муравьев *Solenopsis invicta*, зараженные микроспоридией *Thelohania solenopse* Knell, Allen, Hazard 1977, переведенный автором диссертации в новый род *Kneallhazia* на основании ультраструктурного и молекулярно-филогенетического анализа. Колонии муравьев,

зараженные микроспорицией, идентифицировали в природе с помощью разработанных нами молекулярных и светооптических методов диагностики (Fuxa et al. 2005; Milks et al., 2004; Sokolova et al., 2004b; Таблица 1) и переносили в лабораторию. Эти колонии изымались либо из естественно зараженной популяции муравьев (сайт «Rosepine, LA»), либо из сайтов, куда микроспориции были внесены искусственно 3 года назад (сайты «St Joseph, LA» и «Clinton, LA») (Fuxa et al., 2005; Sokolova et al., 2004a). Колонии содержались в лаборатории по стандартным методикам, описанным ранее (Banks et al., 1981). Возраст личинок определяли по O'Neal and Markin (O'Neal, Markin, 1975). Оплодотворенных самок (королев) полигинных колоний определяли по наличию сперматек или фолликул с яйцами в проксимальном участке овариол.

### 2.1.3 Клеточная экспериментальная система

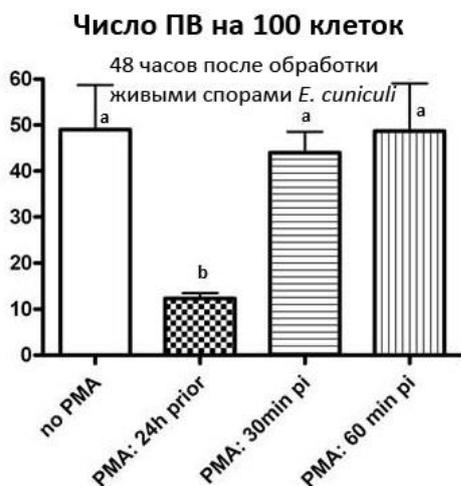
Клетки моноцитарной лейкемии человека ТНР-1 (American Type Culture Collection) выращивали в среде RPMI 1640 (Mediatech Inc., Herndon, VA), с добавлением 5% фетальной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамин и антибиотиков (100 единиц пенициллина / мл, 100 мкг стрептомицина / мл) (полная среда RPMI). Микроспориций *E. cuniculi* (первоначально выделенные из кролика, ATCC # 50503) и *V. corneae* (первоначально выделенные из человека, ATCC # 50505), выращивали в RK-13 кроличьих эпителиальных клетках почек (ATCC # CCL-37) также в полной среде RPMI, которую меняли два раза в неделю. Супернатанты, содержащие споры микроспориций, хранили в стерильных колбах при 4 °C.

Суспензию спор микроспориций обогащали за счет разрушения остатков клеток, как описано ранее (Didier et al., 2010). Обогащённые супернатанты переносили в пробирки, центрифугировали (400 × 10 мин при 4 °C) и промывали последовательно центрифугированием в dH<sub>2</sub>O, 0,3% Tween 20 в TBS и TBS. Осадки ресуспендировали в TBS, смешивали с равным объемом 100% перкола (50% Percoll) и центрифугировали в течение 45 минут при 500 × g. Осадки, содержащие споры, снова промывали TBS и суспендировали до желаемой концентрации. Суспензии мертвых спор были получены кипячением живых спор в течение 15 мин. Концентрации спор подсчитывали в гемоцитометре в фазово-контрастный микроскоп при увеличении 400X, используя конденсор.

*Инфекция клеток ТНР-1, дифференциация форбол-миристалом и индукция апоптоза.* Клетки ТНР-1 высевали на 4 × 10<sup>6</sup> клеток на мл в 6- или 24-луночных планшетах для проведения флуориметрического анализа каспазы 3, или в 8-луночных предметных стеклах с камерами (chamber slides, Nalge Nunc International, Naperville, IL)

для анализа методом TUNEL (in situ Terminal deoxynucleotidyltransferase - mediated dUTP Nick End-Labeling). Живые или мертвые споры микроспоридий добавляли в соответствующие лунки при отношении паразита к клетке-хозяину 3: 1. Через 30 мин культуры обрабатывали 40-80 нМ (25-50 нг / мл) форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и инкубировали в течение 24 часов, для стимуляции дифференцирования THP-1 моноцитов в адгезивные макрофаги. Затем культуры трижды промывали для удаления PMA и добавляли свежую полную среду RPMI. Апоптоз был экспериментально индуцирован добавлением 1μM (50 нг / мл) стауроспорина (Staurosporine, Sigma) (время указано при описании результатов).

Обработка клеток PMA за 12-24 часа до внесения спор микроспоридий приводила к снижению числа клеток с паразитофорными вакуолями (ПВ) в 3,5 раза. Такая реакция регистрировалась 48 часов после внесения спор микроспоридии. Напротив, обработка PMA через 30-60 мин после заражения спор не отражалось на количестве ПВ и, в тоже время, приводила к желаемой адгезии макрофагов к поверхности стекла (Рис. 2-1). Таким образом, было принято решение о внесении PMA, агента, стимулирующего дифференцировку моноцитов в макрофаги, после заражения микроспоридиями.



**Рисунок 2-1.** Обработка форбол миристаном (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA) за 24 часа до внесения спор, ингибирует развитие *Encephalitozoon cuniculi* в THP-1. Достоверное снижение числа клеток с паразитофорными вакуолями (ПВ), в которых развиваются и размножаются паразиты, наблюдалось 48 ч после заражения. 1-я колонка: необработанные клетки; 2-я колонка: PMA за 24 часа до применения спор; 3-я колонка: PMA 30 мин после инфицирования (пи); 4-я колонка: PMA 60 мин пи. Количество клеток с ПВ после окрашивания паразитов 2-ми антителами-Alexa 488 и TO-PRO-3. Клетки наблюдали при увеличении 60X в конфокальный микроскоп. Колонки: среднее ± SEM 3-х экспериментов. P <0,05 (Tukey HSD test).

**Таблица 2-1.** Систематическое положение хозяев и номера SSUrDNA сиквенсов в Генбанке для видов микроспоридий, описанных или изученных автором диссертации

| Вид микроспоридии                           | Вид хозяина                         | Класс, отряд хозяина    | № сиквенса в Генбанке | Литературные источники                           | №  |
|---|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|--|----|
| 1   | 2                                   | 3                       | 4                     | 5  | 6  |
| «Высшие» микроспоридии                      |                                     |                         |                       |  |    |
| <i>Agglomerata cladocerae</i>               | <i>Daphnia magna</i>                | Branchiopoda, Cladocera | KT950767              | (Larsson et al., 1996; Sokolova et al., 2016b),  | 1  |
| <i>Agmasoma penaei</i>                      | <i>Litopenaeus setiferus</i>        | Malacostraca, Decapoda  | KF549987              | (Hazard, Oldacre, 1976; Sokolova et al., 2015)   | 2  |
| <i>Alfvenia sibirica</i>                    | <i>Cyclops</i> sp.                  | Maxillopoda, Cyclopida  | KT950766              | (Sokolova et al., 2016b)                         | 3  |
| <i>Alfvenia ceriodaphniae</i>               | <i>Ceriodaphnia reticulata</i>      | Branchiopoda, Cladocera | n/s                   | (Видтманн, Соколова, 1995)                       | 4  |
| <i>Anncaliia azovica</i>                    | <i>Niphargogammarus intermedius</i> | Malacostraca, Amphipoda | KY288064-<br>KY288065 | (Tokarev et al., 2018)                           | 5  |
| <i>Antonospora psocopterae</i>              | <i>Xanthocaecilius sommermanae</i>  | Insecta, Psocoptera     | FJ865222              | (Sokolova et al., 2010b)                         | 6  |
| <i>Apotaspora heleios*</i>                  | <i>Palaemonetes paludosus</i>       | Malacostraca Decapoda   | MG 708238             | (Sokolova, Overstreet, 2018)                     | 7  |
| <i>Encephalitozoon pogonae</i>              | <i>Pogona vitticeps</i>             | Reptilia, Squamata      | KR998311              | (Sokolova et al., 2016a)                         | 8  |
| <i>Heterovesicula cowani</i>                | <i>Anabrus simplex</i>              | Insecta, Orthoptera     | EU275200              | (Lange et al., 1995; Sokolova et al., 2008)      | 9  |
| <i>Kneallhazia (Thelohania) solenopsae*</i> | <i>Solenopsis invicta</i>           | Insecta, Hymenoptera    | AF031538              | (Moser et al., 1998; Sokolova, Fuxa, 2008)       | 10 |
| <i>Larssonia obtusa*</i>                    | <i>Daphnia pulex</i>                | Branchiopoda, Cladocera | AF394527              | (Refardt et al., 2002; Видтманн, Соколова, 1994) | 11 |
| <i>Liebermannia (Perezia) dichroplusae*</i> | <i>Dichroplus elongatus</i>         | Insecta, Orthoptera     | EF016249              | (Lange, 1987; Sokolova et al., 2007)             | 12 |
| <i>Liebermannia covasacrae*</i>             | <i>Covasacris pallidinota</i>       | Insecta, Orthoptera     | EU709818              | (Sokolova et al., 2009)                          | 13 |
| <i>Liebermannia patagonica*</i>             | <i>Tristira magellanica</i>         | Insecta, Orthoptera     | DQ239917              | (Sokolova et al., 2006b)                         | 14 |
| <i>Microsporidium phoronidi</i>             | <i>Phoronis embryolabi</i>          | Phoronida               | n/s                   | (Temereva, Sokolova, 2018)                       | 15 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 1                 | <i>Xanthocaecilius sommermanae</i>  | Insecta, Psocoptera     | FJ865221              | (Sokolova et al., 2010b)                         | 16 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 4                 | <i>Polypsocus corruptus</i>         | Insecta, Psocoptera     | FJ865224              | (Sokolova et al., 2010b)                         | 17 |

Таблица 2-1 (продолжение)

| 1  | 2  | 3   | 4        | 5   | 6  |
|--|--|---|----------|---|----|
| <b><i>Mockfordia xanthoaciliae</i></b> *                                 | <i>Xanthoacilius sommermanae</i>   | Insecta,<br>Psocoptera                                    | FJ865223 | (Sokolova et al., 2010b)  | 18 |
| <i>Nosema bombi</i> <sup>+</sup><br>( <i>B. impatiens</i> isolate)       | <i>Bombus impatiens</i> ,<br><i>B. sandersoni</i>  | Insecta,<br>Hymenoptera                                   | GQ254295 | (Fries et al., 2001;<br>Sokolova et al., 2010a)                     | 19 |
| <i>Nosema disstriae</i>  | <i>Malacasoma disstria</i>   | Insecta,<br>Lepidoptera                                   | EU219085 | (Kyei-Poku et al., 2008;<br>Kyei-Poku, Sokolova, 2017)              | 20 |
| <b><i>Paranosema (Nosema) grylli</i></b> *                               | <i>Gryllus bimaculatus</i>   | Insecta,<br>Orthoptera                                    | AY305325 | (Sokolova et al., 2003;<br>Соколова и др., 1994)                    | 21 |
| <i>Paranosema (Nosema, Antonospora) locustae</i> *                       | <i>Locusta migratoria</i> ,<br><i>Dichroplus schulzi</i> ,<br><i>Schistocerca cancellata</i> | Insecta,<br>Orthoptera                                    | AY305324 | (Canning, 1953;<br>Sokolova, Lange, 2002;<br>Sokolova et al., 2003) | 22 |
| <i>Paranosema (Nosema) whitei</i> *                                      | <i>Tribolium castaneum</i>   | Insecta,<br>Coleoptera                                    | AY305323 | (Milner, 1972;<br>Sokolova et al., 2005)                            | 23 |
| <i>Perezia nelsoni (LA-2014 isolate)</i> <sup>+</sup>                    | <i>Litopenaeus setiferus</i>   | Malacostraca,<br>Decapoda                                 | n/s      | (Canning et al., 2002;<br>Sokolova, Hawke, 2016)                    | 24 |
| <i>Systemostrema alba</i>  | <i>Aeshna viridis</i>  | Insecta,<br>Odonata                                       | AY953292 | (Larsson, 1988;<br>Sokolova et al., 2006a)                          | 25 |
| «Низшие» микроспоридии – метchnikовеллиды, гиперпаразиты морских полихет |  |   |          |   |    |
| <i>Metchnikovella incurvata</i>  | <i>Polyrhabdina sp./ Pygospio elegans</i>  | Apicomplexa,<br>Gregarinosina/<br>Annelida,<br>Polychaeta | n/s      | (Caullery, Mesnil, 1914;<br>Sokolova et al., 2013)                  | 26 |
| <i>Metchnikovella spiralis</i>   |  |   | n/s      | (Sokolova et al., 2014)   | 27 |

**Пояснения к таблице 2.** Ряды таблицы с ранее описанными видами, изученными автором с помощью ЭМ и филогенетического анализов, выделены серой заливкой. Новые роды выделены жирным красным (серым при ч/б печати) шрифтом и помечены звездочкой (\*). Новые виды выделены жирным черным шрифтом. Знаком плюс (+) обозначены географические изоляты ранее описанных видов, которые были охарактеризованы автором. Серым шрифтом выделены неописанные виды, новые для науки, но недостаточно охарактеризованные морфологически, у которых автору удалось отсеквенировать МСрDNA. n/s (no submitted), сиквенсы, не представленные в Генбанке.

## 2.2 Методы и методология морфологических исследований

### 2.2.1 Световая микроскопия

**Визуализация живых организмов.** Первый этап поиска и идентификации зараженных микроспоридиями организмов и тканей – это просмотр мазков потенциально зараженных организмов, клеток или тканей в световой микроскоп при увеличении 400X и 1000X. Просмотр неокрашенных препаратов в светлом поле мало информативен. Для усиления контраста применяли фазовый-контраст и/или дифференциальный контраст по Номарскому, или просматривали мазки в темном поле.

Фазовый контраст позволяет визуализировать выброшенные полярные трубки и спороплазмы, а также дифференцировать интактные споры от пустых оболочек, обладающих более низким индексом рефракции, что важно при оценке чистоты и качества суспензии спор для инокуляции и для выделения нуклеиновых кислот. Дифференциальный контраст по Номарскому, особенно при использовании современных микроскопов серии Leica DM 2500 с Plan-Apo объективными линзами, позволяет получать изображения, по информативности мало уступающие электронной микроскопии. Этот метод мы применяли при идентификации и изучении заражения живых грегарин мечниковеллидами (Sokolova et al., 2014).

**Окраска микроспоридий для просмотра в светлом поле.** Стандартный метод окраски спор, применяемый для диагностики микроспориозов беспозвоночных животных и человека – это окраска фиксированных метанолом мазков «Трихромом по Веберу». Основной компонент этой краски, Chromotrope 2R, связывается с хитином оболочки спор и окрашивает зрелые споры в красный цвет с характерной слабоокрашенной «перевязью». Фоновая окраска обеспечивается связывающимися с белками красителями Fast Green (зеленый фон при стандартной окраске) или Aniline Blue (голубой фон при окраске по методу «модифицированного трихрома», Weber et al., 1999). Для изучения жизненного цикла микроспоридий на световом уровне традиционно применяли окраску эозин-азуром-метиленовым синим «по Романовскому-Гимза». Концентрированный раствор готовили из 1 г сухого порошка Гимза (Sigma G 9641), разведенного 100% метиловым спиртом (66 мл) и глицеролом (66 мл) и перед употреблением разбавляли натриево-фосфатным буфером (0.067M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> +0.067M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) в 10-20 раз. Несмотря на многолетнее использование (Vávra, Maddox, 1976), этот метод весьма капризен и дает нестабильные результаты, которые значительно зависят от pH, однако альтернативы этому методу в настоящее время нет. При правильно подобранном pH, ядра клеток хозяина окрашиваются в красный цвет, а цитоплазма в голубовато-сероватый. Стадии микроспоридий – голубые с фиолетовыми ядрами, споры – темно-синие (незрелые) или слабоокрашенные (зрелые) и имеют характерный рисунок окрашивания (Sokolova et al., 2015; Sokolova, Fuxa, 2008).

**Гистология и цитохимия.** Тканевую локализацию инфекции определяли либо на гистологических срезах объектов, залитых в парафин, либо на толстых срезах тканей, залитых в эпон-аралдит для электронной микроскопии. В первом случае, морских животных, например, креветок и крабов, фиксировали коммерческим (EMS 641333) фиксатором Дэвидсона (Davidson's (Hartmann's) fixative), который содержит 37% формалина, а также этанол, ледяную уксусную кислоту и воду в соотношении 2:3:3:3.

Примерно 5 мл фиксатора инъецировали в каждую особь, которую затем помещали в свежую порцию того же фиксатора и хранили при температуре 4 °С. Из фиксированных особей вырезали участки тканей шириной примерно 10 мм, раскладывали в пластиковые держатели для гистологических препаратов, обезвоживали через серию этанола понижающейся концентрации и заливали в параффин с помощью процессора Tissue Tek VIP 5 (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA). Срезы толщиной 5 мкм монтировали на предметные стекла, депараффинизировали и окрашивали гематоксилином Бьибриха (Hematoxylin-Biebrich scarlet solution), известным под названием «Luna stain». Недавно было продемонстрировано, что этот метод, обычно используемый для окрашивания гранул, содержащихся в эритроцитах и эозинофилах, селективно окрашивает ткани, зараженные микроспоридиями (Peterson et al., 2011). С помощью этого метода автору удалось уточнить тканевую локализацию микроспоридии *Agmasoma penaei* в креветках *Panaeus setiferus* (Sokolova et al., 2015). При гистологическом анализе тканей бородачатой агамы *Pogona vitticeps* микроспоридией *Encephalitozoon pogonae*, срезы тканей толщиной 5-7-мкм, залитых в параффин, депараффинизировали и окрашивали гематоксилин-эозином (H&E) по рутинной методике (Fischer et al., 2008). Этот метод позволил выявить сайты грануломатозного воспаления различных органов, вызванного заражением микроспоридией (Sokolova et al., 2016a). Полутонкие (500 нм) срезы тканей, залитых в епон-аралдит, окрашивали раствором метиленового синего в собственной модификации. Концентрированный раствор приготавливался длительным кипячением 1% метиленового синего в 4% процентном растворе бората натрия в воде. Непосредственно перед употреблением этот раствор фильтровался через 0.2 мкм фильтр и разбавлялся дистиллированной водой в 5-7 раз (Логинов и др., 1987). Этот метод дает монохромное голубоватое окрашивание тканей, более интенсивно связывается с базофильными структурами, например, ядрами, а также окрашивает липиды в ярко зеленый цвет.

**Цитохимический анализ маркеров апоптоза методом TUNEL.** Клетки, выращенные в chamber slides, фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабелизировали в течение 30 минут 0,2% Triton X-100 (Sigma) и подвергали окрашиванию TUNEL колориметрическим методом (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega, Madison WI). Биотинилированные нуклеотиды на 3'-ОН концах ДНК в местах разрывов ДНК-цепочек, характерных для апоптотических ядер, метилились стрептавидином-HRP и выявлялись с использованием перекиси водорода и субстрата пероксидазы – диаминобензидина (DAB). Апоптотические ядра окрашивались в темно-коричневый цвет. После заключения препаратов в среду Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), стекла просматривали под микроскопом Leica (NBN) со встроенной цифровой

камерой SPOT при 400X. Для каждого варианта фотографировали 5 полей зрения, в каждом из которых определялась доля TUNEL-положительных ядер относительно общего числа ядер.

### 2.2.2 Флуоресцентная и конфокальная микроскопия

**Окраска микроспоридий и ядерные красители.** Наряду с окраской трихромом, рутинным и чувствительным методом выявления заражения микроспоридиями является окраска флуоресцентным красителем Калькофлором (Calcofluor White). Этот краситель связывается с хитином оболочки спор и окрашивает споры в голубой цвет (соотношение длин волн абсорбции/эмиссии 380/470 nm) (Weber et al., 1999). Для окраски ядер использовали ДАПИ (DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole, 405/488 nm) или (для фиксированных мазков) TO-PRO-3 (642/661 nm). Хорошие результаты дало одновременное применение калькофлора и ДАПИ, в том числе, для окраски и определения числа ядер живых спор.

**Иммунофлуоресцентный анализ** методом непрямой иммунофлуоресценции (ИФА) применяли при изучении внутриклеточного развития микроспоридий рода *Paranosema*. Зараженное жировое тело насекомых разрушали в стеклянном гомогенизаторе тефлоновым пестиком в присутствии PBS и помещали на покровное стекло, предварительно обработанные полилизинном. Стекла с жировым телом фиксировали 4%-м параформальдегидом 15 мин, промывали PBS и покрывали тонким слоем 5% желатина. Клетки пермеабелизовали в течение 1 часа в растворе, содержащем 0.1% Тритона X100, 50 mM NaCl и 0.5% BSA в PBS. Полученные препараты блокировали 1 час при комнатной температуре инкубацией в блокирующем растворе (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.05% Tween-20 и 1% BSA) и инкубировали с поликлональными антителами (полученными и очищенными Долгих В.В. (Dolgikh et al., 2005), разбавленными 1:20 или 1:50 в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C или 2 часа при комнатной температуре. После отмывки в TBS-Tween клетки обрабатывали вторыми антителами против иммуноглобулинов кролика или мыши, конъюгированными с флуорохромами Alexa Fluor 546 и Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США). Коммерческие антитела разводили 1:50 в блокирующем растворе (0.1% Тритона X100, 50 mM NaCl и 0.5% BSA).

Для анализа клонов антител, полученных из гибридомы мыши, иммунизированной антигенами *Paranosema grylli* (Sokolova et al., 2000), споры этой микроспоридии наносились на предметные стекла, обработанные полилизинном. Слайды со спорами хранили при -20 °C и перед проведением ИФА фиксировали охлажденным ацетоном 10 мин. В качестве первых антител использовали либо гипериммунную сыворотку мышей,

разведенную в 100 раз, либо неразбавленные супернатанты культуры клеток гибридомы. Вторые антитела были конъюгированы с FITC.

Метод ИФА применяли также для окрашивания микроспоридий антителами при идентификации заражения в культурах клеток и для изучения апоптоза в индивидуальных клетках ТНР-1. В этом случае клетки инкубировали в 0,2% растворе желатина кожи рыб (FSG, Sigma) в PBS (30 мин) и в 10% сыворотке козы (NGS, GIBCO) (40-60 мин) для блокировки неспецифического связывания антител, а затем в растворе первых антител (60 мин при КТ или 12 ч при 4 °С). Первые антитела представляли собой очищенную поликлональную сыворотку кролика против комбинации видов микроспоридий (*Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem* и *Vittaforma corneae*) (Didier Lab, Covington, LA). Первые антитела разводили в 200 раз 10% NGS. Стекла промывали в PBS, содержащем 0,2% FSG, а затем в PBS, содержащем 0,1% Triton X-100. Затем стекла с клетками инкубировали в суспензии вторых антител, Goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR), конъюгированных с Alexa 488 (1:100 в 10% NGS, 60 мин, КТ). После отмывки в PBS стекла окрашивали флуоресцентным красителем To-Pro-3 (Molecular Probes) для идентификации ядер клеток-хозяев. Обработанные антителами препараты заключали в Vectashield (Vector Labs, США) и анализировали с помощью флуоресцентной/конфокальной микроскопии, используя различные системы: ZEISS ICM 405; AxioImager M1 (Carl Zeiss), Leica TCS SP5, Leica TCP SP2. Для выявления микроспоридий делали примерно 12-14 оптических срезов с интервалами 0,3-0,5 мкм. В качестве негативного контроля вместо первых антител препараты обрабатывали неимунной сывороткой.

**Флуоресцентный анализ маркеров апоптоза в индивидуальных клетках методом TUNEL.** При использовании флуоресцентного метода TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit, TMR-red, Roche, Indianapolis, IN) концевые нуклеотиды непосредственно связывались с флуоресцентным красителем тетраметил-родамином (Tetramethylrhodamine, TMR) с максимумом поглощения в красной области спектра (максимумы поглощение/эмиссия, 542/574 нм). Клетки выращивались в chamber slides на покровных стеклах (coverslip system), фиксировались и обрабатывались, как описано выше для колориметрического метода, окрашивались TMR и хранились в PBS при 4 °С. После дополнительного окрашивания DAPI и антителами против микроспоридий, препараты заключали в среду Vectashield и наблюдали в конфокальный микроскоп Leica TCP SP2. Для TMR (542/574 нм) и TO-PRO-3 (642/661 нм) использовали гелиевый лазер (GHeNe), для Alexa-488 (495/519 нм) – аргоновый (Argon Ion) лазер. Для каждого анализа были выполнены три независимых эксперимента.

### 2.2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия

**Метод ультратонких срезов.** Следующий базовый протокол использовался для трансмиссионной микроскопии микроспоридий и зараженных тканей хозяев, выделенных из природы. Кусочки зараженных тканей фиксировали первичным фиксатором, 2,5% глутаральдегидом в 0,1% какодилатном буфере, или смесью глутаральдегида и параформальдегида (1,6% параформальдегида, 2,5% глутаральдегида, 0,03% CaCl<sub>2</sub> в 0,05 М какодиловом буфере, pH 7,4) как минимум в течение 2-х часов при комнатной температуре (КТ). При необходимости образцы находились в первичном фиксаторе до 30 суток, при 4 °С (оптимально) или при КТ. Затем кусочки тканей промывали в 0,1 М какодилатном буфере с добавлением 5% (0,15 М) сахарозы, переносили в 1% или 2% тетроксид осмия на 1 час, промывали в воде и помещали в 2% уранилацетат в 0,2 М ацетатном или малеатном буфере (pH 3,5-5,0) на 2 часа. Образцы тщательно промывали тем же буфером и дегидратировали в серии этилового спирта восходящей концентрации (30 – 100 %) и в пропиленоксиде, после чего их заключали в смесь эпона 812 и аралдита.

Для анализа суспензии спор или осадков гемоцитов или клеточных линий при культивировании микроспоридий *in vivo*, после первичной фиксации и промывки буфером осадки заливали в 3% агарозу. Агарозные блоки разрезали на кусочки примерно 1 мм<sup>2</sup> и помещали в свежую порцию фиксатора на 1 час. В дальнейшем агарозные блоки обрабатывали так же, как кусочки тканей.

Фиксацию «восстановленным осмием» проводили, как описано ранее (Polishchuk et al., 1999). Образцы фиксировали 2,5 % раствором глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере или буфере Нерес (pH 7.2-7.4), а затем инкубировали в растворе 2% четырех-оксида осмия и 3% ферроцианида калия (1:1) на 0,2 М какодилатном буфере (pH 7.4) 1 час при КТ. После 6-ти кратной промывки PBS, проводили дегидратацию и остальные стандартные процедуры. Этот метод усиливает контраст мембран секреторного пути и был эффективен для демонстрации структур, связанных с аппаратом Гольджи микроспоридий.

Для усиления контраста белков использовали 1% раствор таниновой кислоты на 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,0). Образцы инкубировали в этом растворе после осмирования, а затем отмывали сначала тем же буфером, а затем водой и обезвоживали в спиртах.

Срезы изготавливали на ультратомах Reichert 2E или Leica EM UC7. Тонкие (70-90 нм) срезы окрашивали цитратом свинца в течение 5 мин и исследовали в микроскопах Hitachi-H300 с фотокамерой, JEOL JEM 1011 или JEOL JEM 1440, оснащенных

цифровыми камерами HAMAMATSU ORCA-HR или GATAN при ускоряющем напряжении от 70 до 120 Кв. Все реагенты для электронной микроскопии были от EMS (Hatfield, PA).

**Трехмерная реконструкция серийных срезов.** Для получения серийных срезов с помощью алмазного ножа (Trimtool 45, Diatome) сначала изготавливали пирамидки размером 40-60 x 250-350 мкм. Для трехмерных изображений анализировали 20-40 срезов толщиной 60 нм, полученных с помощью стандартного алмазного ножа (Ultra 45, Diatome) на ультратоме Reichert 2E или Leica EM UC7. Срезы собирали на бленды (размер отверстия  $2 \times 1.5$  мм) с формваровой подложкой, укрепленной углеродной пленкой, и контрастировали раствором уранилацетата и цитрата свинца по Рейнольдсу. Непрерывность структур, например, секреторного компартмента микроспоридий или манубриальной цистерны мечниковеллид прослеживали на последовательных срезах. Изображения, снятые при увеличении от 20000X до 60000X, совмещали, используя программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) и IMOD (<http://bio3d.colorado.edu/imod/doc/serialalign.html>).

**Электронная томография.** Серию из 10-15 последовательных эпон-аралдитовых срезов толщиной 150-200 нм переносили на бленды с формваровой подложкой. Для маркировки срезов при совмещении изображений на высушенные срезы наносили протеин А, конъюгированный с частицами золота 10 нм в диаметре, разведенном в воде 1:25 для достижения плотности мечения 1-2 гранулы на  $100 \text{ нм}^2$ . Обработанные коллоидным золотом сетки, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, помещали в держатель гониометра и анализировали в электронном микроскопе Теспаи 12 EM (FEI) при ускоряющем напряжении 120 кВ. Перед анализом срез облучали в течение 3-5 минут пучком электронов в отсутствие конденсорной диафрагмы для равномерного выжигания недополимеризированной смолы (обеспечивает равномерное истончение срезов), а затем устанавливали диафрагму и центрировали ось вращения гониометра. Отбор изображений выбранной структуры осуществляли от  $+70^\circ$  до  $-70^\circ$  угла наклона гониометра при увеличениях в 26000, 43000, 60000 и 83000 X в зависимости от выбранных структур. Для достижения высокого разрешения томограмм изображения отбирались через каждый градус, т.к. разрешение обратно пропорционально толщине срезов и углу между проекциями. После отбора 141-го изображения, всю серию анализировали с помощью программы для томографии IMOD <http://bio3d.colorado.edu/imod/doc/serialalign.html>. Суть анализа состояла в том, что программа выстраивала срезы по одной оси изображения, основываясь на взаимном расположении гранул золота, а затем высчитывала оптическую плотность для каждого

трехмерного пикселя ("вокселя", voxel), единицы объема структуры. Результат вычисления был представлен в виде виртуальных срезов толщиной 2-3 нм, т.е. формальное разрешение было 4-6 нм, а учитывая возможность анализа срезов по всем трем осям (XYZ), уровень разрешения теоретически достигал 2-3 нм, что в 40-60 раз превышает разрешение изображения при толщине среза 60 нм (примерно 120 нм). Полученные серийные виртуальные срезы программа использовала для построения трехмерного изображения. Количественный анализ проводили для каждой томограммы. В каждом эксперименте оценивали 5 или более томограмм.

**Ультраструктурная цитохимия.** Для выявления цис компартмента Гольджи использовали метод длительной осмиевой импрегнации (Jezernik, Pipan, 1991). Образцы инкубировали в 2%-ном водном растворе OsO<sub>4</sub> в течение 2-24 ч при 40 °С, а потом готовили к просмотру в электронном микроскопе по стандартной методике.

Для идентификации транс-Гольджи применили метод окрашивания тиамин пирофосфатазой (ТПФ) (Novikoff, Goldfischer, 1961) – специфическим маркером транс-Гольджи. Инкубационная среда содержала 25 мг субстрата, тиамин пирофосфата, 7 мл би-дистиллированной воды, 10 мл трис-малеатного буфера, доведенного до pH 7.2 с помощью NaOH, 5 мл 0.025M MnCl<sub>2</sub>, и 3 мл 1% нитрата свинца. Криосрезы жирового тела сверчка, зараженного *P. grylli*, изготавливали на криостате Leica CM1850. Для этого отпрепарированную жировую ткань фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS, промывали PBS, содержащим 50 мМ глицин, и инкубировали 30% растворе сахарозы, которая служила криопротектором. Замороженные срезы толщиной 5-7 мкм обрабатывали инкубационной средой в течение 1 час при 37 °С, отмывали водой, фиксировали тетраоксидом осмия и заливали в эпон-аралдит по стандартной методике.

#### 2.2.4 Специальные методические подходы ТЭМ, используемые для доказательства непрерывности секреторного пути микроспоридий и отсутствия везикул

*Заморозка при высоком давлении (High Pressure Freezing, HPF), совмещенная с фиксацией методом замораживания-замещения (freeze-substitution)* (Dahl, Staehelin, 1989; McIntosh, 2001; Shimoni, Müller, 1998), является единственным методом, позволяющим фиксацию нативной структуры клетки, т.к. иммобилизация структур под высоким давлением (2100 бар) и при низких температурах (-90 °С) происходит сверх быстро, в течение миллисекунд, и не сопровождается кристаллизацией воды, губительной для ультраструктуры. В результате последующей фиксации методом криозамещения, витрифицированная («аморфная») вода медленно замещается охлажденным абсолютным ацетоном, содержащим фиксатор, чем достигается

максимальная сохранность нативной морфологии. Мы решили воспользоваться этим подходом, т. к. существовала вероятность, что наблюдаемое отсутствие везикул связано с артефактом химической фиксации, вызывающей слияние мембран. Кусочки жирового тела размером 0.5-1 мкм<sup>2</sup> инкубировали в 20% BSA и замораживали в устройстве для сверхбыстрой заморозки при высоком давлении Leica EM HPM100, позволяющем увеличить толщину витрофицированной зоны с «хорошей» ультраструктурой до 200-250 мкм (при заморозке погружением в жидкий азот методом plunge-freezing толщина этой зоны <20 мкм). После заморозки образцы переносили в охлажденные до -90°C стальные контейнеры, содержащие 2% OsO<sub>4</sub> в обезвоженном ацетоне. Фиксацию замораживанием-замещением осуществляли в устройстве Leica EM AFS по протоколу, разработанному ранее в лаборатории А. А. Миронова (Mironov et al., 2001). Образцы (1) инкубировали при пониженных температурах в замещающем растворе: -90 °С, 8 часов; -60 °С, 8 часов; -30 °С, 8 часов; 0 °С, 1 час, со скоростью перехода от одной температуры к другой 30 °С/час; (2) промывали 2 раза обезвоженным ацетоном при 4 °С; (3) заливали в эпон-аралдит и полимеризовали при 60 °С, 24 часа. Электронная микроскопия и анализ трехмерной структуры шести тубулярных кластеров после заморозки под высоким давлением и замораживания-замещения показал отсутствие 50-60 нм везикул в клетках микроспоридий.

*Превентивное (перед фиксацией) ингибирование везикулярного транспорта в клетках паразита и хозяина с помощью обработки зараженного микроспоридиями жирового тела тетрафлюоридом алюминия (AlF<sub>4</sub>) и N-этилмалеимидом (NEM) предотвращает возможное сверхбыстрое слияния сформированной COP-1-везикулы с мембранами компартмента-акцептора. Теоретически, высокая скорость и кратковременность этого процесса могла препятствовать визуализации везикул. Белок NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) и его гомолог у дрожжей SEC18 (vesicular-fusion protein) – важные компоненты, опосредующие слияние мембран, в частности, слияние COP1-везикул с компартментами Гольджи в клетках млекопитающих и дрожжей. Последовательности ДНК, кодирующие NSF, отмечены у всех изученных видов микроспоридий, и на этом основании мы предположили, что ингибиторы NSF должны останавливать процесс слияния мембран и способствовать накоплению транспортных везикул, если таковые имеются, в клетке микроспоридий. Одним из эффективных*

ингибиторов SNARE<sup>10</sup>-зависимого слияния мембран является N-этилмалеимид (NEM), производное малеиновой кислоты, легко проникающий через биологические мембраны (Kweon et al., 2004; Mironov et al., 2001). Для изучения действия этого ингибитора на секреторный транспорт микроспоридий жировое тело саранчи частично разрушали тefлоновым пестиком в стеклянном гомогенизаторе, инкубировали в 1 М NEM, растворенном в PBS 10 мин, при 4°C, затем 2 минуты с ДТТ, отмывали буфером и фиксировали для электронной микроскопии. В клетках микроспоридий проведенная обработка не привела к появлению 50-60 нм везикул, хотя в клетках хозяина (положительный контроль) количество везикул увеличивалось в 5 раз. Другой агент, тетрафлюорид алюминия (AlF<sub>4</sub>), ингибирует процессы транспорта с помощью “раздевания”, т.е. снятия COPI- оболочки с мембран везикул (Cole et al., 1996). Разрушенное тefлоновым пестиком жировое тело сверчков инкубировали в растворе AlF<sub>4</sub> (20 mM NaF; 0.05 mM AlCl<sub>3</sub>), 20 мин при 37 °C, фиксировали и изучали в электронном микроскопе. Как и в предыдущем эксперименте, в клетках микроспоридий не наблюдали везикул, хотя в цитоплазме клеток хозяина число везикул увеличивалось приблизительно в три раза, а размер цистерн Гольджи при этом уменьшался, доказывая, что блокировка слияния везикул с цистернами Гольджи действительно имела место (Bezoussenk et al., 2007).

#### 2.2.5 Иммуноэлектронная микроскопия на срезах тканей, залитых в LR-White и на криосрезах по методу Tokuyasu (1973)

Насекомых препарировали на льду в фиксаторе для иммунной электронной микроскопии (4% параформальдегида, 1% глутарового альдегида в буфере PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ЭДТА, pH 7.4). Кусочки жирового тела размером 1-2 мм<sup>2</sup> переносили в свежую порцию фиксатора на 30 мин. Затем образцы отмывали буфером PHEM, обезвоживали в этаноле (30-50-70-90-100%) и заливали в среду LR-White. Блоки полимеризовали с помощью ультрафиолетовой лампы (длина волны 364 нм) при КТ либо при температуре 60°C. Срезы толщиной 60-65 нм изготавливались на ультратоме Reichert-Yung.

Для получения замороженных срезов образцы фиксированной, как описано выше, жировой ткани заключали в 10% желатин, охлаждали на льду и резали на блоки размером

---

<sup>10</sup> SNARE акроним для Soluble NSF(N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Protein) RЕсептор

1 мм<sup>3</sup> в холодной комнате. Блоки выдерживали в растворе 2.3 М сахарозы при 4 °С в течение 2-24 часов и замораживали в жидком азоте. Криосрезы толщиной 50-60 нм готовили на ультрамикротоме с приставкой для крио-ультратомии Ultracut R/FCS (Leica), снабженным антистатическим устройством (Diatome) при температуре -120 °С. Срезы собирали в раствор 2% метилцеллюлозы и 2.3 М сахарозы (1:1) с помощью петли super-loop (EMS) и помещали на сетки или бленды с формвар-углеродной подложкой.

Срезы тканей, залитых LR White, и криосрезы обрабатывали 0.12% раствором глицина в PBS, 20 мин, для инактивации остаточных альдегидных групп и 0.2% раствором ацелированного BSA (AURION, Wageningen, Netherlands) в PBS (инкубационный буфер), 20 мин. Затем срезы инкубировали 2 час при КТ с поликлональными антителами против следующих белков: джиантина (1:100); белка GM130 (1:50); белка гамма-COP (1:100); гомолога микроспорициального Sec13 (1:300); p40; anti-PTP A (неразбавленные очищенные сыворотки); а также с GNA-лектином, конъюгированным с частицами золота (1:20). При использовании моноклональных антител против поверхностных антигенов спор *P. grylli* собственного производства супернатанты гибридных клонов разводили 1:10 и 1:20. Для разведения антител использовали инкубационный буфер. В качестве вторых антител использовали либо IgG (goat-anti-mouse/ goat-anti-rabbit), либо белок А, конъюгированный с коллоидным золотым диаметром 10 нм (Aurion, Netherlands). В отдельных случаях использовали двойное мечение частицами коллоидного золота разного размера. В этом случае использовали первые антитела А и Б, выработанные в разных животных. Срезы инкубировали сначала с первыми антителами А и соответствующими вторыми антителами, затем фиксировали 1% глутаровым альдегидом, 5 мин, промывали 0.12% раствором глицина и 0.2% BSA-PBS и инкубировали в антителах Б и соответствующих вторых антителах. После последней обработки вторыми антителами, срезы опять фиксировали 1% глутаровым альдегидом (1 мин). Срезы, залитые в LR-White, контрастировали уранил-ацетатом и, при необходимости, цитратом свинца. Срезы, изготовленные по методу Tokuyasu, контрастировали уранил ацетатом и заключали в раствор метил целлюлозы и уранил ацетата (1мл 4% УА + 9 мл 2% метил целлюлозы), как описано в литературе (Peters, Pierson, 2008).

*Источники используемых антител, используемые для изучения аппарата Гольджи микроспоридий.* В работе использовались следующие антитела: поликлональные антитела (pAb) против белков GM130 и джиантина (giantin) (Marra et al., 2001); pAb против against гамма-субъединицы COP-I, выделенной из растения *Arabidopsis thaliana* (Pimpl et al., 2000); pAbs против различных субъединиц человеческих, дрожжевых и

растительных COP-I, любезно предоставленных коллегами (см. список источников в Beznoussenko et al., 2007) , ранее показавшими высокую эффективность (Eugster et al., 2004; Faulstich et al., 1996; Guo et al., 1994; Pimpl et al., 2000). Антитела против структурных белков оболочки споры и полярной трубки (белки p40 and PTP A), а также против микроспорициального гомолога Sec13, были получены и очищены В.В. Долгих (Beznoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2005).

#### 2.2.6 Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) суспензию спор или кусочки зараженных тканей фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом, обезвоживали в серии этилового спирта понижающейся концентрации, а затем замещали 100% этанол углекислым газом CO<sub>2</sub> в приспособлении для высушивания при критической точке (Polaron E3000, USA). Высушенные образцы монтировали на алюминиевые столики диаметром 13 мм, покрытые клеей пленкой-подложкой (carbon adhesive tabs, EMS). Образцы напыляли смесью золота и палладия в вакуумном напылителе EMS 550X в течение 4-8 мин для достижения толщины напыления 20–25 nm. Образцы просматривали в сканирующем микроскопе Fei Quanta 200 ESEM в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 15-20 кВ.

Все реагенты для световой микроскопии были получены от Sigma- Aldrich (Сент-Луис, Миссури), а для электронной микроскопии – от EMS Chemicals (Форт-Вашингтон, Пенсильвания, США), если не указан другой источник.

### 2.3 Биохимические и молекулярно-биологические методы

#### 2.3.1 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПАГЭ) и иммуноблоттинг

Для приготовления проб растворимых белков зараженной или незараженной ткани, жировое тело сверчка *Gryllus bimaculatus* гомогенизировали тefлоновым пестиком в стеклянном гомогенизаторе в PBS и центрифугировали при 160 g в течение 10 мин для осаждения ядер хозяина. Для приготовления проб растворимых белков спор, споры *Paranosema grylli* разрушали в ручном стеклянном гомогенизаторе с притертым стеклянным пестиком или встряхиванием на вортексе со стеклянными бусами диаметром 2 мм (BDH, Великобритания) в течении 30-40 минут при +4 °C в Трис-НСl буфере с добавлением 0.3 М сахарозы, затем центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. Супернатанты разбавляли равным объемом 2X буфера для образцов (БО): 125 mM Трис-НСl (pH 6.8), 4% ДСН, 10% 2-МЭ, 20% глицерин, 0.002% бромфенолового синего) и кипятили 5 мин. Осадки, полученные после центрифугирования спор, также кипятили в БО, 5 мин, и использовали для приготовления проб нерастворимых белков спор. Для

получения проб поверхностных белков спор, очищенные споры кипятили в БО 5 мин. Все образцы центрифугировали при 6000 g, для осаждения нерастворимых компонентов. Белки разделяли методом ДСН-ПАГЭ (Laemmly, 1970) в 12% геле в камере Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и окрашивали Кумасси R-250. На одну дорожку загружали 20-50 мкг белка. Концентрацию белка определяли по Брэдфорду (Bradford, 1976). Для иммуноблотинга разделенные в геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции. Мембраны инкубировали сначала 1 час в блокирующем растворе (50мМ Трис-НСl, 0.05% Tween-20, 1% BSA), а затем в иммунной сыворотке или в очищенных антителах, разбавленных блокирующим раствором, в течение ночи при 4°C или 2 часа при комнатной температуре. После отмывки Трис соевым буфером (ТСБ: 50мМ Трис-НСl) с добавлением Tween-20 (ТТСБ), мембраны инкубировали 2 часа при комнатной температуре со вторыми антителами, специфичными к IgG кролика или мыши, разведенными блокирующим раствором 1-500 – 1:4000. Вторые антитела были конъюгированы с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). После отмывки буфером ТТСБ мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции содержащем ТСБ, 15% метанол, субстрат для пероксидазы 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich, США) и 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.3.2 Флуориметрический анализ активности каспазы-3 (К-3)

В разное время после инфицирования и индукции апоптоза (т.е. через 1, 2, 4 и 8 дней после инфицирования и через 4-6 часов после активации апоптоза) клетки обрабатывали литическим буфером (250 мМ HEPES, pH 7,4, 25 мМ CHAPS, 25 мМ DTT), и лизаты собирали в микропробирки и хранили при -70 °С до использования. Активность К-3 измеряли с помощью набора для флуориметрического анализа в 96-луночном планшете (Caspase 3 fluorimetric assay kit, Sigma, St. Louis MO) строго по инструкции производителя. Принцип действия основан на гидролизе пептидного субстрата (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amido-4-methylcoumarin Ac-DEVD-AMC), в результате чего образуется флуоресцентный продукт 7-амино-4-метилкумарин (AMC). Оптическая плотность AMC определялась количественно с помощью микропланшетного спектрофотометра SPECTRAmaxM2 и рассчитывалась на мл белка. Концентрации белка в анализируемых образцах определялись с помощью Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL).

### 2.3.3 Выделение ДНК и ПЦР-амплификация

Задача выделения ДНК микроспоридий решалась по-разному в зависимости от доступности клеток паразита, от стадии жизненного цикла, на которой находится

паразит, и от задач конкретного проекта. Следует сказать, что эта задача, особенно для объектов, найденных в природе, может быть непростой. К счастью, гены рибосомального цистрона, чаще всего используемые для диагностики и филогенетических реконструкций микроспоридий, значительно дивергировали по сравнению с ортологами хозяев, поэтому, как правило, в случае невозможности получения очищенных спор или стадий, мы выделяли тотальную ДНК из зараженного хозяина и амплифицировали гены микроспоридий специфическими праймерами.

**Выделение геномной ДНК из очищенных спор микроспоридий и из зараженных тканей. Метод 1** извлечения ДНК из очищенных спор использовали для выделения геномной ДНК микроспоридий, заражающих прямокрылых насекомых, *Paranosema* spp. и *Liebermannia* spp., а также *Nosema disstrae* из лесного кольчатого шелкопряда. Споры разрушали встряхиванием на вортексе со стеклянными бусами в течение 30 мин в ФСБ при комнатной температуре с добавлением Протеиназы К (100 мкг/мл) и 0.5% ДСН. ДНК экстрагировали равным объемом фенола и хлороформа и осаждали добавлением 1/10 объема 3 М ацетата-Na (рН 5.2) и 3-х объемов 96% этанола. Осадки ресуспендировали в буфере ТЕ (10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 1 мМ ЭДТА), инкубировали 1 час при 37 °С в присутствии РНКазы А (0.05 мг/мл) для удаления примесей РНК, повторно экстрагировали фенолом и хлороформом, осаждали с помощью этанола или изопропанола и промывали 70% этанолом. Подсушенные осадки растворяли в воде или буфере ТЕ и хранили при -20 °С.

**Метод 2** использовали для выделения геномной ДНК *Agmasoma penaei* и *Perezia nelsoni*. Споры извлекались из сильно заражённых тканей креветок, хранившихся в холодильнике при -20 °С. Эти два вида могут встречаться одновременно в одном и том же хозяине. Несмотря на локализацию в разных тканях, пробы одного вида часто контаминированы вторым видом. Кроме того, толстые стенки спор и оболочки спорофорных пузырьков *A. penaei* представляют собой дополнительные барьеры для извлечения ДНК. Оттаявшие ткани гомогенизировали тefлоновым пестиком в стеклянном гомогонизаторе, фильтровали через марлю, а затем очищали от примесей 2-5-кратным центрифугированием, с последующим ресуспензированием осадков в PBS. Центрифугирование проводили в 15 мл пробирках в течение 10 мин при 3000 g в центрифуге AccuSpin 8C (Fisher Scientific, США). Чистоту осадка контролировали в фазово-контрастный микроскоп. Последний осадок ресуспензировали в 5 мл спор, помещали поверх 10 мл слоя 100% Перкола (Percoll Sigma-Aldrich) и центрифугировали 35 мин при 600 g. Споры *Agmasoma penaei* образовывали плотный осадок на дне пробирки, а более мелкие споры *Perezia nelsoni* – рыхлый слой примерно 1 см выше дна.

Нужные фракции отбирали в 1.5 мл центрифужные пробирки, ресуспензировали в PBS и промывали центрифугированием при 3000 g в центрифуге Eppendorf 5415C, 3 раза по 10 мин. Чистоту и целостность спор проверяли в фазово-контрастном микроскопе, отбирая для просмотра по 10-15 мкл суспензии спор. Конечный осадок ресуспензировали в 150 мл TAE-буфера (0,04 М Трис-ацетат Na, 0.01 М ЭДТА). Для разрушения спор и высвобождения ДНК, в пробирку добавляли 150 мг 0.1-0.3 мм стеклянных шариков (Mini-BeadBeater Glass Mill Bead, BioSpec – Cole-Parmer, IL, USA). Пробирку помещали в устройство для разрушения тканей (BulletBlender™ 24 bead-beater, NY, USA) на 1 мин при максимальной скорости, а затем нагревали при 95°C в течение 3-5 мин, после чего помещали на лед. Степень разрушенности спор (должна быть >50%) отслеживали, используя фазово-контрастную оптику. Для генотипирования с помощью рибосомальных генов, пробирки центрифугировали при 13000 g, и супернатант, содержащий ДНК микроспоридий, разбавляли в 10 или 100 раз и непосредственно добавляли в качестве ДНК матрицы в смесь для амплификации (Vossbrinck et al., 2004). Для ПЦР амплификации других генов, а также для секвенирования генома на платформе Illumina MiSeq (в настоящее время запущен проект по секвенированию *Agmasoma penaei*) ДНК из разрушенных спор выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, как описано выше или с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК (Zymo Research Quick-DNATM Universal Kit, Zymo Research, Irvine, CA, USA; Roche High Pure Template Preparations Kit, Roche Applied Sciences, Германия и др.).

Для идентификации и молекулярной характеристики микроспоридий из природных популяций беспозвоночных, а также для генотипирования *Encephalitozoon rogoanae* из бородатой агамы, ДНК микроспоридий выделяли из зараженных тканей. В некоторых случаях ПЦР был единственным методом выявления заражения, например, в личинках муравьев 1-3 возрастов, когда споры не формируются, паразит немногочислен и находится на ранних стадиях мерогонии, практически не выявляемых световой микроскопией. Почти для каждой паразит-хозяинной системы конкретные условия выделения ДНК подбирали экспериментально. Не вдаваясь в видоспецифичные детали, которые отражены в соответствующих публикациях, следует сказать, что были использованы три основных подхода для получения ДНК из зараженных хозяев для генотипирования микроспоридий: (1) гомогенат зараженных хозяев или их тканей непосредственно служил ДНК-матрицей в ПЦР реакциях, (2) гомогенат наносили на фильтровальную бумагу FTA (Whatman Inc., NJ, USA), пропитанную реактивами для иммобилизации и экстракции ДНК, (3) ДНК экстрагировали из зараженных хозяев или

тканей с помощью фенол-хлороформной экстракции или коммерческих наборов для выделения ДНК. Например, в работах автора, посвященных сравнению чувствительности этих подходов для идентификации заражения микроспоридиями колоний огненных муравьев (Milks et al., 2004; Sokolova et al., 2004a, b; Wang, Chen, 2007), муравьи гомогенизировались в эппендорфах одноразовым пластмассовым пестиком (система Koates Glass Co., Vineland, NJ, USA) ТСБ (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) в течение 15 сек. Затем в эппендорф добавляли стеклянные шарики диаметром 0.5 мм, в расчете приблизительно 0.04 г на одного муравья, и смесь разрушали в гомогенизаторе Mini-beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, USA), 15 сек. при максимальной скорости. Примерно 25 мкл смеси немедленно наносили на фильтровальную бумагу FTA (Whatman Inc., NJ, USA), которую использовали в ПЦР реакции по инструкции производителя. Более подробно об этом методе будет рассказано в разделе, посвященном изолированию ДНК микроспоридий из образцов стула человека. Остальную смесь нагревали до 95 °С, охлаждали на льду и центрифугировали при 16000 g, 15 сек, после чего супернатант переносили в чистую пробирку. Концентрацию ДНК в растворе определяли спектрофотометрически. Перед проведением ПЦР, раствор разбавляли ТСБ до концентрации ДНК 50-500 нг на одну реакцию. В альтернативном протоколе, муравьев гомогенизировали пластмассовым пестиком в эппендорфе в присутствии 150 мкл литического буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8, 4% додецилсульфат Na, 5% 2-меркаптоэтанол), 15 сек. ДНК экстрагировали фенол-хлороформом и осаждали изопропанолом. Осадок ДНК промывали дважды 70% этанолом и ресуспензировали в буфере TE. Интересно, что чувствительность ПЦР диагностики при использовании экстракта из зараженных тканей, непосредственно добавленного в ПЦР реакцию или нанесенного на FTA бумагу, не отличалась или даже была несколько выше, чем при использовании раствора ДНК (Milks et al., 2004). Для генотипирования *E. rogonaе*, ДНК изолировали из предварительно замороженных (-20 °С) тканей бородач агамы с помощью набора для экстракции ДНК (Zymo Research Quick-DNA™ Universal Kit (Zymo Research, Irvine, CA), следуя протоколу для твердых тканей (Solid Tissue Protocol) с модификациями. Небольшие (примерно 20-мг) кусочки ткани сердца с заметными гранулематозными поражениями белого цвета инкубировали в 200 мкл Solid Tissue Buffer с добавлением 20 mg/ml Proteinase K в течение 4 ч при 55 °С. Для высвобождения ДНК из спор, в пробирку добавляли 200 мг 0.1 мм стеклянных шариков и гомогенизировали встряхиванием в Bullet Blender™24 bead-beater (Next Advance, Inc., Averill Park, NY), 90 сек при максимальной скорости. Стеклянные шарики и остатки тканей и спор осаждали центрифугированием при 12000 g. Из супернатанта (150 мкл)

элюировали ДНК строго по протоколу. Конечный объем раствора ДНК в буфере для элюации был 35 мкл. Этот раствор служил матрицей для ПЦР. ДНК амплифицировали универсальными праймерами V1-1492 (см. таблицу), а генотип определяли по структуре участка, содержащего внутренний спэйсер (ITS) и фланкирующие последовательности LSU и SSU, который амплифицировали с помощью праймеров MSP3 и MSP2A (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996) (Таблица 2-2).

Используемые праймеры к различным участкам рибосомальной РНК, к генам альфа и бета тубулинов, а также гену RPB1 приведены в таблице 2. Наиболее универсальный баркод микроспоридий - это участок гена малой субъединицы, амплифицируемый праймерами V1F -1492R (Vossbrinck et al., 2004). Для амплификации этого региона использовали стандартный режим ПЦР: денатурация при 95 °С, 5 мин + 35 циклов (денатурация 95 °С, 30 сек; отжиг праймеров 45-55 °С, 60 сек; элонгация 72 °С, 2 мин) + конечная элонгация 72 °С, 10 мин. Продукты амплификации (12000 по) вырезали из 2% агарозного геля. Ампликоны очищали с помощью коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Секвенирование осуществляли с помощью системы Applied Biosystems BigDye Terminator (version 3.1) на секвенаторе «Beckman Coulter Seq 8000 DNA» в биотехнологической лаборатории Ветеринарного факультета Государственного университета штата Луизиана (GenLab, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge, LA). Для секвенирования использовали праймеры V1, 530r, 530f, 1061f и 1492r (Vossbrinck et al., 2004). Эти праймеры продуцировали пересекающиеся последовательности, которые собирали с помощью ChromasPro. 1.34 e (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Амплификацию и сиквенс осуществляли как минимум дважды для каждого образца. Условия ПЦР для других пар праймеров отличались незначительно и приведены в соответствующих статьях.

***Выделение ДНК из стула для ПЦР-диагностики и идентификации видов и генотипов микроспоридий человека.*** Основные сложности ПЦР диагностики кишечных микроспоридий связаны, во-первых, с наличием ингибиторов синтеза ДНК в стуле, а во-вторых, с необходимостью замораживания, хранения и транспортировки образцов, так как большинство российских клиник не оборудованы условиями для проведения ПЦР тестов. Первая проблема успешно решается применением коммерческих наборов для выделения ДНК. Для нашего проекта ДНК выделяли из замороженных образцов по методике (Xiao et al., 2002) с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) (Sokolova et al., 2011). Для решения второй проблемы адаптировали новый метод “Fast Technology Analysis” (FTA®), ранее

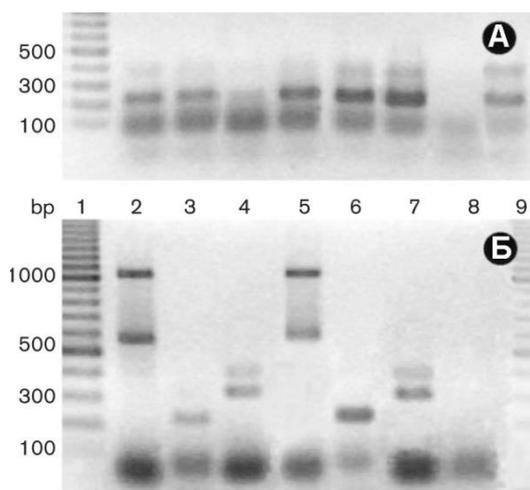
используемый нами для выявления зараженных микроспоридиями колоний муравьев, а также некоторыми другими авторами в экологических и эпидемиологических исследованиях (Duscher et al., 2009; He et al., 2007; Jaravata et al., 2006; Lampel et al., 2000; Mullen et al., 2009; Snowden et al., 2002). Для выявления человеческих микроспоридий данный метод ранее не использовался. Суть метода состоит в том, что ДНК-содержащая суспензия наносится на специально обработанную ДНК-адсорбентами фильтровальную бумагу, «FTA-карточку» (FTA-Cards, Whatman Inc., NJ, USA). В качестве ДНК-матрицы в ПЦР реакции используется ДНК, элюированная с FTA-карточки. Для анализа с помощью Whatman FTA® технологии из 159 образцов стула (по одному образцу на каждого пациента), случайным образом было отобрано пятьдесят образцов, в восьми из которых ранее были выявлены микроспоридии стандартными методами ПЦР и световой микроскопии (Sokolova et al., 2011; Соколова и др., 2011). Небольшое (размером с горошину 0.5-0.7 мм) количество свежеразмороженного или фиксированного 2.5%  $K_2Cr_2O_7$  стула отбирали деревянным аппликатором и ресуспендировали в 1мл ФСБ, фильтровали через марлю и центрифугировали при 14000 g 1 мин. Супернатант выкидывали, а осадок ресуспендировали в 125-250 мкл ФСБ с помощью вортекса. Сто двадцать пять мкл суспензии равномерно наносили на FTA-карточку с помощью микропипетки. Карточки с суспензией высушивали на воздухе, этикетировали и хранили при комнатной температуре до использования в ПЦР, но не меньше 30 суток. Перед проведением реакции из карточек вырезали диски размером 2 мм в диаметре с помощью специального резака. Дальнейшая обработка дисков для ПЦР анализа осуществлялась согласно инструкциям разработчика FTA®. ДНК либо элюировали с помощью FTA Purification Reagent (Whatman), либо же диски непосредственно погружали в реакционную смесь (1-3 диска на ПЦР пробирку). В исследованиях, выполненных в рамках диссертации, стояла задача оценить перспективы применения этой технологии в клинической медицине для архивирования и генотипирования ДНК микроспоридий из образцов стула. Впоследствии разработанный нами метод был успешно применен для исследования распространения латентного микроспоридиоза у жителей Камеруна (Ndzi et al., 2016).

Режим ПЦР, состав реакционной смеси, а также все последующие манипуляции с ампликонами (электрофорез, выделение из геля, секвенирование) были идентичными для ДНК, выделенной из образцов стула и элюированной с FTA карточек (Sokolova et al., 2011). Для амплификации использовали метод вложенной (nested) ПЦР, мишенями для которой были внутренний транскрибируемый спейсер (ITS) и фланкирующие регионы малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц гена рибосомальной ДНК. Прямые праймеры

MSP-1 (TGAATG [G/T]GT CCC TGT) и MSP-3 (GGA ATT CAC ACC GCC CGTC[A/G] [C/T] TAT) связывались с 3' участком SSU и узнавали широкий спектр видов, включая *Encephalitozoon* spp. и *E. bienewisi* (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). Обратные праймеры MSP-2B (GTT CAT TCG CAC TAC T) и MSP-4B (CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG) связывались с 5' участком LSU *E. bienewisi*, в то время как MSP-2A (TCA CTC GCC GCT ACT) и MSP-4A (CCA AGC TTA TGC TTA AGT [C/T] [A/C] A A[A/G] G GGT) узнавали *Encephalitozoon* spp. и некоторые другие микроспоридии, но не *E. bienewisi*. Реакцию проводили в объеме 25 мкл, используя «шарики» для ПЦР «Pure Taq Ready-To-Go PCR beads» (GE Healthcare, United Kingdom). Каждый «шарик» растворяли в 21 мкл дистиллированной воды SuperQ. Реакционная смесь для первой реакции содержала 1 мкл каждого из праймеров MSP-1, MSP-2A, MSP-2B и 1 мкл ДНК матрицы. Реакционная смесь для второй реакции - 1 мкл MSP-3, MSP-4A и MSP-4B и 1 мкл продукта первой реакции. Размер ампликона MSP-3–MSP-4B (*E. bienewisi*) примерно 500 пб, MSP-3–MSP-4A (*Encephalitozoon* spp. и др. виды) - 300 пб. Таким образом, с помощью ПЦР можно было дифференцировать заражение, вызванное *E. bienewisi* от микроспоридиозов, вызываемых другими видами, что важно для клинической практики, т.к. *E. bienewisi* требует специальной терапии (Weiss, 2014). Амплификацию проводили в стандартном термоциклере (Applied Biosystems) по одинаковой схеме для первой и второй реакций: 95 °C, 5 min + 36 cycles (денатурация при 95 °C, 30 сек + отжиг праймеров при 55 °C, 1 мин + элонгация при 72 °C, 2 мин) + финальная элонгация, 10 мин. Положительные контроли включали ДНК, изолированную из RK-13 клеток, зараженных *E. intestinalis* и ДНК микроспоридии *E. bienewisi*, выделенной из образцов желчи зараженной макаки резус (Tulane National Primate Research Center, Covington, LA, USA). Образцы с водой, добавленной вместо ДНК матрицы, служили отрицательным контролем. Ампликоны ожидаемого размера вырезали из 2% агарозного геля. ДНК экстрагировали с помощью набора «Wizard SV Gel and PCR Cleanup system» (Promega, Madison, WI, USA). Секвенирование осуществляли, как описано выше. В качестве праймеров для секвенирования использовали MSP-3, MSP-4A и MSP-4B, секвенируя каждый ампликон в двух направлениях.

**Лазерная микродиссекция и выделение ДНК из индивидуальных спор, вырезанных из мазков зараженных тканей.** Для доказательства генетической идентичности различных морфотипов спор, заражающих колонии огненных муравьев, мы извлекали споры разного типа из мазков зараженных насекомых с помощью лазерной микродиссекции, используя вариацию метода лазерной микродиссекции, метод лазерного катапультирования (LPC, laser pressure catapulting). Ранее этот относительно

новый метод был успешно применен в различных областях клеточной биологии и биомедицины, например, при изучении неопластических трансформаций (Eltoum et al., 2002; Lehmann et al., 2000), патологии гемопоэза (Fend et al., 2000), для диагностики бактериальных и вирусных инфекций (Ryan, et al., 2002), в цитогенетике (Cao et al., 2001; Stark et al., 2003) и других областях (Grant, Jerome, 2002). Он оказался исключительно полезным для анализа селективных клеточных и субклеточных мишеней, особенно при совмещении с другими подходами, такими как иммунофлуоресцентный анализ, ПЦР, секвенирование, созданием кДНК библиотек, протеомный анализ и др. (Obiakor et al., 2002). Автором впервые применен этот метод для извлечения ДНК из индивидуальных клеток эукариотических микроорганизмов. Был использован микроскоп Position Ablative Laser Microbeam (PALM) microscope (Carl Zeiss), оснащенный ультрафиолетовым лазером для микродиссекции, устройством для катапультирования и эпифлуоресценцией. Мазки зараженных тканей наносили на предметные стекла для микродиссекции (Carl Zeiss), фиксировали метанолом и окрашивали Калькофлуором. Используя коротковолновый фильтр (395–415 нм) и эпифлуоресценцию, нужные типы спор идентифицировали, маркировали и «вырезали» с помощью фокусированного лазерного луча. Затем на выделенную область подавали мощный импульс расфокусированного лазерного излучения, который «закидывал» вырезанные со среза споры в расположенную над препаратом крышку специальной 0.5 ml центрифужной пробирки (Carl Zeiss), покрытую адгезивным слоем в соответствии с технологией LMPC “Laser Microdissection and Pressure Catapulting” Zeiss ([www.zeiss.com](http://www.zeiss.com)). В каждую пробирку помещали 8-20 мегаспор, 8-20 одиночных октоспор или 1-5 спорофорных пузырьков, каждые из которых были индивидуально катапультированы в пробирку, содержащую 2.5 мкл стерильной дейонизированной воды. Если ПЦР не проводили немедленно, споры осаждали центрифугированием и хранили при -20 °С. ПЦР проводили в этих же пробирках в два этапа с помощью набора для ПЦР «FailSafe PCR kit» (Epicentre-Illumina, Wi, USA). Реакционная смесь для первой реакции готовилась в 20 мкл: 10 мкл буфера H, 1 мкл каждого из праймеров (10 μM), 0.5 мкл ДНК полимеразы FailSafe, 5 мкл воды, и 2.5 мкл воды со спорами, выделенными с помощью лазерной микродиссекции. Использовали 2 пары праймеров: (1) CGAAGCATGAAAGCGGAGC (1TSSf) – CAGCATGTATATGCACTACTGGAGC (2TSASr), с ампликоном 318 по (Valles et al., 2002), и AAGGACACCACAAGGAGTGG (TS841f) – CCGCAAGAAGTCTCACAACA (TS1059r), с ампликоном 220 по (Milks et al., 2004).



**Рисунок 2.2.** Продукты ПЦР амплификации ДНК из спор, вырезанных с помощью лазерной микросдиссекции, на агарозном геле. **А.** TS841f–TS1059r: (дорожка 1) маркер 100-base DNA mass ladder; (2) 20 мегаспор; (3) 10 мегаспор; (4) 20 одиночных октоспор; (5) 10 одиночных октоспор; (6) 8 октоспор (1 спорофорный пузырек); (7) 8 мегаспор; (8) ДНК из незараженных муравьев; ДНК из зараженных муравьев. **Б.** Сравнение фрагментов рРНК, выделенных из 8 октоспор (2-4) и 8 мегаспор (5-7), и амплифицированных разными праймерами: V1F–530R, микроспорициальный праймер (2, 5); TS841f–TS1059r (3, 6); 1TSSf–2TSASr (4, 7). (8) ДНК из незараженных муравьев (отрицательный контроль); (1, 9) маркер.

**Таблица 2-2.** Праймеры, используемые для диагностики, филогении и секвенирования, не приведенные в тексте

| Праймеры   | Сиквенсы  | Ссылки                            |
|--|---|-----------------------------------|
| Универсальные праймеры: «баркод» микроспорицидий; кодирует SSU; размер продукта 1200 – 1400 п.н.   |   |                                   |
| <b>ss18f (=V1)</b>   | 5'-CACCAGGTTGATTCTGCC-3'                              | Baker et al., 1994                |
| <b>ss1492r</b>   | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'                             |                                   |
| Другие праймеры для SSU-LSU  |   |                                   |
| <b>ss530f</b>  | 5'-GTGCCAGC(C/A)GCCGCGG-3'                            | Vossbrinck et al., 2014           |
| <b>ss530r</b>  | 5'-CCGCGG(T/G)GCTGGCAC-3'                             |                                   |
| <b>ss1047r</b>   | 5'-AACGGCCATGCACCAC-3'                                |                                   |
| <b>ss1061f</b>   | 5'-GGTGGTGCATGGCCG-3'                                 |                                   |
| <b>ss1537</b>  | 5'-TTATGATCCTGCTAATGGTTC-3'                           |                                   |
| <b>ls212r1</b>   | 5'-GTT(G/A)GTTTCTTTTCCTC-3'                           |                                   |
| <b>ls212r2</b>   | 5'-AATCC(G/A/T/C) (G/A) GTT(G/A) GTTCTTTTCCTC-3'      |                                   |
| <b>ls580r</b>  | 5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'                              |                                   |
| Праймеры для RPB1, специфичные для <i>Anncaliia</i> spp.   |   |                                   |
| <b>AncRPB1for1</b>   | 5'-GATTGCACTACCTCTGTTATTCCTG-3'                       | Tokarev et al., 2017              |
| <b>AncRPB1rev1</b>   | 5'-TGAATTGATAATAACGCCTTGAATTTCTCT-3'                  |                                   |
| Праймеры для HSP70, специфичные для <i>Anncaliia</i> spp.  |   |                                   |
| <b>AncHSP70for1</b>  | 5'-CTCTGCTCCAAATATTTTCGATAGAGC-3'                     | Tokarev et al., 2017              |
| <b>AncHSP70rev</b>   | 5'-AAACATCCTGAATGATCAACCTCAC-3'                       |                                   |
| Праймеры для диагностики и генотипирования и дифференцирования микроспорицидий родов <i>Encephalitozoon</i> и <i>Enterocytozoon</i> (для <b>nested PCR</b> ) |   |                                   |
| <b>MSP1 forward Eb-Ec</b>  | 5'-TGAATG [G/T]GT CCC TGT-3'                          | Katzwinkel-Wladarsch et al., 1998 |
| <b>MSP3 forward Eb-Ec</b>  |   |                                   |
| <b>MSP-2B reverse Eb</b>   | 5'-GTT CAT TCG CAC TAC T-3'                           |                                   |
| <b>MSP-4B reverse Eb</b>   | 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT CCA GGG AG -3'            |                                   |
| <b>MSP-2A reverse Ec</b>   | 5'- TCA CTC GCC GCT ACT-3'                            |                                   |
| <b>MSP-4A reverse Ec</b>   | 5'-CCA AGC TTA TGC TTA AGT [C/T][A/C]A A[A/G]G GGT-3' |                                   |

**Таблица 2-3.** Праймеры для ПЦР амплификации и секвенирования генов рибосомального цистрона и большой субъединицы РНК-полимеразы (RPB1) микроспоридий рода *Nosema* для определения структуры клады *N. bombycis* и положения *N. disstriae*

| Праймеры   | Сиквенсы                        | Ссылки                    |
|--|---------------------------------|---------------------------|
| Типичный порядок субъединиц в рибосомальном цистроне: 5'-SSU-ITS-LSU-3'    |                                 |                           |
| <b>SS530F</b>  | 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'          | Vossbrinck et al., 1993   |
| <b>580R</b>  | 5'-CCGCGGKGCTGGCAC-3'           |                           |
| Обратный порядок 5'-SSU-IGS-5S-3'  |                                 |                           |
| <b>FumIGF</b>  | 5'-ATAGTGGTGCATGGCCGTTTCCAA-3'  | Kyei-Poku, Sokolova, 2017 |
| <b>FumIGR</b>  | 5'-GCTCATACTGGTTTAACTTCGGAG-3'  |                           |
| Флануирующий участок на 5' конце Большой субъединицы rRNA (LSU)            |                                 |                           |
| <b>Trail 1</b>   | 5'-ТТААТГАССТАТТГСАГТТ-3'       | Kyei-Poku et al., 2012    |
| <b>ChMdT1</b>  | 5'- CCATAACAACCGCCCTACTGT-3'    | Kyei-Poku, Sokolova, 2017 |
| <b>ChMdT2</b>  | 5'- CCAGCTACCACATAGTTCGATTG-3'  |                           |
| 5' конец Большой субъединицы rRNA (LSU)                                    |                                 |                           |
| <b>LSUF</b>  | 5'-ACTCTCCTCTTTGCCTCAATCA-3'    | Huang et al., 2004        |
| <b>LSU826R</b>   | 5'-ATACTCAACTGTCCTAAGAG-3'      |                           |
| Большая субъединица rRNA (LSU)   |                                 |                           |
| <b>LS228F</b>  | 5'-GGAGGAAAAGAACTAAC-3'         | Huang et al., 2004        |
| <b>ILSUR</b>   | 5'-ACCTGTCTCACGACGGTCTAAAC-3'   |                           |
| Внутренний спэйсер (Internal transcribed spacer ITS), при обратном порядке |                                 |                           |
| <b>ILSUF</b>   | 5'-TGGGTTTAGACCGTCGTGAG-3'      | Huang et al., 2004        |
| <b>S33R</b>  | 5'-ATAGCGTCTACGTCAGGCAG-3'      |                           |
| Малая субъединица rRNA (SSU)   |                                 |                           |
| <b>18F</b>   | 5'-CACCAGGTTGCTTCTGCC-3'        | Baker et al., 1995        |
| <b>1537R</b>   | 5'-ТТАТГАТСТСТГАТТГТТСТ-3'      |                           |
| Intergenic spacer(IGS)/5S rRNA (5S) при обратном порядке субъединиц        |                                 |                           |
| <b>HG4F</b>  | 5'-GCGGCTTAATTTGACTCAAC-3'      | Huang et al., 2004        |
| <b>5SR</b>   | 5'-TACAGCACCCAACGTTCCCAAG-3'    |                           |
| RNA polymerase II second largest subunit (RPB1)                            |                                 |                           |
| <b>MdRp1F1</b>   | 5'-AAGCCCAGATCTTAATGCCATTTGG-3' | Kyei-Poku, Sokolova, 2017 |
| <b>MdRp1R1</b>   | 5'-GGCGTAATCTTCTCTGGAAACG-3'    |                           |
| <b>NbRPB12F</b>  | 5'-CCTTAAGAAATACGAAATGGA-3'     | Ironsides, 2007           |
| <b>NbRPB12R</b>  | 5'-TCAATTAACGAAAGTCTTCC-3'      |                           |
| <b>NbRPB13F</b>  | 5'-AATCGACGACCTTCTTTCAT-3'      | Ironsides, 2007           |
| <b>NbRPB13R</b>  | 5'-ACATGATTTCTCCTCCGCAT-3'      |                           |
| <b>NbRPB14F</b>  | 5'-ATTCTGCAATGAAAGTCGG-3'       | Ironsides, 2007           |
| <b>NbRPB14R</b>  | 5'-GCAAATCAAATGGAATTCTC-3'      |                           |
| <b>NbRPB15F</b>  | 5'-TCCGGGTCTAAAGGATCTTT-3'      | Ironsides, 2007           |
| <b>NbRPB15R</b>  | 5'-GGGTCATCTGAGTAGCAGGTT-3'     |                           |

Реакционную смесь добавляли в крышку центрифужной пробирки, а затем центрифугировали и перемешивали на вортексе. ПЦР проводили в термоциклере с нагреваемой крышкой (MJ Research thermocycler 100, USA). Реакция включала 6 мин начальной денатурации при 98 °С, 25 циклов (60 сек при 98 °С, 30 сек при 55 °С, 90 сек при 72 °С) и заключительную элонгацию 5 мин при 72 °С. Реакционную смесь для второй реакции готовили в 50 мкл: 20 мкл из первой реакции, 23 мкл буфера H, 1 мкл каждого из праймеров (20  $\mu$ M), 1 мкл полимеразы FailSafe и 4 мкл воды. Параметры второй реакции были такими же, как и первой. Рис. 2-1 демонстрирует результаты амплификации ДНК из спор, вырезанных из мазков зараженных насекомых с помощью лазерной микродиссекции.

#### 2.3.4 Оценка экспрессии апоптозных генов с помощью количественного ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции в 96-луночных планшетах (RT-qPCR microarray).

Клетки ТНР-1 инкубировали с живыми или мертвыми (убитыми кипячением) микроспоридиями, или средой во флаках емкостью 25 см<sup>2</sup> в течение трех дней. Апоптоз индуцировали стауроспорином, как описано выше. Через четыре часа после индукции, клетки промывали три раза в PBS, лизировали тризолом (Tryzol, Invitrogen) и очищали на колонках Qiagen. Тотальную РНК (1 мкг) использовали для получения кДНК с помощью инкубации со случайными олиго-гексамерами (Invitrogen) и обратной транскрипции (Superscript III, Invitrogen). Образцы затем обрабатывали РНКазой (RNase H, Invitrogen) *E. coli* для очистки от спиралей РНК-ДНК. ПЦР выполняли в амплификаторе Stratagene mx3000 с использованием коммерческого набора «Apoptosis RT2 Profiler PCR Array» (SABiosciences - Qiagen), предназначенного для амплификации 84 генов, ответственных за реализацию различных путей апоптоза, в 96-луночных планшетах. Эти 84 гена включают 47 генов, кодирующие про-апоптозные белки, 21 – анти-апоптозные, и 15 генов, кодирующих регуляторные белки (могут и инициировать, и подавлять апоптоз). Анти- или про-апоптотозные функции генов определялись с помощью таблицы «Функциональная группировка генов» в наборе Apoptosis RT2 Profiler PCR Array (SABiosciences – Qiagen, [http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PAHS-012A.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-012A.html)) и общедоступных баз данных онтологии генов (<http://www.genecards.org/>; <http://www.geneontology.org/>). Уровни экспрессии генов (E) считались повышенными (upregulated) или пониженными (downregulated) на основании, по меньшей мере, двукратной разницы по сравнению с контрольными необработанными макрофагами (то есть  $-2 \geq \Delta E \geq +2$ ,  $\Delta E$ ). Образцы анализировали в трех повторностях и нормализовали по отношению к экспрессии гена бета-2-

микрोगлобулина, одного из пяти генов «домашнего хозяйства», включенных в набор. Экспрессия этого гена была статистически неразличимой в экспериментальных и контрольных образцах. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Cluster 3 (de Hoon et al., 2004; Eisen et al., 1998). Иерархическая кластеризация для генерации дендограмм выполнялась с помощью программы TreeView (Saldanha, 2004). Для графической демонстрации повышенной и пониженной регуляции генов в канонических сигнальных путях апоптоза использовали программу «Ingenuity Pathway Analysis» (Qiagen), прилагаемую к набору Apoptosis RT2 Profiler PCR Array.

#### **2.4 Методы филогенетического анализа и статистической обработки результатов**

Для определения родственных связей и положения изучаемых видов в системе микроспоридий, полученные в результате амплификации, последовательности редактировали и собирали в контиги с помощью программы ChromasPro, а затем сравнивали с ортологами, имеющимися в GenBank. Новые сиквенсы депонировали в Генбанке (Табл. 2-1). Отбор сиквенсов для филограмм осуществлялся на основании степени родства изучаемого сиквенса с ортологами с помощью NCBI BLAST, а также сообразно задачам конкретного проекта, исходя из анализа литературных данных. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программ BioEdit (Hall, 1999), ClustalW и Muscle (MEGA); концы и гипервариабельные области убирали вручную. Оптимальную филогенетическую модель для анализа данных методами Максимального правдоподобия (ML, maximum likelihood) и Байесовой оценки филогении (Mr.Bayes) определяли с помощью программ Model Test, ассоциированной с программными пакетами RAUP 4.0b, MEGA (версии 5.05 и 6.06) и FindModel (Модель Weighbor) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). Филограммы для ML анализа строились с помощью программного пакета MEGA 5.05/6.06 (Tamura et al., 2011, 2013) и/или PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guindon et al., 2010). Деревья просматривали с помощью MEGA 5.05/6.06 и TreeView. Эволюционные расстояния между видами рассчитывали с использованием двухпараметрического метода Кимуры (Kimura, 1980), алгоритм которого имеется в пакетах RAUP и MEGA. Для построения филогенетических деревьев с применением Баессова принципа (MrBayes), использовали программы: MrBayes (Redelings, Suchard, 2005) <http://sourceforge.net/projects/mrbayes/> и BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/ primateTutorial.html/>). Для кладистического анализа морфологических признаков методом максимального сходства (Maximal Parsimony) использовали пакет RAUP 4.0b. 10 (Swofford, 2002). Статистические

анализы и графики выполнялись с использованием программ Statistica for Windows 7 (<http://statistica.software.informer.com/>); InStat / PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, 2003) и Microsoft Excel. Для сравнения групп использовали односторонний ANOVA с тестом Тьюки для множественных попарных сравнений (Tukey HSD test) и/или непарный t-тест.  $P < 0.05$  считалось статистически значимым. Результаты выражены как средние  $\pm$  стандартные ошибки средней.

*Источники геномных данных.* Основным источником данных по функциональной геномике служил ресурс «MicrosporidiaDB» (<http://microsporidiadb.org>), часть базы данных «Eukaryotic Pathogen Database Resources» (EuPathDB: <http://eupathdb.org>), финансируемой National Institutes of Health (NIH) /National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIH/NIAID) (Aurrecoechea et al., 2013). Последовательности генов микроспоридии *Paranosema (Antonospora) locustae* находятся в свободном доступе на сайте <http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01> (проект: *Antonospora locustae* Genome Project, Marine Biological Laboratory at Woods Hole, спонсируемый NSF, award #0135272). Последовательности генов других видов микроспоридий находятся на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США.

### ГЛАВА 3. ЦИТОЛОГИЯ, ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ И ФИЛОГЕНИЯ МИКРОСПОРИДИЙ, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ГРУППАХ ХОЗЯЕВ

После описания первой микроспоридии *Nosema bombycis* в 1857 г. в течение более 100 лет изучению группы уделялось мало внимания. Внутриклеточное развитие и крайне мелкие размеры этих эукариотических клеток (на пределе разрешения световой микроскопии) затрудняли их изучение. Положение резко изменилось с появлением электронной микроскопии и затем молекулярных методов исследования. Число родов выросло в 10 раз, а число новых видов ещё больше. Однако работ по биологии микроспоридий и сравнительному изучению их взаимоотношений с разными группами хозяев все ещё крайне мало. Представленный в диссертации анализ строения клетки и жизненных циклов микроспоридий, а также особенностей их взаимоотношений с хозяевами – представителями разных систематических групп в определенной степени восполняет этот пробел. В этой главе речь пойдёт о нескольких конкретных паразито-хозяинных системах, изученных автором наиболее детально, а также о роли полученных результатов в понимании морфофункциональной организации клетки микроспоридий, биологии паразито-хозяинных отношений и предпосылок для видообразования. Изучение каждой из описанных ниже систем и сравнительный анализ собственных данных с литературными не только предоставили новую для науки информацию по цитологии, многообразию жизненных циклов и биоразнообразию, позволившие выделить новые клады, виды и роды микроспоридий, но также помогли сформулировать гипотезы о направлениях приспособительной эволюции в отдельных группах типа *Microsporidia* на основании накопленных знаний о морфологии, молекулярной филогении и биологии паразитов и их хозяев.

#### **3.1 Ультраструктура «низших» микроспоридий-мечниковеллид (*Rudimicrosporea*, *Metchnikovellidae*) на примере двух видов рода *Metchnikovella* и особенности строения «низших» микроспоридий**

##### **3.1.1 Ультраструктура стадий жизненного цикла *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914, гиперпаразита грегарин *Polyrhabdina* sp., кишечного эндобионта полихет *Pigospio elegans***

*Metchnikovella incurvata* (Табл. 3-1) описана в 1914 году по светооптическим наблюдениям с Северного побережья Франции (Caullery, Mesnil, 1919; Vivier, 1975). Автором диссертации изучена ультраструктура этого паразита с помощью световой (СМ) (Рис. 3-1) и электронной микроскопии (ЭМ) (Рис. 3-2) на материале, собранном на илестой литорали в Чупинской губе Кандалакшского залива Белого моря. Жизненный цикл *M. incurvata* включает две спорогонии: спорогония 1 (С1) – с образованием одиночных спор и спорогония 2 (С2) – с образованием 12-16 спор, заключённых в

толстостенные цисты, формой напоминающие бумеранг. В С1 споронты превращаются в многоядерные клетки (спорогональные плазмодии), из которых формируются споробласты. Размеры живых округлых спор  $1.8 \pm 0.2 \times 3.7 \pm 0.4$  мкм. ЭМ спор выявила типичную для мечниковеллид ультраструктуру: подкововидное ядро, манубриум (короткую полярную трубку), расположенный перпендикулярно длинной оси споры, и полярную шапочку, заключённую в индивидуальный мембранный контейнер. Споронты, споробласты и споры С1 располагаются в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина. Наиболее ранняя стадия С2 – цепочки двуядерных клеток. Эти клетки формируют экстрацеллюлярные оболочки, и каждая клетка преобразуется в толстостенную цисту. Внутри цисты дикарионы сливаются, ядро претерпевает множественное деление, и в результате деления внутренним почкованием формируется 16 спор. Структура и размер спор, образующихся внутри цист, идентичны одиночным спорам. Размеры цисты –  $24.2 \pm 2.6 \times 4.6 \pm 0.3$  мкм (Рис. 3-1, 3-2 (Sokolova et al., 2013)).

Исследование позволило идентифицировать вид Беломорской мечниковеллиды и уточнить его диагноз данными электронной микроскопии. Наиболее важные и интересные результаты этой работы состоят в том, что с помощью серийных срезов показано строение заднего конца манубриума мечниковеллид, который разделён на сеть ветвящихся цистерн и трубочек, ранее описываемых как пузырьки, окружающие «манубриальную пластинку» (Рис.3-2g). Полярная трубка мечниковеллид слабо развита, и эту сеть можно интерпретировать как предшественник (или гомолог) дистального участка полярной трубки высших микроспоридий, свёрнутого в спираль.

### 3.1.2 Жизненный цикл и ультраструктура *Metchnikovella spiralis*

Из того же вида грегариин (*Polyrhabdina* sp. из *P. elegans*) и места сбора выделен и описан новый вид *Metchnikovella spiralis*. Жизненный цикл типичен для рода – развитие с двумя спорогониями (С1 и С2), формирующими изолированные споры и споры, заключённые в цисты. Бочковидные споры С1 и С2 не различимы по форме и размерам ( $1.3-1.9 \times 2.0-3.2$  мкм, на срезах) между собой. Внутреннее строение спор типично для рода *Metchnikovella* и сходно с вышеописанным видом. В отличие от *M. incurvata*, споробласты и споры *M. spiralis* окружены мембраной паразитофорной вакуоли. Овальные цисты этой микроспоридии, размером  $11,6 \times 4,7$  мкм, причудливо орнаментированы спиральными электронно-плотными структурами и содержат по 8 спор (Рис. 3-3) (Sokolova et al., 2014).

Наиболее интересным в исследовании этого вида было обнаружение дикарионов в пролиферативных стадиях, предшествующих спорогонии. Эти сдвоенные ядра отличались от диплокарионов высших микроспоридий наличием рибосом по всему периметру ядер, включая зону их контакта. В некоторых случаях ядра были соединены

цитоплазматическими мостиками и в их нуклеоплазме выявлялись синаптонемальные комплексы (СК) (Sokolova et al., 2014). Ранее СК обнаружены в С2 у других мечниковеллид: *Amphiamblys bhatiellae* (Ormières et al., 1981), *A. laubieri* (Desportes, Théodoridès, 1979) и *Amphiacantha longa* (Larsson, 2000). Стадии со сдвоенными ядрами описаны для *A. capitellides* (Larsson, Kjøie, 2006) и *Amphiacantha longa* (Larsson, 2000) (Табл. 3-1). Мы предполагаем, что дикарионы мечниковеллид гомологичны диплокарионам (ДК) высших микроспоридий. Цитоплазматические мостики между ядрами ДК, а также СК, вероятно, свидетельствуют о наличии кариогамии и полового процесса в жизненном цикле *M. spiralis*. У «высших» микроспоридий синаптонемальные комплексы наблюдали у видов с мейозом, как явным (например, у вида *Kneallhazia solenopsae*, формирующего мейоспоры) (Sokolova, Fuxa, 2008), так и «скрытым» (например, у вида *Paranosema grylli*, развивающегося без смены ядерных фаз) (Nassonova, Smirnov, 2005).

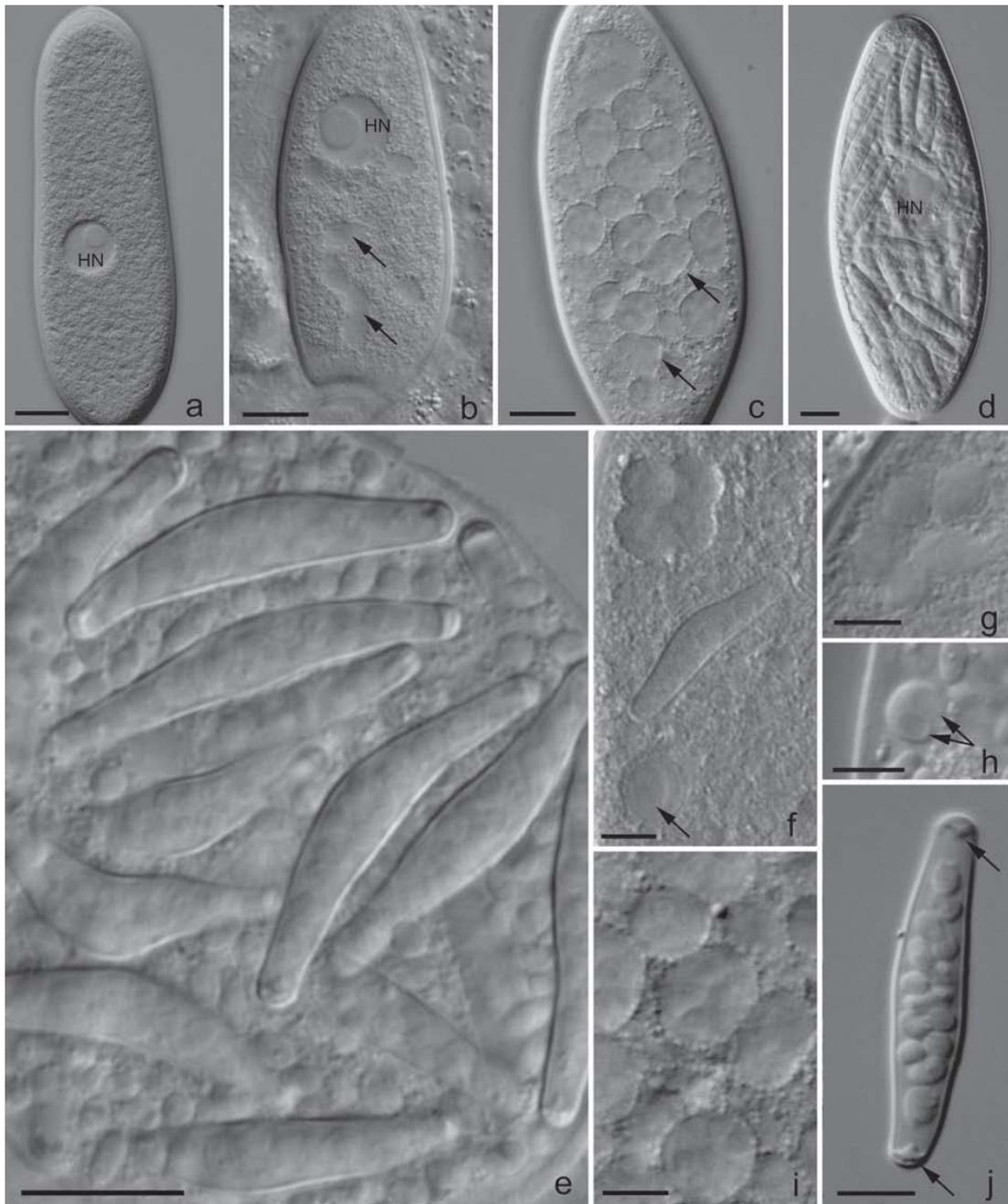
### 3.1.3 Эволюция аппарата экстрезии: сходство ультраструктуры спор мечниковеллид и *Paramicrosporidium*. Морфология мечниковеллид в свете геномных данных: предковые формы или боковая ветвь?

При изучении ультраструктуры *Metchnikovella* spp. на срезах через периферийные участки паразитофорной вакуоли *M. spiralis*, автором впервые выявлены характерные двойные мембранные профили, соответствующие по своей структуре и диаметру утолщённой части манубриума, которые интерпретированы как срезы выброшенных полярных трубок (Sokolova et al., 2014). В цитоплазме грегариин, интенсивно заражённых *M. incurvata*, выявлены структуры, напоминающие спороплазмы и «пустые» (выстрелившие?) споры (Sokolova et al., 2013) (Рис. 3-2h). Полученные ультраструктурные данные, вероятно, указывают на то, что способ выброса зародыша-спороплазмы из споры в окружающую цитоплазму клетки хозяина у мечниковеллид сходен с таковым высших микроспоридий. Спороплазма предположительно проходит через вывернутую полярную трубку, основанием которой служит структура, напоминающая якорный диск микроспоридий. Таким образом, мечниковеллидам, относящимся к базальной ветви микроспоридий, также свойственна инъекция зародыша в клетку хозяина через полярную трубку. Аппарат экстрезии у мечниковеллид развит значительно слабее, чем у «высших» микроспоридий, и, скорее всего, служит для ре-инфицирования той же клетки хозяина и/или для попадания спороплазмы в грегариину из цист, разрушенных в кишечнике полихеты, как это показано на гипотетической схеме жизненного

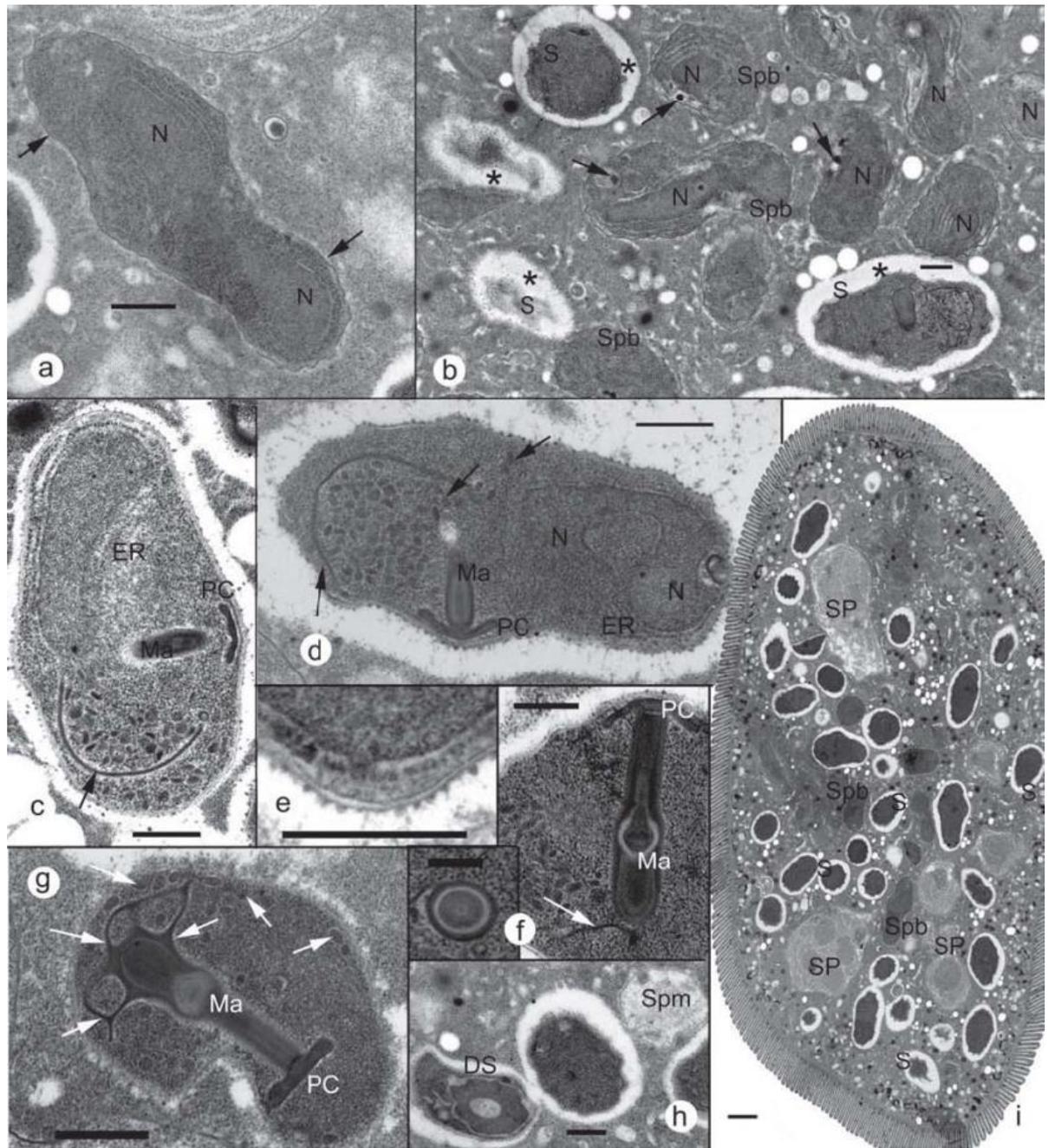
**Таблица 3-1.** Диагностические признаки мечниковеллид, изученных с помощью электронной микроскопии (по: Sokolova et al., 2014)

| Вид                              | Род:<br>Грегарина,<br>Аннелида           | Пре-<br>споро-<br>гональ-<br>ные<br>стадии | Свободная спорогония                  |   |  | Цистообразующая спорогония                    |  |  |  |
|----------------------------------|--|--|---------------------------------------|---|--|---|--|--|--|
|                                  |  |  | Споронты                              | Источник<br>споро-<br>бластов           | Споры*   | Споронты                                      | Споры*   | «Цисты»  | Источники  |
| <i>Amphiacantha longa</i>        | <i>Lecudina</i> ,<br><i>Lumbrinereis</i> | Нет данных                                 | 2N клетки, без ПВ                     | Бинрное деление материнской клетки      | Овальные, $\leq 2.4 \times 4.5 \mu\text{m}$ (f), без ПВ                | Веретеновидные, 2N; ранние споронты без цисты | Овальные $\leq 6.4 \mu\text{m}$ в диаметре (f)                             | Вытянутые, с выростами 70-80 x 4-5 $\mu\text{m}$ , в цисте >100 спор             | Caullery, Mesnil, 1914; Larsson, 2000                    |
| <i>Amphiamblys capitellides</i>  | <i>Ancora</i> ,<br><i>Capitella</i>      | Нет данных                                 | 1, 2, 4N клетки, ПВ                   | Множественное деление multi-N плазмодия | Овальные, 1.78-2.8x1.18-2.68 $\mu\text{m}$ (s), в ПВ                   | Вытянутые, 1N, СК, ранние споронты без цисты  | Цилиндрические, в цисте взаимно-перекрещиваются, 4.2x1.1 $\mu\text{m}$ (s) | Цилиндрические, с тупыми концами, 40-65x2.5-3.4 $\mu\text{m}$ , в цисте 32 споры | Caullery, Mesnil, 1914; Larsson, Koie, 2006              |
| <i>Amphiamblys lauberi</i>       | <i>Lecudina</i> ,<br><i>Echiura</i>      | Нет данных                                 | Нет данных                            | Нет данных                              | Нет данных   | Нет данных                                    | Цилиндрические 10x0.9 $\mu\text{m}$ (s)                                    | Elongated, 125x2.5 $\mu\text{m}$ , с.30 спор                                     | Desportes, Théodoridès, 1979                             |
| <i>Amphiamblys bhatiellae</i>    | <i>Bhatiella</i> ,<br><i>Marphysa</i>    | Нет данных                                 | Нет данных                            | Нет данных                              | Нет данных   | 1N, SCs, ранние споронты без цисты            | Овальные, 1.9x1.5 $\mu\text{m}$ (s)  | Elongated, 2plug., 70-90x4-5 $\mu\text{m}$ с.30 спор                             | Ormière et al., 1981                                     |
| <i>Metchnikovella incurvata</i>  | <i>Polyrhabdina</i> ,<br><i>Pigospio</i> | Цепочки 1N- и 2N-клеток                    | 1N-клетки, multi-N плазмодии, без ПВ  | Множественное деление multi-N плазмодия | Овальные, 3.7x1.8 $\mu\text{m}$ (l), 3.4x1.5 $\mu\text{m}$ (s), Без ПВ | Овальные, в цисте                             | Овальные, 3.6x1.8 $\mu\text{m}$ (l), 2.7x1.2 $\mu\text{m}$ (s)             | Веретеновидн. 22-26x4.3-4.9 $\mu\text{m}$ ; 2 plug., до 16 спор                  | Caullery, Mesnil, 1914; Sokolova et al., 2013            |
| <i>Metchnikovella hovassei</i>   | <i>Lecudina</i> ,<br><i>Perinereis</i>   | 1N клетки, multi-N плазмодии               | 1N- клетки, multi-N плазмодии, ПВ     | Множественное деление multi-N плазмодия | Овальные, 1.75x1.25 $\mu\text{m}$ (s), в ПВ                            | Округлые, в цисте                             | Округло-овальные   | Oval, 10x4 $\mu\text{m}$ , 1 plug., 8 спор                                       | Vivier, Schrével, 1973                                   |
| <i>Metchnikovella wohlfarthi</i> | <i>Lecudina</i> ,<br><i>Nereis</i>       | Нет данных                                 | Multi-N плазмодии, без ПВ             | Множественное деление multi-N плазмодия | Овальные, 3x1.9 $\mu\text{m}$ (s), В ПВ                                | Нет данных                                    | Овальные   | Овальные, 10x5 $\mu\text{m}$ , 1 plug., 8-12 спор                                | Hildebrand, Vivier, 1971; Hildebrand, 1974; Vivier, 1975 |
| <i>Metchnikovella spiralis</i>   | <i>Polyrhabdina</i> ,<br><i>Pigospio</i> | 2N клетки, СК, 1N,4N клетки                | 1N и 2N-клетки, multi-N плазмодии, ПВ | Множественное деление multi-N плазмодия | Овальные, 2.2x1.5 $\mu\text{m}$ (s), В ПВ                              | Овальные, в цисте                             | Бочковидные, 4x 2 $\mu\text{m}$ (l) 3x1.8 (s)                              | Овальные, 15x4.5 $\mu\text{m}$ , спиральные выросты на стенке, 8 спор            | Sokolova et al., 2014                                    |

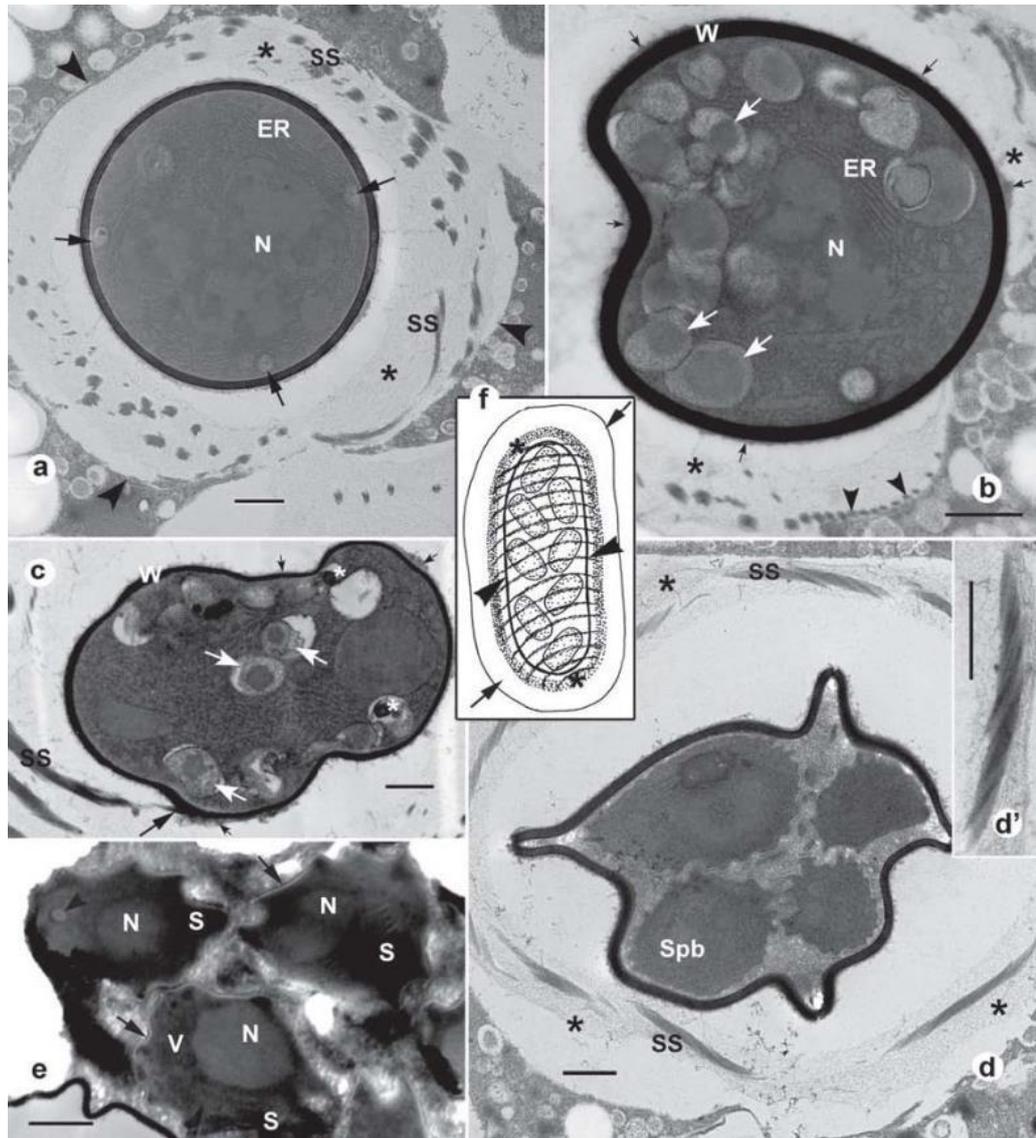
\*Споры обеих спорогоний у всех видов мечниковеллид одноядерные, за исключением *Amphiacantha longa* с 2-ядерными спорами. Сокращения: ПВ – паразитофорная вакуоль; СК – синаптонемальные комплексы; f – фиксированные; l – живые; N – ядро, (1N, 2N – 1-, 2-ядерный, multiN – многоядерный); plug. – утолщённое образование на конце цисты (plugging structure); s – срезы.



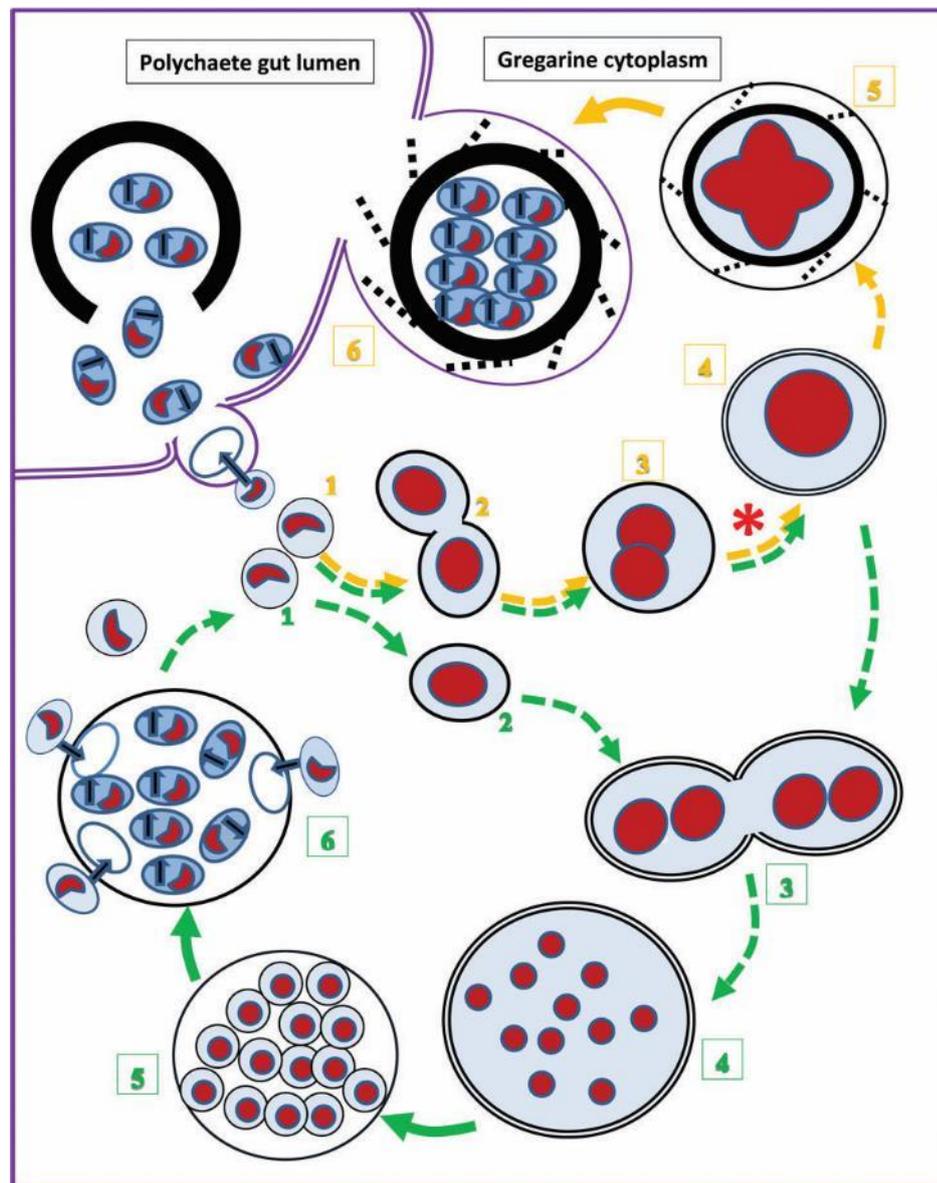
**Рисунок 3-1.** *Polyrrhabdina* sp. из кишечника *Pygospio elegans*, зараженного *Metchnikovella incurvata* (Световая микроскопия, дифференциальный контраст). (а) Незаражённая грегарина; (б) Грегарина с цепочкой стадий С2 (стрелки); (с) Грегарина со спорогональными плазмодиями С1 (стрелки); (d) Многочисленные цисты в форме бумеранга внутри клетки хозяина. (е) Цисты в цитоплазме грегарины при большем увеличении. Каждая циста содержит до 16 спор. (f) Циста, материнский спорогональный плазмодий (стрелка) и группа из 4-х клеток, результат деления материнского плазмодия. (g) Группа одноядерных клеток – споронтов С1. (h) Двухядерная стадия (стрелки указывают на ядро). (i) Многоядерные спорогональные плазмодии С1. (j) Цисты, изолированные из грегарины. Характерные «затычки» (plugging structures) на обоих полюсах указаны стрелками. Масштабная линейка, а–е, 10 мкм; f–j, 5 мкм. HN, ядро грегарины (Sokolova et al., 2013).



**Рисунок 3-2.** *Metchnikovella incurvata*. ЭМ стадий свободной спорогонии (C1). (a) Споробласт (Spb) с характерной ундулирующей оболочкой (стрелка). (b) Споробласт, содержащий предшественник якорного диска (стрелки). Споры (S) окружены электронно-прозрачной зоной (звёздочки). (c, d) Споры с типичным подковообразным ядром и сетью манубриальных цистерн (стрелки). (e) Увеличенный участок d, демонстрирующий трёхслойную стенку споры, орнаментированную 20 нм-глобулами. (f) Продольный срез через полярную шапочку (PC) и манубриум (Ma), манубриальная цистерна указана стрелкой. На вставке – поперечный срез через Ma. (g) Ma в дистальной части распадается на разветвляющиеся цистерны (стрелки). (h) Срез через пустую (выстрелившую) спору (DS) и спороплазму (Spm). Зараженная гregarина. ER, эндоплазматический ретикулум; N, ядро паразита; SP, спорогональный плазмодий. Масштабная линейка, a–e, g, h, i, 500 нм; f, 250 нм; i, 2 мкм.



**Рисунок. 3-3.** *Metchnikovella spiralis*. ЭМ спорогонии с формированием цист (C2). (а) Циста, содержащая материнский споронт с лопастевидным ядром (N), окружённым ЭР (ER). Периферические вакуоли обозначены стрелками. Наконечники указывают на мембраны паразитофорной вакуоли (ПВ). Просвет вакуоли заполнен филаментозным материалом (звёздочки) и филаментами (SS), соответствующими спиральным структурам, видимым в СМ. (b, c) Материнский споронт в процессе внутреннего почкования («вакуолизации»). Вакуоли содержат клубки мембранного материала (белые звёздочки) и округлые тела с ядрами (N). Циста окружена электронно-плотной стенкой (W), покрытой неравномерным слоем менее электронно-плотного вещества (мелкие черные стрелки). Этот слой дает начало тяжам филаментозного материала (черные стрелки) и спиральным структурам (SS), некоторые из которых подстилают мембрану ПВ (наконечники). (d) Споробласт (Spb) внутри цисты. Филаментозный материал (звёздочки) концентрируется вокруг спиральных тяжей (SS), состоящих из пучков спирально ориентированных филаментов (b'). (e) Циста со зрелыми спорами (S). Стрелки указывают на 3-х слойную оболочку спор, наконечники – на поперечно срезанный манубриум. N, ядро, V, везикулы. Масштабная линейка, 500 нм. (f) Схематический рисунок цисты (наконечники) внутри мембраны ПВ (стрелки). Внешняя оболочка образована спиральными структурами (звёздочки).



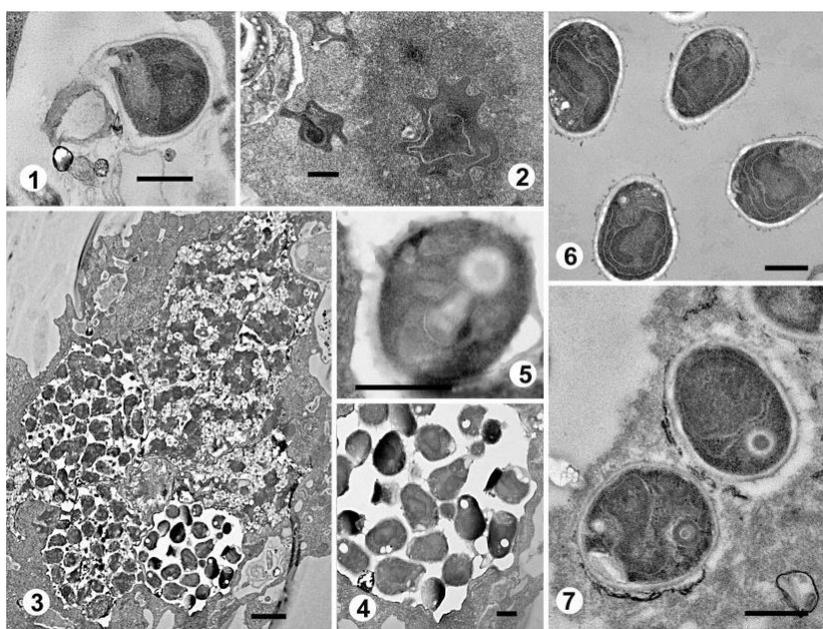
**Рисунок 3-4.** Гипотетическая схема жизненного цикла *Metchnikovella spiralis*. Стадии, сопровождаемые цифрами в рамке, задокументированы. Сплошными стрелками помечены переходы от одной стадии к другой, которые мы наблюдали. Стадии спорогонии C1 подписаны зелёными буквами, C2 – жёлтыми. Предполагается, что полихета может захватывать цисты мечниковеллид с пищей. В кишечнике циста растворяется, споры оказываются в кишечнике, заселённом грегаринами. Не известно, как паразит попадает в грегарины. Возможно, споры прикрепляются к пелликуле, манубриум выворачивается, а спороплазма индуцирует перестройку пелликулы и фагоцитоз (не характерен для грегаринов). Возможно, спороплазмы проходят в клетку грегарины через специализированные участки, микропоры. В грегарины спороплазма трансформируется в меронт (1, C1), растёт (2, C1), генерирует дополнительную оболочку и преобразуется в многоядерный спорогональный плазмодий (3, 4, C1), который распадается на споробласты (5, C1). Зрелые споры локализованы в паразитофорной вакуоли (6, C1). Споры C1 выпускают спороплазмы через вывернутые манубриумы. Вероятно, повторяется несколько циклов C1, после чего паразит переходит к C2, т.е. формированию толстостенных цист со спорами. Предполагается, что у *Metchnikovella* spp. (как у *Amphiamblys* и *Amphiacantha*), гаметогамия (2, C2), дикариотическая стадия (3, C2), кариогамия (4, C2) и мейоз (звёздочка) происходят либо в самом начале C2, либо предшествует разделению цикла на две спорогонии. Спорогональные плазмодии C2 делятся внутренним почкованием внутри толстостенных цист (5, C2). Цисты, содержащие зрелые споры выходят из грегарины через разрыв пелликулы, или с помощью экзоцитоза, когда мембрана паразитофорной вакуоли сливается с пелликулой грегарины (Sokolova et al., 2014).

цикла *M. spiralis* (Рис. 3-4). Для распространения мечниковеллид среди популяций хозяина, т.е. от одной полихеты к другой, необходимо формирование толстостенных цист, защищающих спороплазмы от неблагоприятных условий внешней среды.

У «высших» микроспоридий в процессе эволюции стадия цисты, функционально соответствующая спорангию зигомицетов и других Holomycota и зооспорангию форонид, афелид и розеллид, элиминирована (если она вообще была у них), а спора становится одновременно и стадией переживания, и стадией расселения. Эволюция аппарата экстрезии у высших микроспоридий привела к (а) утолщению стенки споры, (б) развитию задней вакуоли для создания высокого внутри спорового давления и увеличения силы выброса полярной трубки (ПТ), (в) усовершенствованию якорного диска путём жёсткого соединения с ПТ для удержания основания ПТ внутри споры, (г) удлинению полярной трубки для увеличения «радиуса атаки», и (д) появлению поляропласта для создания пула мембран, формирующих плазмалемму спороплазмы. Все эти структуры отсутствуют или слабо выражены у мечниковеллид. По своей морфологии спора *Metchnikovella* spp. более всего похожа на спору *Paramicrosporidium* spp. – строением оболочки, орнаментацией экзоспоры, структурами, подобными манубриуму и якорному диску, а также вытянутой или подковообразной формой ядра. По-видимому, *Paramicrosporidium* spp. (Rozellamycota), паразитирующие в ядрах амёб, как и мечниковеллиды, используют полярную трубку для выхода спороплазмы из споры. В отличие от мечниковеллид, *Paramicrosporidium* не формирует толстой оболочки вокруг спорогональных плазмодиев. Ядро амёбы, в котором могут развиваться несколько плазмодиев, постепенно замещая собой нуклеоплазму, служит оболочкой «спорангия» (Рис. 3-5). Эта черта роднит *Paramicrosporidium* с афелидами и розеллидами, которые используют клеточную стенку хозяина в качестве оболочки зооспорангия. Что касается структур – вероятных эволюционных предшественников и гомологов полярной трубки микроспоридий, то ими могут быть трубки проникновения, формирующиеся у инцистирующихся зооспор афелид и розеллид и служащие для проникновения в хозяина. Например, у *Pseudoaphelidium* spp. цисты обладают более толстой оболочкой по сравнению с представителями других родов Aphelidea. В этих цистах образуется специальная трубка, способная выворачиваться подобно полярной трубке микроспоридий. Еще более любопытно, что в безжгутиковых зооспорах *Rozella* имеются специальные цистерны эндоплазматического ретикулума, ассоциированные с ядерной оболочкой (Held, 1975) и ультраструктурно напоминающие выворачивающуюся трубку *Pseudoaphelidium* (Karpov et al., 2014). Таким образом, органеллы, которые можно считать пре-адаптациями к формированию полярной трубки микроспоридий,

присутствуют во всех трёх группах ARM клады. У афелид и розеллид, паразитирующих у водорослей и оомицетов, они реализовались в хитинизированную трубку проникновения, у парамикроспориций, нуклеофаг и мечниковеллидид, паразитирующих в амёбах и альвеолятах – в короткие нехитинизированные трубки-манубриумы, а у микроспориций – паразитов Metazoa – в длинные полярные трубки, дополненные другими элементами аппарата экстрюзии. Характерно, что у *Mitosporidium daphniae*, паразита дафнии, базальной микроспориции с анцестральными биохимическими признаками (наличием митохондриального генома и цикла Кребса) – вида, генетически более удалённого от «высших» микроспориций, чем мечниковеллиды, имеется аппарат экстрюзии микроспорицийного типа. Такое мозаичное распределение признака, вероятно, говорит о наличии большого разнообразия таксонов, из которого сейчас нам известна лишь крошечная часть, недостаточная для выявления родственных связей между известными в настоящее время видами. Полученные недавно данные филогенетического и филогеномного анализов (Bass et al., 2018) свидетельствуют о том, что мечниковеллиды, скорее всего, не реликтовые микроспориции, законсервированные в своей стабильной экологической нише, как предполагали ранее (Sokolova et al., 2014), а продукт долгой приспособительной эволюции к специализированной нише гиперпаразитов грегариин. Соображение о мечниковеллидах как об отклонившейся от магистрального направления эволюции группе базальных микроспориций подтверждается длиной их ветви на филогенетических деревьях, сравнимой с ветвью «высших микроспориций» (Mikhailov et al., 2017; Galindo et al., 2018). Интересно, что аннотация генома *Amphiamblis* sp. выявила 2 фермента цикла Кребса, отсутствующих у «высших микроспориций», хотя ни функциональных митохондрий, ни окислительного фосфорилирования у мечниковеллид определено нет, как и у других изученных микроспориций. Выявление «рудиментарных» генов пути трикарбоновых кислот в базальной группе подтверждает гипотезу о постепенной утрате окислительного фосфорилирования и цикла трикарбоновых кислот в филогенетической ветви, ведущей к микроспорициям. Кроме того, в геноме *Amphiamblis* выявлены гены, кодирующие некоторые белки, связанные с эндоцитозом, и, таким образом, мечниковеллиды, возможно, представляют собой также и промежуточный этап в элиминации эндоцитозной части секреторного пути, связанной с утратой фаготрофии. Также геномный анализ выявил ряд специализированных генов мечниковеллид, не найденных в геномах микроспориций, и, наоборот, генов, отсутствующих у мечниковеллид, но присутствующих у остальных микроспориций. Например, в геноме *Amphiamblis* sp. не обнаружен ген АТФ/АДФ транслоказы, выявленный в геномах всех изученных

микроспоридий, зато имеется ген митохондриального переносчика неорганического фосфата, гомологичный ортологу из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, и не имеющий аналога у представителей ARM клады. Любопытно присутствие в геноме *Amphiamblys* sp. большого специализированного семейства генов, кодирующих группу CMGC киназ. Этот кластер генов не имеет гомологов в геномах *E. cuniculi* и *S. cerevisiae* (Mikhailov et al., 2017, Figs S10, S15). Учитывая, что киназы этого семейства участвуют в разнообразных метаболических путях эукариот, связанных с пролиферацией, сигнальной трансдукцией, субстратным фосфорилированием, ответной реакцией на стресс, сменой фаз жизненного цикла и пр. (Biondi, Nebreda, 2003), можно предположить, что *Metchnikovellidae* – это весьма специализированная группа, прошедшая длинный и независимый путь биохимической эволюции. Очень возможно, что мечниковеллиды ведут начало от общего предка с микроспоридио-подобными *Rozellamycota*, типа *Nucleophaga* и *Paramicrosporidium*. Метагеномный анализ биома тропического леса выявил множество сиквенсов рРНК, принадлежащих видам, предположительно родственным микроспоридиям, но имеющим более короткие «эволюционные ветви» (“short branch microsporidia”). Среди этих видов, которые еще только предстоит найти и описать, по мнению авторов, будут выявлены переходные формы между *Paramicrosporidium* и продвинутыми (“long branch”) микроспоридиями (Bass et al., 2018). *Nucleophaga* (*Rozellamycota*), *Mitosporidium* и *Metchnikovellidae* (*Microsporidia*) – примеры таких «промежуточных» таксонов. Несомненно, что в ближайшем будущем нас ожидает много любопытных открытий, которые, приведут к уточнению понятия «низшие микроспоридии», а также, возможно, расширят рамки всего типа *Microsporidia*.



**Рисунок 3-5.**

*Paramicrosporidium* sp. (KSL3) в ядре *Saccamoeba polustris*. 1. Спора с вывернутой трубкой; 2. амeboидный плазмодий; 3-4. споробласты и споры внутри спорофорных пузырьков, образованных оболочками материнских плазмодиев в ядре амобы; 5-7. Споры. (фиксированные амобы были предоставлены Проф. Рольфом Мичелом). Масштаб: 1-2, 4-7, 500 нм; 3, 2 мкм.

### 3.2 Микроспоридии морских и пресноводных ракообразных

Ракообразные (подтип Crustacea) – вторая группа членистоногих-хозяев после насекомых по численности выделенных из них видов микроспоридий. Почти четверть из описанных к настоящему времени родов Микроспоридий (50 из 200) паразитируют в ракообразных, принадлежащих ко всем пяти классам подтипа (Malacostraca, Maxillopoda, Ostracoda, Branchiopoda, Cephalocarida), обитающих в различных экологических нишах солёных, солоноватых и пресноводных водоемов и представленных разнообразными жизненными формами – от паразитов рыб до свободноживущих обитателей глубоководных впадин. Микроспоридии ракообразных ещё мало изучены. Ожидаемое разнообразие микроспоридий связано с фантастическим разнообразием ракообразных и может многократно превысить количество уже описанных таксонов (Stentiford, Dunn, 2014). В этом разделе представлены результаты изучения микроспоридии ракообразных, принадлежащих 3-м классам: (1) Maxillopoda, в частности, *Cyclops* spp. (п/кл Copepoda), (2) Branchiopoda, *Daphnia magna* (отр. Cladocera) и (3) Malacostraca, *Litopenaeus setiferus* и *Palaemonetes paludosus*, представители отряда Decapoda семейств Penaeidae и Caridea.

#### 3.2.1 *Agmasoma penaei* и *Perezia nelsoni* – два паразита креветок семейства Penaeidae, древней группы морских Decapoda (класс Malacostraca)

В 2012-2016 годах в диагностическую лабораторию водных животных Ветеринарного факультета Государственного университета штата Луизиана в Батон Руж, с которой я сотрудничала, от креветочников-промысловиков в большом количестве стали поступать креветки *Litopenaeus setiferus* с шельфа Луизианской части Мексиканского залива (основной промысловый вид креветок в Мексиканском заливе) с опухолеподобными поражениями экзоскелета и внутренних органов. Микроскопирование выявило споры микроспоридий. Преимущественно в женских гонадах были выявлены округлые спорофорные пузырьки, содержащие по 8 спор ( $3,6 \pm 2,1$  мкм) с анизофилярной (2-3 + 4-6) полярной трубкой (Рис. 3-6). Эти признаки позволили идентифицировать вид как *Agmasoma penaei* (Sprague) (Hazard, Oldacre, 1976) – микроспоридию, вызывающую разрушительные эпизоотии в популяциях диких и культивируемых креветок семейства Penaeidae по всему миру (Табл. 3-2). Впервые вид был детально охарактеризован с помощью световой и электронной микроскопии, и молекулярно-генетического анализа. Филогенетические реконструкции с использованием последовательностей МСрРНК и альфа- и бета-тубулинов помещают этот род в кладу IV «Terresporidia» (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005), где также размещаются микроспоридии – паразиты родов *Daphnia*, *Cyclops* и *Artemia* (Рис. ПЗ-1).

Изучение данной паразито-хозяинной системы выявило интересные факты, изложенные ниже. Первый касается специфики видообразования у микроспоридий – паразитов морских беспозвоночных с обширными, практически всесветными ареалами. Все три изолята *A. penaei* из 3-х точек мирового океана: Таиландский (Тихий Океан, прибрежные воды Юго-Восточной Азии) (Laisutisan et al., 2009; Pasharawipas et al., 1994), Сенегальский (Атлантический Океан, побережье Западной Африки) (Clotilde-Ba, Toguebaue, 1994) и Луизианский (Атлантика, Мексиканский Залив) (Hazard, Oldacre, 1976; Sokolova et al., 2015), скорее всего, представляют собой разные, хотя и недавно разошедшиеся виды. Все они характеризуются сходной морфологией спор с анизофилярной полярной трубкой и спорогонией с формированием октоспор (Рис. 3-6). При этом параметр «эволюционного расхождения между видами» (pairwise evolutionary distances), рассчитываемый по степени различий в сиквенсах МСрРНК (K-2P distance analysis, Kimura, 1980), между Луизианским и Таиландским изолятами составляет 0.066 (93.4% сходства), что несколько выше обычно регистрируемых внутривидовых различий (0.01-0.05). Кроме того, все три изолята этой микроспоридии паразитируют в разных видах креветок рода *Penaeus sensu lato*, в настоящее время разбитого на несколько родов. Таиландский изолят заражает *Littopenaeus vannamei* и *Penaeus monodon*, Сенегальский – *Farfantepenaeus notialis*. Сенегальский изолят также несколько отличается от Луизианского и Таиландского пропорциями (соотношением длины и ширины) спор и тканевой специфичностью, в частности, образованием ксеном во внутренних органах креветки. Помимо 3-х перечисленных и неплохо изученных изолятов *A. penaeae*, зарегистрированы находки этого вида в других видах Penaeidae в других географических точках (Табл. 3-2). До получения дополнительной информации об ультраструктуре и сиквенсе рРНК у многочисленных географических изолятов *A. penaeae*, можно предположить, что *A. penaei* представляет собой клин близкородственных форм, слабо различающихся морфологически и генетически, постепенно диверсифицирующих среди креветок семейства Penaeidae, обитающих в различных географических зонах Мирового океана.

Исследование также показало, что *A. penaei* сочетает в себе серию плезиоморфных признаков, в частности, деление споронта путем внутреннего почкования, анизофилярную полярную трубку (Sokolova et al., 2015) (Рис 3-6, 3-7) и, предположительно, двуххозяинный жизненный цикл (Pasharawipas, Flegel, 1994). Это неплохо согласуется с тем фактом, что хозяева *A. penaei* – креветки семейства Penaeidae, представляют собой обособленную, базальную и древнюю группу Decapoda. В отличие от большинства высших микроспоридий, у которых материнский споронт делится

бинарным делением или розетковидным почкованием, деление споронта *A. penaeae* напоминает внутреннее почкование, характерное для представителей семейств *Metchnikovellidae* и *Chytridiopsidae*. Было продемонстрировано, что внутреннее почкование у микроспоридий не обязательно связано с формированием цист и, возможно, более распространено, чем предполагалось ранее. Кариогамия ядер диплокариона, присутствие синаптонемальных комплексов, указывающих на наличие мейоза, наличие трех пост-мейотических делений ядра и плазматомия, заканчивающаяся формированием октета одноядерных спор – все это тоже анцестральные черты жизненного цикла, унаследованные от общего с грибами предка, обладающего половым процессом (James et al., 2013; Lee et al., 2008), и элиминированные в продвинутых родах микроспоридий, таких как *Nosema*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon* и др. Анизотрихная полярная трубка с широкой проксимальной и тонкой дистальной частями, соответствующими манубриуму и манубриальным цистернам мечниковеллид (Sokolova et al., 2013), также может рассматриваться как анцестральный признак.

Группировка *A. penaei* с микроспоридиями наземного происхождения, паразитирующими в неродственных Penaeidae солоноватоводных и пресноводных ракообразных (Рис. 3-7), весьма любопытна с точки зрения экологии. Следует отметить, что *L. setiferus* играет исключительную роль в прибрежных водах Мексиканского залива, находясь на пересечении основных пищевых путей этой сложной экосистемы. Жизненный цикл креветки содержит личиночные планктонные стадии, обитающие в эстуариях рек с низкой солёностью (0.2-10 ‰) и питающиеся водорослями, личинками насекомых и мелкими ракообразными, а также ювенильные и взрослые формы – обитатели бентоса, мигрирующие в глубоководные удалённые от берега зоны с высокой солёностью (>35‰). Эти формы питаются, главным образом, фекалиями беспозвоночных и рыб, одновременно представляя собой основную пищевую базу для последних (Muncy, 1984; Perez, Farfante, 1969). Жизненные циклы, включающие в себя обитание в различных экологических нишах, характерны для всех ныне живущих представителей сем. Penaeidae и, вероятно, были характерны и для предковых форм. Такой образ жизни мог стать предпосылкой для многочисленных эпизодов смены хозяев в процессе эволюции группы – от креветок к личинкам водных насекомых, к пресноводным и солоноватоводным копеподам, артемиям, дафниям и рыбам (и наоборот). Мы предполагаем, что хозяева, подобные креветкам и крабам, с образом жизни, включающим разнообразные экологические ниши и пищевые предпочтения, могли играть ключевую роль в диверсификации микроспоридий и их распространении среди наземных, пресноводных и морских хозяев. Пути передачи и распространения *A.*

*penaei* в морских экосистемах остаются полностью неизвестными. Учитывая заражение женских гонад, можно предположить, что при незначительной инфекции паразит передаётся трансвариально. В то же время, инфекция гонад, наблюдаемая в ходе нашего исследования, а также другими авторами (Kelly, 1979; Overstreet, 1973), чрезвычайно интенсивна и, скорее всего, должна приводить к кастрации. Многочисленные попытки перорального заражения креветок всегда были неудачными, и была выдвинута гипотеза о наличии промежуточного хозяина, рыб отряда Perciformes. Эта гипотеза поддержана рядом косвенных доказательств, включая применения *A. penaei*-специфичных ДНК-зондов (Pasharawipas, Flegel, 1994). В то же время, прямых доказательств заражения рыб микроспоридией *A. penaei* получено не было.

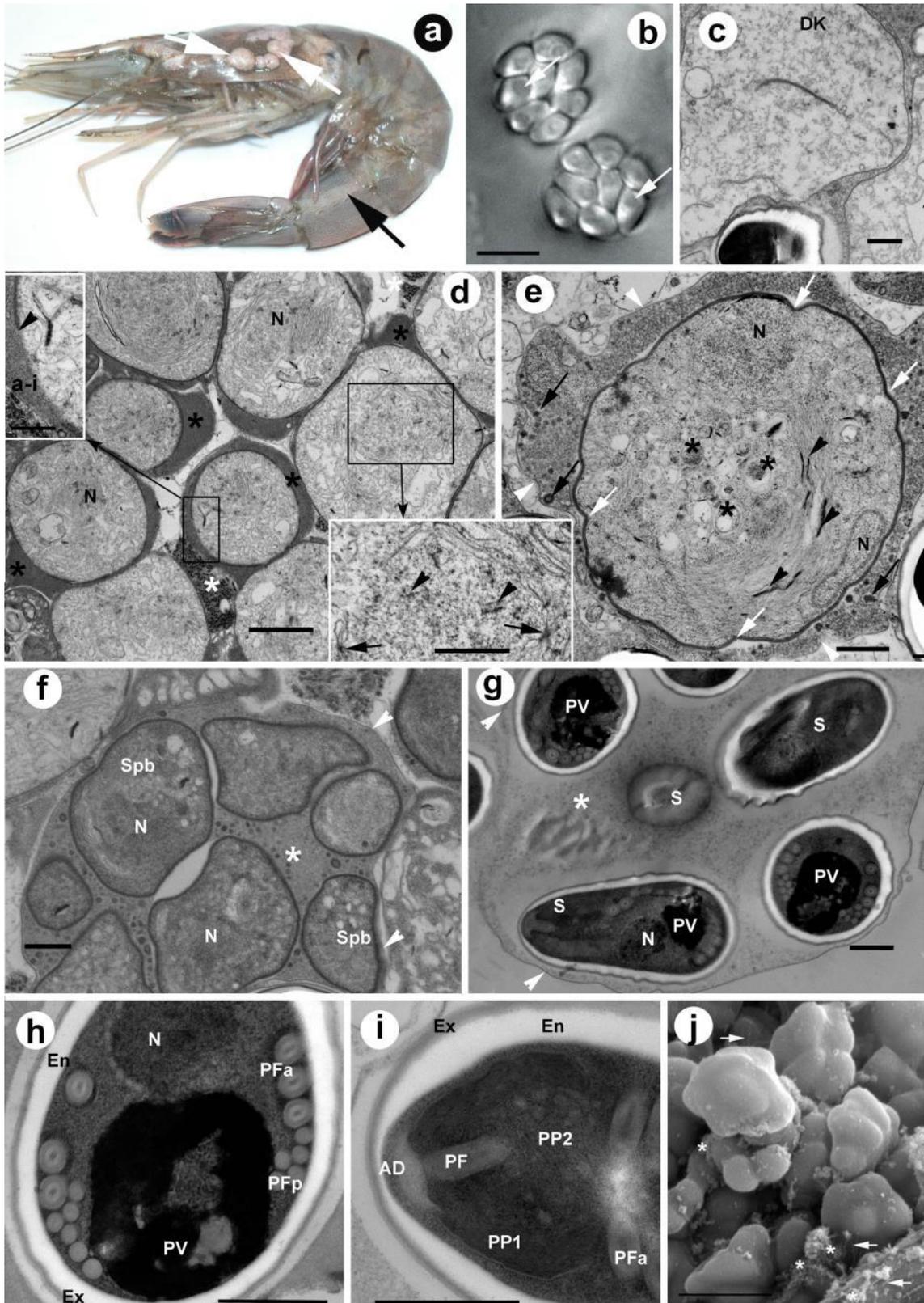
Примерно в 20% случаев помимо заражения гонад и субкутикулярных опухолей, характерных для патологии *A. penaei*, у креветок поражены и скелетные мышцы. При светомикроскопическом исследовании поражений выявлены одиночные споры, значительного меньшего размера (2,0 x 1,1 мкм), чем споры *A. penaei*. ЭМ и секвенирование МСрДНК показали, что *L. setiferus* были одновременно заражены другим видом микроспоридий, структурно и генетически идентичным *Perezia nelsoni* Sprague 1950, известным также из Мексиканского залива из штата Миссисипи. Сиквенс этого вида (AJ252959) ранее был депонирован в Генбанке под именем «Pleistophora sp. LS (Canning et al., 2002; Cheney et al., 2000), и наш сиквенс (KX85642) оказался практически идентичным. Вероятно, двойное заражение креветок неродственными микроспоридиями с различным тканевым тропизмом достаточно широко распространено, а инфекция мышц, которую предыдущие авторы приписывали *A. penaei*, обусловлена заражением *P. nelsoni* (Sokolova, Hawke, 2016) (Рис. 3-7).

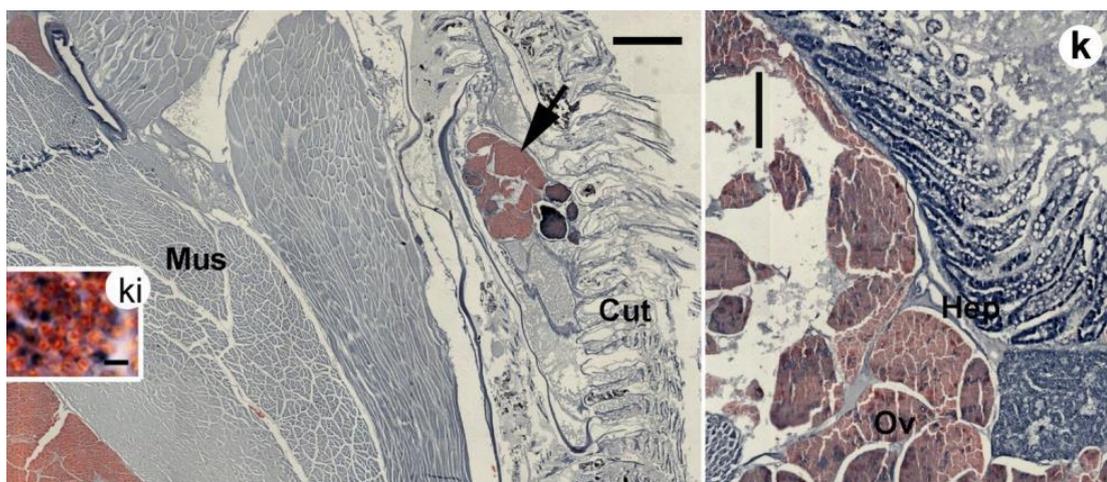
### 3.2.2 *Apotasporea heleios* из пресноводной креветки *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae)

До данного исследования было описано несколько видов микроспоридий, паразитирующих в креветках семейства Caridea, распространенных преимущественно в пресноводных и солоноватых эвтрофных водоемах Нового и Старого Света (Ding et al., 2016; Ovcharenko, 1984; Overstreet, Weidner, 1974; Stentiford et al., 2017; Wang et al., 2013). Однако *Palaemonetes paludosus*, некрупная креветка с прозрачными покровами, ключевой компонент биоценоза эстуариев рек в Мексиканском заливе, в качестве хозяина микроспоридий ранее не была отмечена. Зараженные молочно-белые особи найдены в травянистом болоте в дельте реки Мобил в Алабаме (США). Световая микроскопия мазков и срезов тканей брюшной полости показала заражение спорами микроспоридий, заключёнными в прочные спорофорные пузырьки (СП), 5-6 мкм

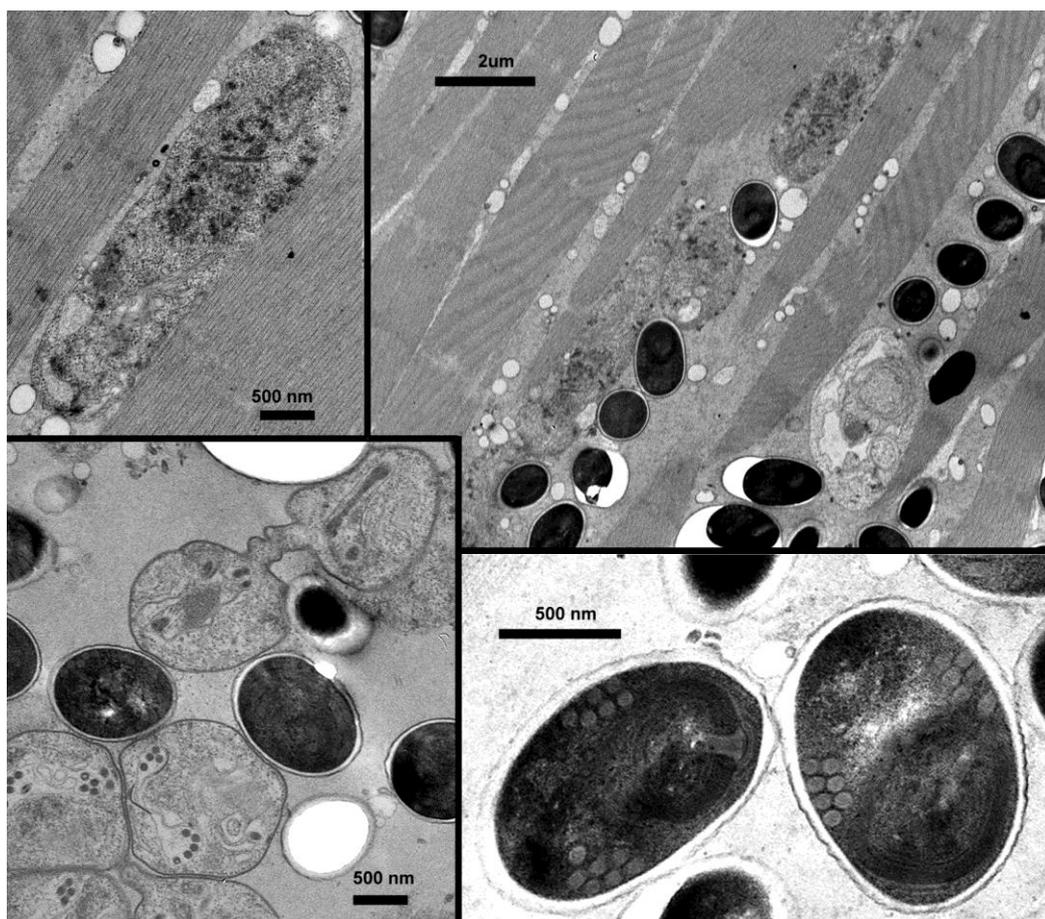
Таблица 3-2. Сводка публикаций о находках *Agmasoma penaei* в креветках семейства Penaeidae (Sokolova et al., 2015)

| Хозяин<br>(название на<br>английском и<br>латыни)                                | Место  | Дикие/<br>культура | Зараженные ткани  | Метод<br>изучения          | Авторы   |
|--|--|--------------------|---|----------------------------|--|
| <b>Atlantic white shrimp</b><br><i>Litopenaeus setiferus</i><br>(типовой хозяин) | Мексиканский залив<br>(США); типовая точка:<br>Grand Isle, LA  | дикие              | Гонады  | СМ, ТЭМ,<br>СЭМ,<br>МСрДНК | Sprague, 1950<br>Hazard, Oldacre, 1976;<br>Sokolova et al., 2016 |
| <b>Pacific white shrimp</b><br><i>L. vannamei</i>                                | Таиланд, Индийский<br>Океан                                    | культура           | Брюшные мышцы,<br>гепатопанкреас  | СМ, ТЭМ                    | Laisutisam et al., 2009  |
| <b>Indian prawn</b><br><i>Fenneropenaeus indicus</i>                             | Побережье Ю. Африки<br>(ЮАР), Ю. Атлантика/<br>Индийский Океан | дикие              | Гонады  | СМ                         | Sprague, Cough, 1971;<br>Sprague, 1977                           |
| <b>Banana shrimp</b> <i>Fen.</i><br><i>merguensis</i>                            | Таиланд, Индийский<br>Океан                                    | дикие<br>культура  | Нет данных  | СМ,<br>МСрДНК              | Pasharawipas, Flegel, 1994;<br>Pasharawipas et al., 1994         |
| <b>Pink shrimp</b> <i>Farfante-</i><br><i>penaeus duorarum</i>                   | Атлантическое побережье<br>Ю. Флориды (США)                    | дикие              | Мышцы, гепатопанкреас,<br>гонады,   | СМ                         | Kelly, 1979  |
| <b>Pink shrimp</b><br><i>Far. notialis</i>                                       | Побережье З. Африки<br>(Сенегал), Атлантика                    | дикие              | Гонады, гепатопанкреас,<br>сердце, кишечник, нервная<br>система, мышцы; ксеномы | СМ, ТЭМ                    | Clotilda-Ba, Toguebaye<br>1994                                   |
| <b>Black tiger shrimp</b><br><i>Penaeus monodon</i>                              | Побережье З. Африки<br>(Сенегал), Атлантика)                   | культура           | Мышцы, гонады   | СМ                         | Clotilda-Ba, Toguebaye<br>2001                                   |
|  | З. Побережье<br>Мадагаскара                                    | дикие              | Нет данных  | СЭМ                        | Toubiana et al., 2004  |
|  | Таиланд, Индийский<br>Океан                                    | культура           | Нет данных  | СМ,<br>МСрДНК              | Pasharawipas, Flegel, 1994;<br>Pasharawipas et al., 1994         |
| <b>Green tiger prawn</b><br><i>P. semisulcatus</i>                               | Таиланд, Индийский<br>Океан                                    | культура           | Нет данных  | СЭМ                        | Toubiana et al., 2004  |





**Рисунок 3-6.** *Agmasoma penaei*, паразит промысловой креветки *Litopenaeus setiferus*. **a.** Зараженная креветка: белые стрелки указывают на субкутикулярные «узелки», чёрная – на заражённые гонады. **b.** Спорофорные пузырьки (СП) в световом микроскопе. Стрелки указывают на крупные задние вакуоли. **c.** Меронты с диплокарионом (DK). **d.** Споронты внутри СП, заполненных электронно-плотным содержимым (черные звёздочки). Снаружи оболочки споронтов откладывается электронно-плотный материал (наконечник на левой вставке). Тубулярный секрет, выделяемый снаружи от СП, помечен белой звёздочкой. Каждый споронт содержит ядро (N). Присутствие встроенных в ядерную оболочку клеточных центров (spindleplaques) (нижняя вставка, стрелки) и структур, подобных кинетохорам (нижняя вставка, наконечник), говорит о делении ядра. **e.** Многоядерный споронт перед началом деления внутренним почкованием. В поле зрения 2 периферически расположенных ядра (N). Белые стрелки указывают на изгибы оболочки споронта. Тонкая мембрана СП указана белыми наконечниками. Черные стрелки и наконечники указывают на мембранные цистерны с электронно-плотным содержимым и на полосы электронно-плотного материала, которые в дальнейшем сформируют оболочку споронтов. Округлые мембранные профили (чёрная звёздочка) и клубки мембранного материала (белые звёздочки) – типичные элементы цитоплазмы материнского споронта перед началом деления. **f.** СП со споробластами (Spb). Звёздочка отмечает скопления секрета внутри СП. **g.** СП со зрелыми спорами (S). PV, задняя вакуоль. **h-i.** Ультраструктура зрелых спор. AD, якорный диск; Ep, эндоспора; Ex, экзоспора; N, ядро; PFa, широкая часть полярной трубки; PFb, узкая часть полярной трубки; Pp1, передняя часть полярнопласта; Pp2, задняя часть полярнопласта; PV, задняя вакуоль. **j.** Спорофорные пузырьки в сканирующем ЭМ. Стрелки и звёздочки указывают на секреторный материал, прилегающий к наружной оболочке СП. **k.** Определение тканевой локализации *A. penaei* на парафиновых срезах, окрашенных методом Луна: заражённые ткани – овариолы (Ov) и субкутикулярные узелки (стрелки) окрашены в розовый цвет (темно-серые на черно-белой копии). Мускулатура (Mus) и гепатопанкреас (Hep) не заражены. Вставка Ki: окрашенные методом Луна споры при большем увеличении. Масштабные линейки: **a**, 5 см; **b, j, ki**, 5  $\mu\text{m}$ ; **c, e, f-i**, 500 nm; **d**, 2  $\mu\text{m}$ ; **d insert**, 1  $\mu\text{m}$ ; **k-слева**, 500  $\mu\text{m}$ ; **k-справа**, 250  $\mu\text{m}$ .



**Рисунок 3-7.** *Perezia nelsoni* в скелетной мускулатуре креветки *Litopenaeus setiferus* (ЭМ). Вверху слева, диплокариотический меронт; вверху справа, меронты и споры; внизу слева, не до конца разделенные поздние споронты, соединенные характерными цитоплазматическими мостиками и споры; внизу справа, споры при большем увеличении.

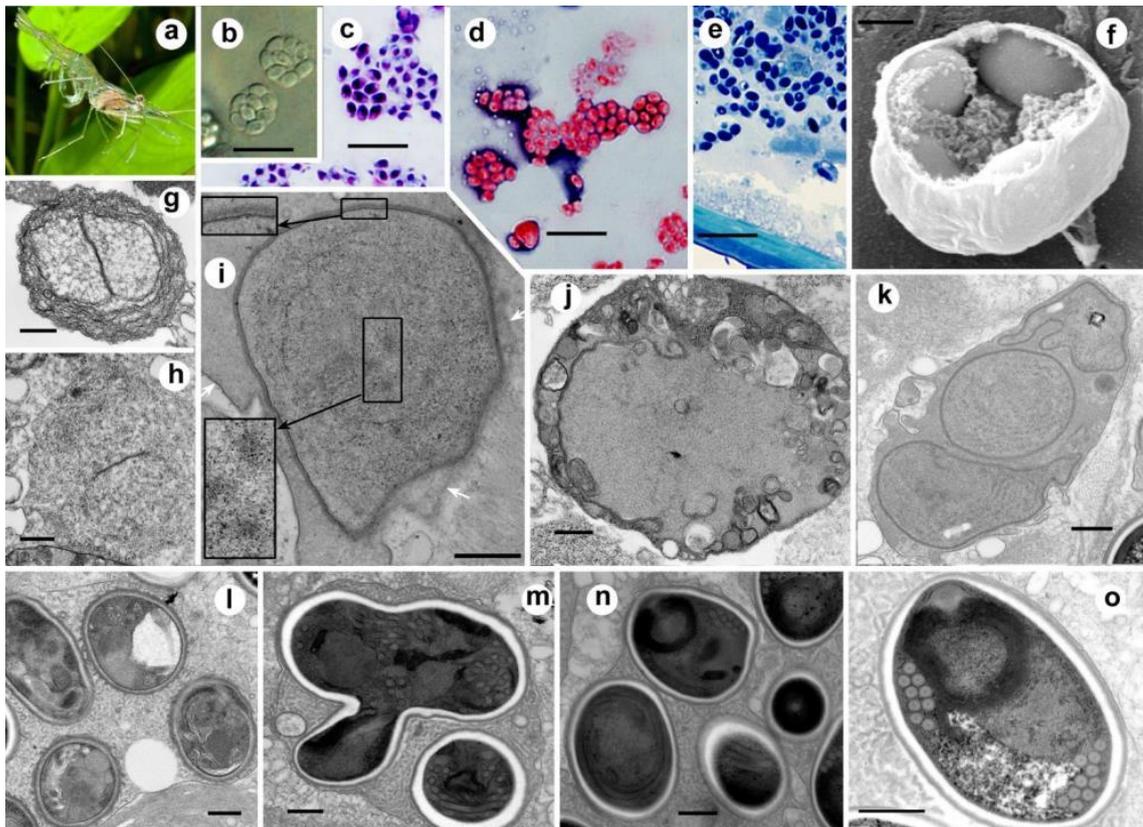
диаметром. Каждый СП содержит 8 широко-овальных спор размером  $2,9 \pm 0,06 \times 1,7 \pm 0,03$  мкм ( $2,5-3,3 \times 1,6-1,9$  мкм,  $n = 11$ ). Гиподермальный эпителий и мускулатура были заполнены стадиями спорогонии. ЭМ выявила диплокариотические меронты, которые после слияния ядер диплокариона трансформируются в споронты с большим одиночным ядром. Плазмалемма материнского споронта становится оболочкой СП, а ядро делится мейозом, за которым следуют митотические деления. В результате внутреннего почкования образуется 4 споронта, которые затем делятся бинарным делением, так что в итоге в СП формируется 8 одноядерных споробластов, затем спор. Спорофорные пузырьки заполнены фибриллярно-трубчатым секретом. Споры – с изофилярной полярной трубкой, уложенной в 10-13 витков в 2-3 слоя (Рис. 3-8).

Интересно, что филогенетический анализ на основе МСрДНК помещает новый вид микроспоридий в одну группу с двумя видами рода *Potasporea* – ксенома-образующими микроспоридиями из пресноводных окуневых рыб (отряд Perciformes) бассейна Амазонки (Рис. 3-10). Поскольку морфологические признаки паразита патогенез,

хозяйинная специфичность и другие экологические характеристики – не соответствуют диагнозу рода *Potasporea* (Casal et al., 2008), для этой микроспоридии был описан новый род *Apotasporea* (Sokolova, Overstreet, 2018). Учитывая близкое родство этих двух родов (89-90% сходства МСрДНК между *A. heleios* и *Potasporea* spp.), мы предполагаем, что их общий предок циркулировал по трофическим цепям от креветок к рыбам и обладал сложным жизненным циклом, включающим бесполоую спорогонию в рыбах (промежуточный хозяин) с образованием ксеном, и половую спорогонию, заканчивающуюся формированием мейоспор в креветках (окончательный хозяин). Недавно показано, что *Inodosporus octosporea*, паразит европейских креветок *Palaemon serratos*, очень близок генетически (98,4% сходства сиквенса МСрРНК) к *Kabatana* sp. из рыб *Gobiusculus flavescens*. Интересно, что тот же вид креветок поражен другой микроспоридией *Ovipleistophora arlo*, генетически (99.5% сходства сиквенса МСрРНК) и морфологически идентичной *Ovipleistophora* spp. из яичников рыб (Stentiford et al., 2017). Эти новые данные могут означать существование сложных жизненных циклов со сменой хозяев (рыб/ракообразных) не только у вымерших, но и у современных видов микроспоридий, относящихся к кладе 5 (по: Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Как указывалось ранее, сложный жизненный цикл предположен и для *Agmasoma penaei*, вида, относящегося к другой суперкладе (Terresporidia). Хрестоматийным и хорошо изученным примером сложных жизненных циклов стали микроспоридии семейства Amblyosporidae, циркулирующие между комарами и пресноводными ракообразными отряда Cyclopida (Becnel, Andreadis, 1999). Прямые же свидетельства существования жизненных циклов микроспоридий с участием рыб и ракообразных, предсказанные ранее (Overstreet, 1973), получены пока только для *Paranucleospora theridion*, циркулирующей между лососевым (*Salmo salar* и *Oncorhynchus mykiss*) в качестве промежуточного хозяина и паразитическими копеподоами (*Lepeophtheirus salmonis* и *Caligus elongates*) в качестве окончательного хозяина (Freeman, Sommerville, 2011; Nylund et al., 2010).

Таким образом, анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что существует клада микроспоридий, распространенная в Старом и Новом свете, объединяющая близкородственные, но морфологически различные виды микроспоридий, паразитирующие в креветках семейства Carideae и в пресноводных окуневых рыбах (Рис. ПЗ-2). Предположительно, жизненные циклы представителей этой клады включают, или включали в прошлом, смену хозяев, соответствующую смене половой и бесполой стадий размножения (Sokolova, Overstreet, 2018). Исследование малоизученного в настоящее время биоразнообразия микроспоридий из водных

экосистем, требующих специальных механизмов для обеспечения поддержания присутствия паразита среди популяций хозяев низкой плотности, возможно, приведёт к выявлению множества полиморфных видов с поликсенными циклами, циркулирующими между позвоночными, беспозвоночными и их паразитами (типа грегариин и трематод), сравнимого с биоразнообразием анаморф и телеоморф грибов подцарства Ascomycota.



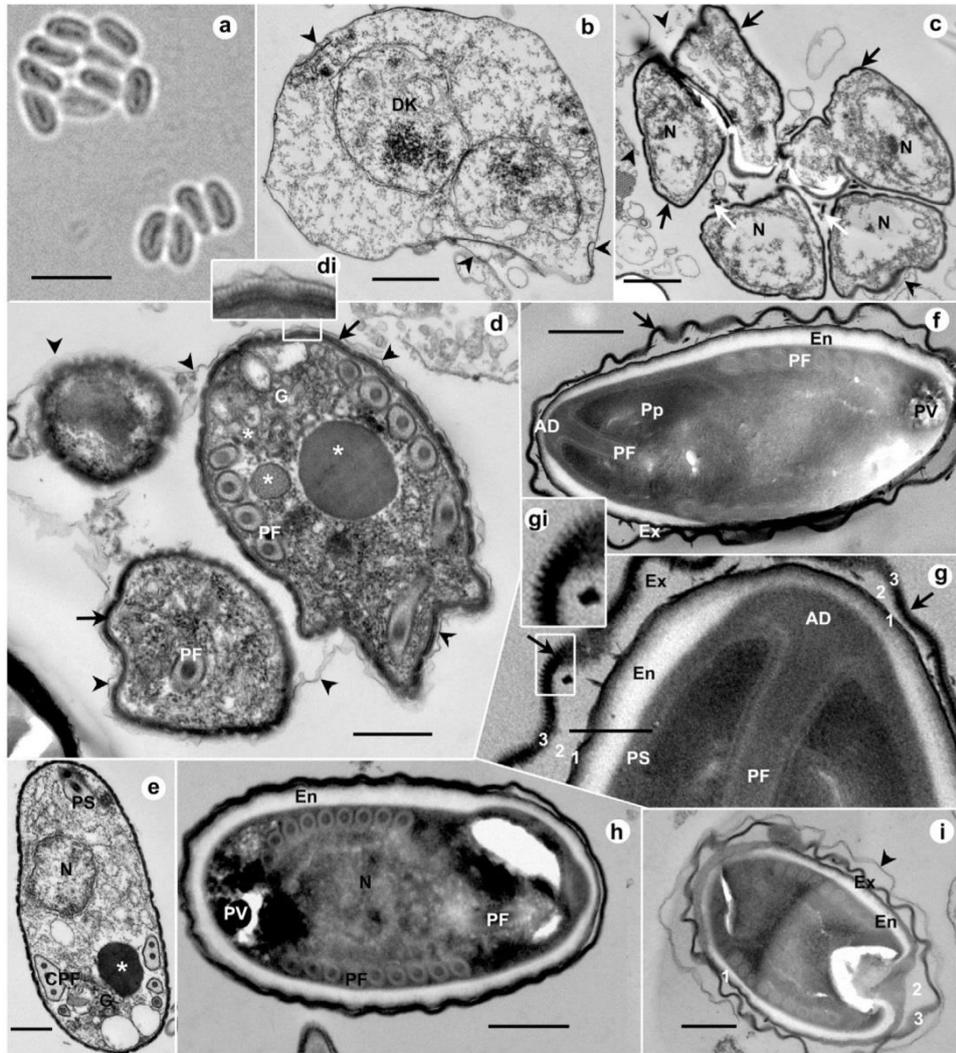
**Рисунок 3-8.** Новый род и вид *Apotaspora heleios* Sokolova, Overstreet 2018 из пресноводной креветки *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae). **a.** Внешний вид креветки. **b.** Спорофорные пузырьки (СП), живые, фазовый контраст. **c-d.** Мазки зараженных тканей, фиксированные метанолом и окрашенные по Гимза (**c**) и Трихромом (**d**). **e.** Полутонкий срез заражённой особи, окрашенный метиленовым синим. **f.** Сканирующая ЭМ демонстрирует толстую оболочку СП и обилие секрета внутри СП. **g-h.** Диплокариотические мерогональные стадии. **i.** Синаптонемальные комплексы (вставка) в ядре споронта, после слияния ядер диплокариона. **j.** Материнский споронт перед началом процесса внутреннего почкования и сегрегации цитоплазмы на СП и материнский споронт. Обращает на себя внимание обилие мембранных структур в цитоплазме и ядре. **k.** Дочерние споронты внутри СП. **l.** Споробласты в СП. **m.** СП с тератоидными (нежизнеспособными) спорами. **n.** СП с нормальными спорами. **o.** Зрелая спора при большем увеличении с характерными признаками: крупной задней вакуолью, изофилярной полярной трубкой, ядром, на срезе, имеющем треугольную форму, и двухчастным поляропластом. Масштаб: **a,** 1 см; **b-e,** 10  $\mu$ m; **f,** 2  $\mu$ m; **g-o,** 500 нм.

### 3.2.3 Микроспоридии пресноводных ракообразных отрядов Cladocera (класс Branchiopoda) и Cyclopoidea (класс Maxillopoda) и молекулярная филогения «AquaticOutgroup»

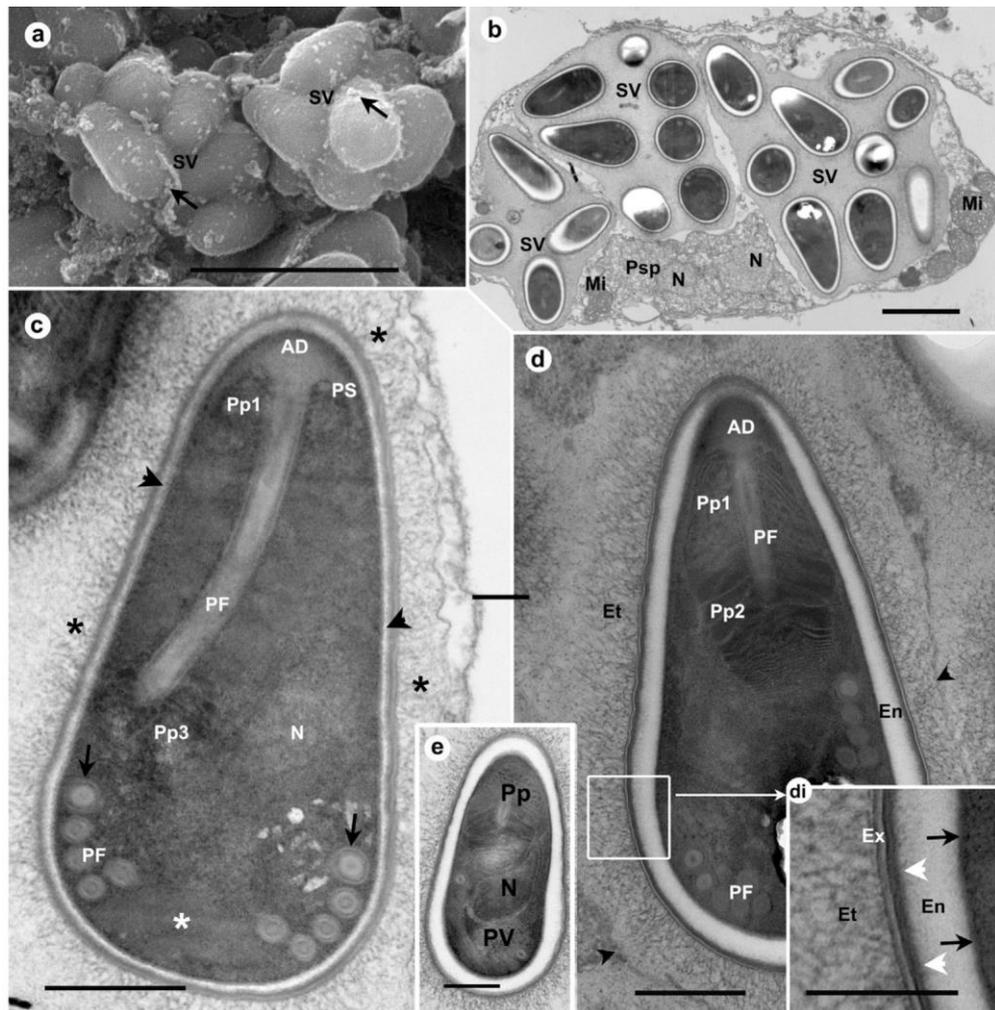
В результате обработки проб пресноводных ракообразных, собранных в районе реки Карасук и прилегающих водоёмах (Новосибирская область), выявлены два вида микроспоридий. Первый вид, выделенный из гиподермы и жирового тела *Cyclops* sp. (Maxillopoda, Copepoda), характеризуется овальными спорами, 2.0 x 3.6 мкм, заключёнными индивидуально или небольшими группами в хрупкие, быстро разрушающиеся спорофорные пузырьки (СП). Основываясь на ультраструктурном и филогенетическом (МСрРНК) анализе, описан новый вид *Alfvenia sibirica* (Рис. 3-9). Второй вид выделен из тех же тканей *Daphnia magna* (Branchiopoda, Phyllopoda). Грушевидные споры второго вида (2,3 x 4,0 мкм) размещались в стойких СП по 8-16 спор в каждом. На основании ультраструктуры этот вид идентифицирован как сибирский изолят (Si) вида *Agglomerata cladocera* (Pfeifer) (Larsson et al., 1996), описанного из *D. magna* из Англии. Оказалось, что *A. cladocera* (Si) разделяют 99% сходства последовательности МСрРНК с другим видом, *Binucleata daphniae* из *D. magna*, собранного в Бельгии (Refardt et al., 2008), однако различия в жизненном цикле и морфологии не позволяют синонимизировать роды *Binucleata* и *Agglomerata*. Основным результатом работы автора диссертации была впервые выполненная молекулярная характеристика двух родов – *Alfvenia* (в настоящее время включает 3 вида) и *Agglomerata* (7 видов), и установление позиций этих родов на филогенетическом древе, в сочетании с ультраструктурным анализом стадий жизненного цикла этих микроспоридий. Также были обобщены литературные данные по *Alfvenia* и *Agglomerata* spp. и представлен их сравнительный морфологический анализ. Эти два рода принадлежат к ветви, называемой «Aquatic outgroup» (Vossbrinck et al., 2004), плохо изученной сестринской группы семейства Amblyosporidae. Представители последней характеризуются сложными поликсенными жизненными циклами, проходящими в комарах и представителях отряда Copepoda. Вероятно, «Aquatic outgroup» включает многочисленные таксоны пресноводных микроспоридий, большинство из которых еще не описаны. Филогенетический анализ, основанный на сиквенсе гена МСрРНК, и анализ специфичности по отношению к хозяевам показывают, что одно из направлений диверсификации в рамках этой группы связано со сменой хозяев с копепод на дафниид в одной из анцестральных групп Amblyosporidae (Рис. 3-9, 3-10, ПЗ-3) (Sokolova et al., 2016).

Внутри группы видов “Aquatic outgroup” (AOG) молекулярный филогенетический анализ (по МСрДНК) идентифицирует две ветви (Рис. ПЗ-3): (1) *Alfvenia-Trichotuzetia-*

*Hazardia*, к которой принадлежит *Alfvenia sibirica*, и (2) *Agglomerata-Binucleata-Gurleya-Senoma-Larssonia-Berwaldia*, содержащая *A. cladocera*. Интересно, что члены первой группы паразитируют преимущественно в циклопидах (Maxillopoda, Copepoda) (иконка с изображением *Cyclops* sp., Рис. ПЗ-3), а члены второй – главным образом, связаны с дафнидами (Brachiorpoda, Cladocera) (иконка *Daphnia* sp.). Обе группы включают в себя несколько таксонов, паразитирующих в комарах (Diptera) (иконка с изображением *Chironomus* sp.). Учитывая, что ближайший родственник клады АОГ – это семейство Amblyosporidae, многие виды которого характеризуются поликсенными жизненными циклами, можно предположить, что мозаичное распределение видов АОГ по хозяевам связано с общими с Amblyosporidae диморфными предками, когда-то циркулирующими между двукрылыми и ракообразными, подобно современным *Amblyospora* spp. (Vossbrinck et al., 1998), а затем утеревшими части циклов и перешедшими к развитию в одном хозяине. На филогенетическом дереве *Alfvenia sibirica* группируется с *Trichotuzetia guttata*, однако довольно низкая статистическая поддержка этой группировки, а также высокий уровень дивергенции сиквенсов ставит под сомнение достоверность этой ассоциации. Положение сестринского таксона по отношению к ветви *Alfvenia-Trichotuzetia* занимает микроспоридия из комаров *Hazardia milleri*, также оказавшаяся ближайшим таксоном к *A. sibirica* при анализе эволюционного расстояния между видами методом K2P. *Agglomerata cladocera* группируется с *Binucleata daphniae*, видом, описанным из Европейской популяции *Daphnia magna* (Refardt et al., 2008), причем демонстрирует 99,07% генетическое сходство с этим видом при парном сравнении сиквенсов МСрРНК (эволюционное расстояние 0.009), идентичное содержание GC (52%) и почти абсолютное морфологическое сходство на свето-оптическом и электронно-микроскопическом уровнях. Все это свидетельствует о том, что *A. cladocera* и *B. daphniae* – близкие виды одного рода, а монотипичный род *Berwaldia* должен уйти в синонимы. Однако следует отметить, что аналогичное низкое эволюционное расстояние (0,009) в анализах, основанных на МСрДНК (а другие генетические маркеры для этой группы отсутствуют), наблюдалось в этой кладе между *Berwaldia schaefernai* и *Larssonia obtusa*, видами с довольно контрастной морфологией (Vávra, Larsson, 1994; Видтманн, Соколова, 1994). Для сравнения, представители одного рода *Gurleya daphniae* и *G. vavrai* демонстрируют более низкие значения этого параметра (0,0015). Кроме того, хотя морфологически *Binucleata daphniae* и *Agglomerata* spp. чрезвычайно похожи, у *B. daphniae* отсутствуют две важные характерные черты *Agglomerata* spp: (i) фибриллы, соединяющие экзоспору с мембраной



**Рисунок 3-9.** *Alfvénia sibirica* из *Cyclops* sp. (a) Световая микроскопия; (b-l) трансмиссионная ЭМ. (a) Неокрашенные споры, фиксированные метанолом. (b) Меронт-споронт промежуточная стадия, демонстрирующая начало формирования оболочки спорофорного пузырька (СП), отслаивающейся от плазматической мембраны (наконечники). (c) «Розетка» дочерних молодых споронтов, окруженная остатками оболочка СП (наконечники). Избыточный материал оболочки споронтов (черные стрелки) накапливается внутри СП (секрет пластинчатого типа) (белые стрелки). (d) Три споробласта окружены мембраной СП (наконечники). Их стенки гомологичны наружному слою экзоспоры (черные стрелки). Звёздочкой отмечены электронно-плотные тела, ассоциированные с Гольджи, содержащие белки полярной трубки (ПТ). (di) Участок оболочки (d) с выростами, аналогичными наблюдаемым на внешнем слое экзоспоры. (e) Срез через споробласт в процессе дифференцировки ПТ. В поле зрения тубулярный Гольджи, цистерны с предшественниками ПТ, витки ПТ и электронно-плотные тела (звёздочки). (f) Зрелая спора с ундулирующим внешним слоем экзоспоры. (g) Передний конец споры при большем увеличении. В поле зрения: якорный диск, полярный сак, передний участок ПТ и экзоспора, состоящая из 3-х слоёв (1, 2, 3), вешний из которых несет короткие выросты (вставка gi). (h) Спора с гомогенной экзоспорой, в которой с трудом различимы слои. (i) Спора, окружённая двумя оболочками: мембраной СП (наконечники) и ундулирующей экзоспорой (стрелки). Масштаб: a, 5  $\mu$ m; b-c, 1  $\mu$ m; d-f, h-i, 500 nm; g, 200 nm. AD, якорный диск; CPF, цистерна с предшественниками ПТ; DK, диплокарион; En, эндоспора; Ex, экзоспора; G, Гольджи; N, монокариотическое ядро; PF, ПТ, Pp, поляропласт; PS, полярный сак; PV, задняя вакуоль.



**Рисунок 3-10.** Сибирский изолят *Agglomerata cladocera* из *Daphnia magna*: ультраструктура споры. (a) Спорофорные пузырьки (СП) со зрелыми спорами, сканирующая ЭМ. Стрелки указывают на скопления грануло-трубчатого секрета на поверхности СП. (b) Срез через заражённый гемоцит, содержащий СП со зрелыми спорами и двуядерный «пре-споронт». Из органелл клетки хозяина заметны только митохондрии. (c) Молодая спора с тонкой эндоспорой (наконечники) и типичным набором органелл внутри СП, заполненного гранулярно-тубулярным секретом, сконцентрированным у поверхности споры (звездочки). Стрелки указывают на передние более крупные витки полярной трубки, которые отличаются от задних витков внутренним строением. Дистальная часть поляропласта (Pp3) состоит их трубочек. (d, di) Спора с хорошо развитой оболочкой, состоящей из плазматической мембраны (di, стрелки), толстой эндоспоры, аморфного переходного участка (белые наконечники), 3-слойной экзоспоры и эписпоральной части, состоящей из 6–12 нм выростов, контактирующих с мембраной СП (черные наконечники). (e) Спора с вытянутым ядром и хорошо сохранившейся постеросомой (задней вакуолью), заполненной мембранным и трубчатыми материалом. Масштаб, a, 5  $\mu\text{m}$ ; b, 2  $\mu\text{m}$ ; c-e, 500 nm; di, 250 nm. AD, якорный диск; En, эндоспора; Ex, экзоспора; Mi, митохондрии; N, ядро; PF, полярный филамент, PS, полярный сак; Psp, пре-споронт; PV, задняя вакуоль; S, зрелые споры.

спорофорного пузырька (СП), и (ii) многослойная экзоспора, состоящая из по меньшей мере 3-х слоев (Рис. 3-9). Экзоспора *B. daphniae*, напротив, однородная и гладкая (Refardt et al., 2008). Такие существенные морфологические различия не позволяют синонимизировать род *Binucleata*, по крайней мере до тех пор, пока большее число видов

рода не будут доступны для ультраструктурного и филогенетического анализов. Интересной представляется группировка дихотомии *Agglomerata-Binucleata* с *Senoma globulifera* (Рис. ПЗ-3). Сравнительный анализ МСрДНК *S. globulifera* показал сходное содержание GC (53%) и относительно низкие значения параметра эволюционного расстояния при попарном сравнении с *B. daphniae* (0,0298) и *A. cladocera* (0,0234). Учитывая, что *S. globulifera* разительно отличается по ультраструктуре и паразитирует в комарах (Simakova et al., 2005), мы предполагаем, что этот вид, подобно *Hazardia milleri* в группе *Afvenia-Hazardia* – эволюционный потомок «москитной морфы» предковой диксенной микроспоридии. Не исключено, что не только вымершие, но и некоторые из современных представителей АОГ нуждаются в дополнительном, пока еще не обнаруженном хозяине для завершения жизненных циклов (Refardt et al., 2008).

Эволюционные преемники «копеподной морфы» общего предка могли перейти к паразитированию в других беспозвоночных, в первую очередь, в представителях отряда Cladocera, дафниях, занимающих примерно ту же экологическую нишу, что и циклопы. Интересно, что, обитая в сходной среде, циклопы и дафнии значительно различаются по потреблению кислорода, содержанию азота и фосфора и другими биохимическим признакам (Arhonditsis, Brett, 2005; Bertilsson et al., 1995). Эти группы ракообразных также демонстрируют различные температурные ограничения. В частности, у копепод более широкий по сравнению с дафниями диапазон допустимых температур, слегка сдвинутый в сторону низких значений (Bertilsson et al., 1995). Таким образом, Cyclopidae и Cladocera обеспечивают для своих микроспоридиальных паразитов две различные ниши, требующие специфических биохимических и морфологических адаптаций, которые, вероятно, соответствуют диверсификации клады АОГ на две группы видов, одна из которых преимущественно состоит из паразитов семейства Cyclopidae, а другая использует в качестве хозяев виды отряда Cladocera (Рис. 3-13).

### **3.3 Ультраструктура, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспоридий наземных насекомых**

Микроспоридии известны из всех отрядов насекомых, а происхождение и диверсификация большинства таксонов обусловлены эволюцией и биоразнообразием этой группы Metazoa (Исси, 1986; Соколова, Исси, 2001). Девяносто три типовых вида из описанных к настоящему времени 200 родов микроспоридий паразитируют в насекомых (Весел, Andreadis, 2014). Микроспоридии насекомых – несомненно, самая изученная группа типа Microsporidia, и основные современные знания об этих паразитах получены именно на энтомопатогенных видах. Кроме того, именно с

энтомопатогенными микроспоридиями эволюционно и/или экологически связано большинство видов, потенциально или реально патогенных для человека.

Основными объектами исследований автора были энтомопатогенные микроспоридии из трёх отрядов насекомых: Orthoptera – из сверчка *Gryllus bimaculatus* (Gryllidae), саранчи (Acrididae) и кузнечиков (Tristiridae и Catitidae), Lepidoptera – из лесного кольчатого коконопряда *Malacosoma disstriae* (Lasiocampidae) и Hymenoptera – из огненного муравья *Solenopsis invictae* (Formicidae).

Микроспоридии прямокрылых изучались как в лаборатории в качестве экспериментальных объектов, так и в природных популяциях хозяев, и значительная часть результатов этих исследований вошла в диссертацию (см. также Главу 4). Микроспоридии чешуекрылых представлены в диссертации видом *Nosema disstriae*, т.к. работа по сравнительному морфологическому и молекулярному анализу группы видов, к которому относится *N. disstriae*, хорошо высвечивает проблемы эволюционных взаимоотношений внутри рода *Nosema*, наиболее многочисленного у Microsporidia. Большой интерес для автора представляли паразиты общественных перепончатокрылых, в частности, муравьёв – как вершины эволюции наземных насекомых. То обстоятельство, что муравьи обладают уникальными физиологическими и поведенческими защитными реакциями против заражения микропатогенами (Hölldobler, Wilson, 1990; Tschinkel, 2006), вызывает дополнительный интерес к изучению паразитирующих в них видов. Опубликованные автором данные по микроспоридиям стрекоз (Odonata) (Sokolova et al., 2006a) и сеноедов (Psocoptera) (Sokolova et al., 2010) не вошли в диссертацию, но были использованы либо в филогенетическом анализе, либо как материал для сравнения при обсуждении результатов.

### 3.3.1 Микроспоридии рода *Paranosema* из клеток жирового тела прямокрылых и жесткокрылых насекомых

Новый этап исследований нозем начался с описания микроспоридии *Nosema grylli*, паразитирующей в жировой ткани и гемоцитах сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae). Этот вид выявлен в лабораторной популяции сверчков в ИЭФБ им. Сеченова (Соколова et al., 1994). Позже, на основании молекулярно-филогенетического анализа этой микроспоридии выделен новый род *Paranosema*, к которому также отнесены *Nosema locustae* из перелетной саранчи *Locusta migratoria* и *N. whitei* из малого мучного хрущака *Tribolium confusum* (Sokolova et al., 2003, 2005). Паразито-хозяинная система *P. grylli* – *G. bimaculatus* стала модельной, и ее изучение дало множество публикаций и диссертаций, в том числе В.В. Долгих (1996, 2017), Е.С. Насоновой (2007), П.С. Семенова (2004), Ю.С. Токарева (2003, 2016) и др.

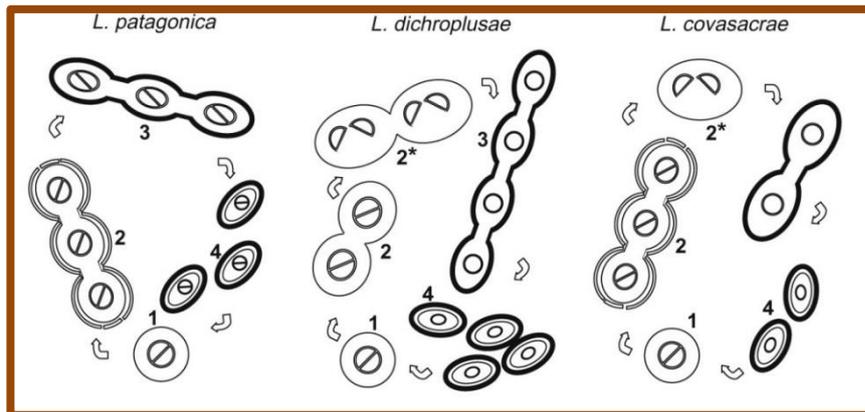
Все стадии жизненного цикла *P. grylli* проходят в непосредственном контакте с клеткой хозяина. Зрелые споры, 5 x 2,2 мкм (фиксированные 3,3 x 1,4 мкм), имеют овально-цилиндрическую форму, диплокарион и длинный полярный филламент, свернутый в споре в 15-18 витков в 1-2 слоя. Жизненный цикл этой микроспоридии достаточно сложен. Он включает слияние ядер диплокариана, половой процесс и кратковременную одноядерную стадию (Nassonova, Smirnov, 2005; Sokolova et al., 2003). Более подробно ультраструктура этого вида изложена в Главе 4 диссертации, где описана организация секреторной системы микроспоридий, в основном, на примере *P. grylli*.

### 3.3.2 Микроспоридии рода *Liebertmannia* – специализированные паразиты эпителиев кишечного тракта и его придатков

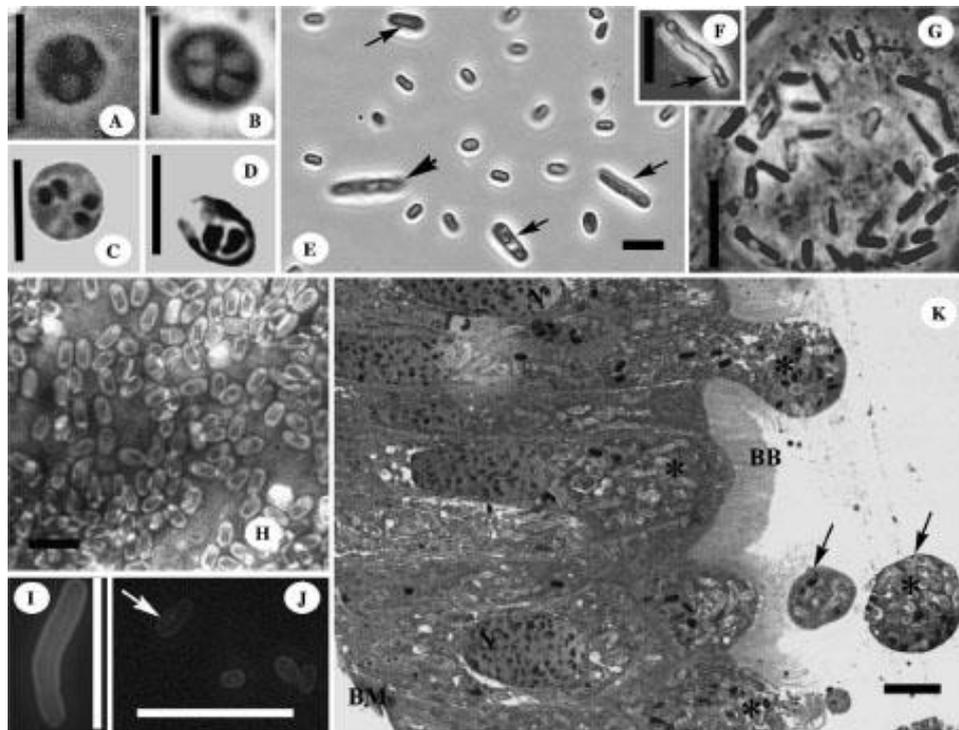
Еще одна новая кллада микроспоридий (род *Liebertmannia* Sokolova, Lange, Fuxa 2006) была выделена их аргентинских кузнечиков (Sokolova et al., 2006b, 2007, 2009). В роде *Liebertmannia* описано два новых вида и уточнено систематическое положение третьего вида. Все три вида паразитируют в клетках кишечного тракта и образуют мелкие (2.5-3.0 X 1.1-1.5 мкм) продолговатые споры в результате множественного деления веретеновидного спорогонального плазмодия. Сходство МСрДНК между видами – 97-99%. Все три вида *Liebertmannia* spp. эволюционировали как специализированные паразиты разных участков кишечного тракта. *L. patagonica* паразитирует в клетках среднего кишечника кузнечика *Tristira magellanica* (Tristitidae), *L. (=Perezia) dichroplusae* – в Мальпигиевых сосудах *Dichroplus elongates* (Melanoplidae), *L. covasacrae* – в слюнных железах *Covasacris pallidinota* (Acrididae). Адаптация *L. patagonica* к паразитированию в быстро обновляющихся и богатых пищеварительными ферментами клетках эпителия средней кишки – короткий диплокариотический жизненный цикл, выпадение полового процесса и развитие всех преспоровых стадий паразита в окружении ЭР клетки хозяина. Эти признаки отсутствуют у *L. dichroplusae* и *L. covasacrae*, обитающих в придатках кишечника, т.е. в менее агрессивной среде. Оба последних вида, в отличие от первого, образуют одноядерные споры и сохранили мейоз и смену ядерных фаз в жизненном цикле (Рис. 3-10).

Более подробное обсуждение паразито-хозяинной системы *Tristira magellanica* – *Liebertmannia patagonica* целесообразно по ряду причин. Во-первых, молекулярная филогения *L. patagonica*, вида, описанного в 2006 году (Sokolova et al., 2006b), выявила существование новой кллады микроспоридий, рода *Liebertmannia*, из кузнечиков Нового Света. Во-вторых, это первое и пока единственное описание заражения микроспоридиями кузнечиков семейства Tristiridae (п/отряд Caelifera), обособленной группы бескрылых кузнечиков тропических лесов Ю. Америки. В-третьих, изучение

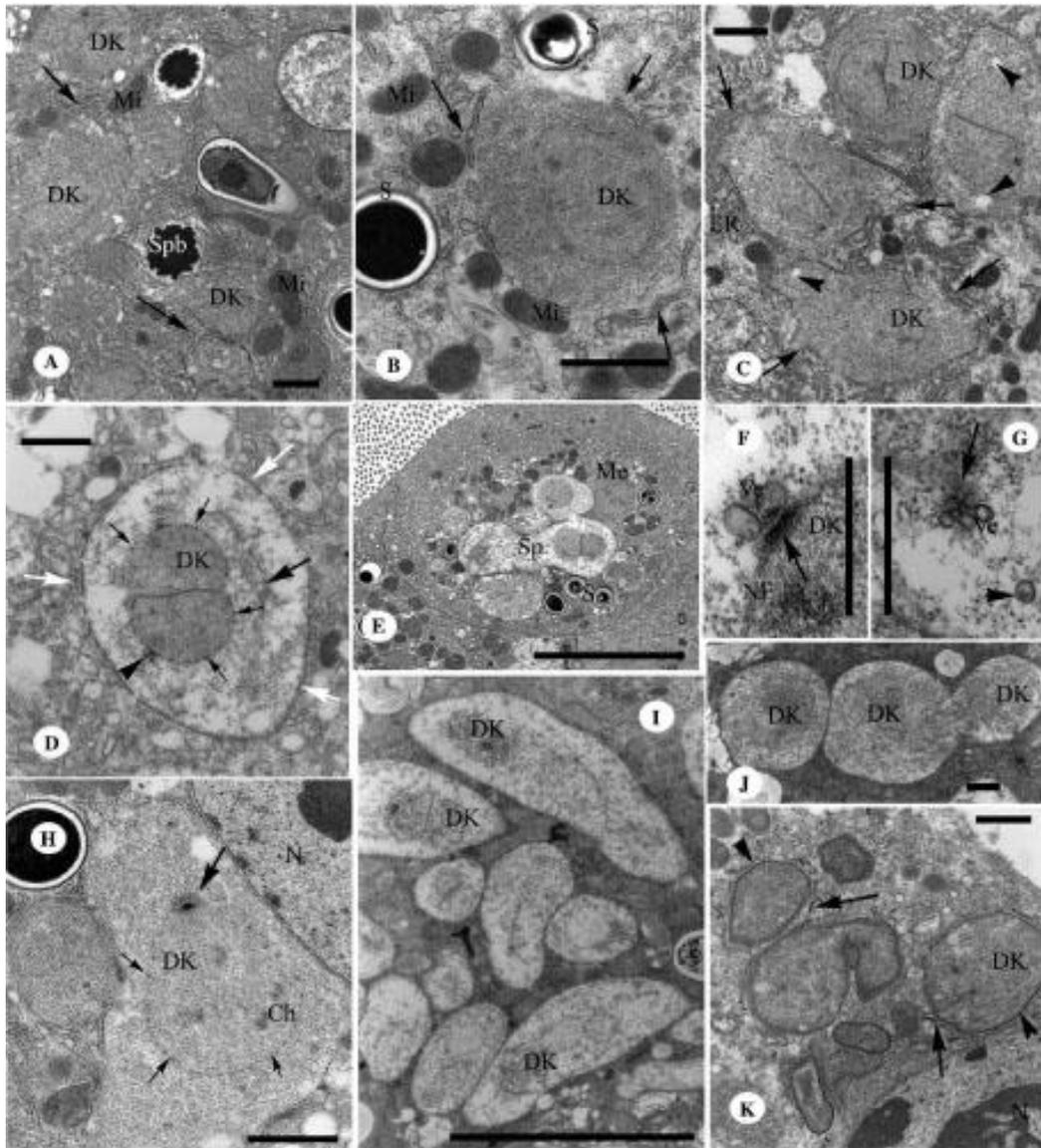
этой паразито-хозяинной системы вскрыло интереснейшие адаптации микроспоридий к паразитированию в нестабильной среде постоянно обновляющегося кишечного эпителия, еще раз демонстрируя эволюционную и экологическую пластичность микроспоридий. За небольшими исключениями, микроспоридии прямокрылых демонстрируют низкий уровень зараженности (1-5%) в природных популяциях хозяев (Lange, 2003; Streett, Henry, 1984). Заражённость же кузнечиков *L. patagonica* была, высокой и варьировала от 54 до 81% в течение 6 лет наблюдений (1998-2003). Как минимум три характеристики паразитарной системы *T. magellanica* – *L. patagonica* могут объяснить стабильно высокую заражённость кузнечиков: (1) ограниченные возможности передвижения хозяина из-за бескрылости и склонность к скоплению в кулиги, (2) выделение спор с фекалиями, т.е. наличие постоянного источника инфекционного начала в среде обитания, и (3) низкая вирулентность паразитов для организма хозяина, т.к. разрушающиеся в результате заражения энтероциты, и так недолговечны (Billingsley, Lehane, 1996), а высокая регенеративная активность эпителия пищеварительного тракта отчасти компенсирует потери энтероцитов из-за паразитов. Перед паразитами, развивающимися в такой в нестабильной и агрессивной среде как клетки кишечного эпителия, встаёт как минимум 2 жизненно важные задачи: быстро завершить цикл развития, чтобы избежать преждевременной элиминации вместе с отработавшими энтероцитами, и противодействовать высокой активности фаго-лизосомной системы, характерной для данного типа клеток. Ультраструктурный анализ демонстрирует, каким образом *L. patagonica* «решает» эти задачи. Во-первых, паразит имеет простой и короткий жизненный цикл без всяких признаков полового процесса (синаптонемальных комплексы, ядерной диссоциации и пр.) (Рис. 3-11 – 3.13). Стадия мерогонии редуцирована: меронты наблюдались крайне редко и, по-видимому, трансформировались в споронты сразу после первого деления спороплазмы. Во-вторых, споронты, представленные удлинёнными плазмодиями – основная трофическая и пролиферативная стадия паразита, окружены шероховатым эндоплазматическим ретикуломом хозяина (ШЭР), в отличие от меронтов, споробластов и спор. Эта черта не уникальна для *L. patagonica* (Canning, Curry, 2004; Silveira, Canning, 1995). Предполагается, что окружение цистернами ШЭР позволяет внутриклеточным стадиям микроспоридий избежать взаимодействия с фаго-лизосомной системой клетки на критическом этапе жизненного цикла. К тому моменту, когда споробласты *L. patagonica* теряют защитный слой ШЭР, они, похоже, становятся восприимчивы к лизосомной атаке (Рис. 3-14). Почти около каждой споры наблюдалась одна или несколько везикул, сходных по структуре и интерпретируемых нами как первичные лизосомы.



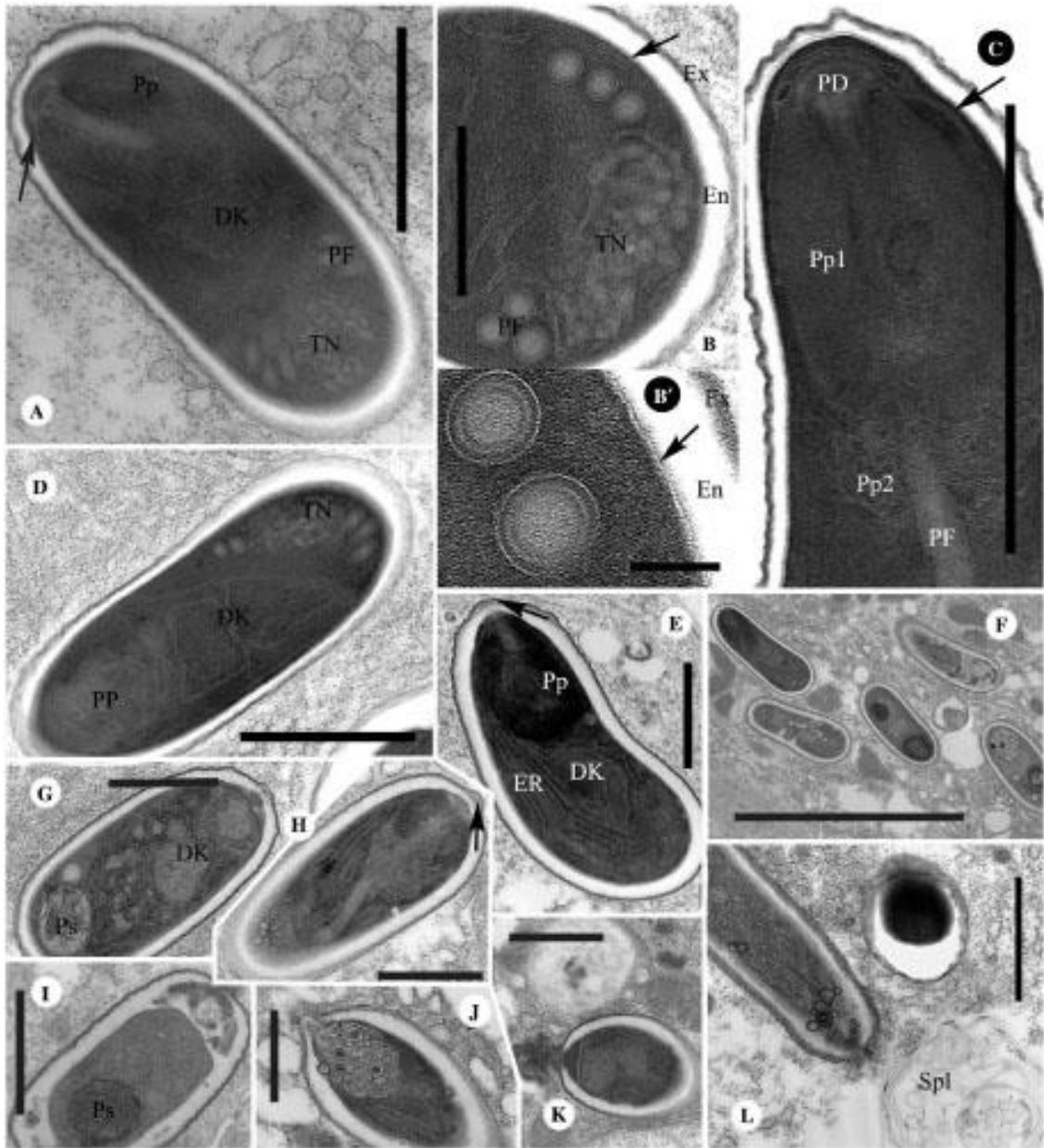
**Рисунок 3-11.** Вариации жизненного цикла у трех видов рода *Liebermannia*. 1 – меронты; 2 – мерогональные плазмодии; 2\* – диссоциация ядер диплокариона (переход от мерогонии к спорогонии); 3 – спорогональный плазмодий; 4 – споры.



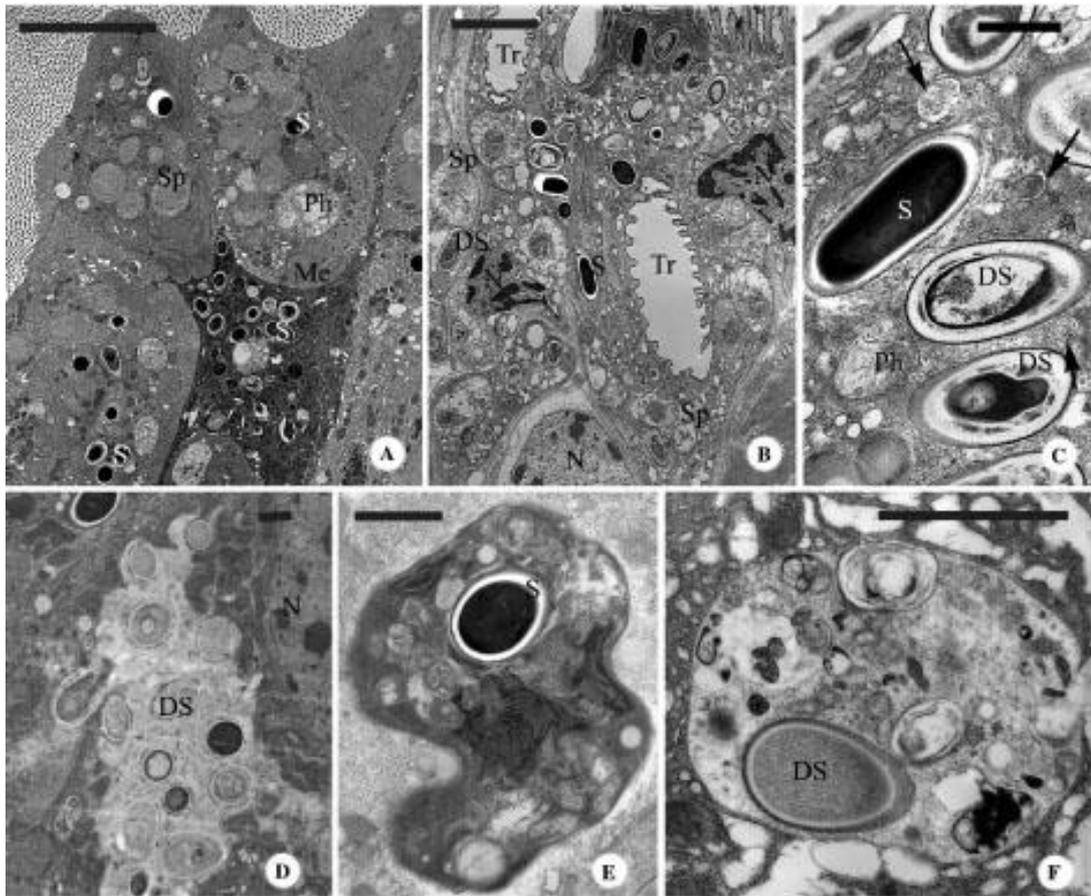
**Рисунок 3-12.** Стадии и споры *Liebermannia patagonica*. Световая микроскопия. (А–D) Округлые диплокариотические преспоровые стадии. (E) Суспензия спор из заражённого насекомого содержит споронты на разных стадиях созревания (стрелки). Наконечники указывают на вытянутые споронты перед их разделением на несколько (минимум 3) споробластов, демонстрируя полиспоробластическую спорогонию. (F) Споронт, от которого отпочковывается споробласт (стрелка). (G) Скопление спор и споробластов в фагосоме. (H) Мазок заражённой ткани со зрелыми овальными спорами одинакового размера. (I) Вытянутый споронт. (J) Мелкие овальные споры и вытянутый споронт, в котором отчётливо виден диплокарион (стрелка). (K) Полутонкий срез через кишечный эпителий, заражённый стадиями и спорами (наконечники) и участок заражённой клетки (стрелки) в просвете кишечника (А, В, Е–G), Свежеприготовленные нефиксированные мазки; (С, D, H), мазки, окрашенные по Гимза-Романовскому; (I, J), окраска калкофлуором и ДАПИ, флуоресцентная микроскопия; (K), окраска среза метиленовым синим methylene blue. ВВ, щеточная кайма; ВМ, базальная мембрана; N, ядро хозяина. Масштаб: А–Е, H, 5 мкм; F, G, I–K, 10 мкм.



**Рисунок 3-13а.** ТЭМ меронтов (М) и споронтов (Сп) стадий *L. patagonica*. (А, В) М внутри энтероцитов окружены митохондриями и ЭР клетки хозяина (стрелка). (С) Переход к спорогонии: ЭР хозяина окружают Сп плотным слоем; наконечники указывают на мелкие вакуоли в цитоплазме Сп. (D) Переходная стадия, предшественник спорогонального плазмодия. Окаймлённые пузырьки вблизи центриолярных пластинок (ЦП), наконечники. Поры на оболочке ядра указаны черными стрелками. Вытянутые и уплощённые цистерны ЭР хозяина формируют дополнительную оболочку (белые наконечники). (E) Заражённый энтероцит. (F, G) ЦП (стрелки) ассоциированы с 3–5 мембранными пузырьками, возможно митосомами (наконечники). (H) Споронт, делящийся закрытым митозом. Стрелки указывают на ЦП, мелкие стрелки – на ядерные поры. (I, J) Вытянутые СП с 2–3 ДК, упакованные в цистерны ЭР хозяина. (K) Поздние СП, окружённые электронно-плотными оболочками (наконечники). Тубулярные структуры в цитоплазме клетки хозяина указаны стрелками. Ch, хромосомы; ДК, диплокарион; ER, эндоплазматический ретикулум; Me, меронт; Mi, митохондрии; N, ядро хозяина; NE, ядерная оболочка; S, спора; Sp, споронт; Spb, споробласт; Ve, везикулы, ассоциированные с ЦП. Масштаб: А–D, G, H, J, K, 1 мкм; E, 5 мкм; F, 0.5 мкм; I, 10 мкм.



**Рисунок 3-13б.** ЭМ спор *L. patagonica*. (А) Продольный срез через спору. Полярная трубка закручена в три витка. Задняя часть споры заполнена трубчатым секретом. Полярный сак указан стрелкой. (В, В') Поперечный срез через заднюю часть споры: полярная трубка на срезе состоит из concentрических кругов разной электронной плотности. Плазматическая мембрана указана стрелкой. (С) Передняя часть споры с двухчастным поляропластом, якорным диском и полярным саксом (стрелка). (D) Продольный срез через спору, демонстрирующий диплокарион (DK). (E) Диплокарион окружён цистернами шероховатого ЭР. Высокая электронная плотность поляропласта и присутствие выемки на экзоспоре на переднем конце (стрелка) говорит о том, что спора готова выбросить полярную трубку. (F–I) Споры на разных стадиях выворачивания полярных трубок. Стрелки указывают на выемки экзоспоры на переднем конце. (J–L) Содержимое споры изливается через отверстие в передней части оболочки (стрелка). DK, диплокарион; En, эндоспора; ER, эндоплазматический ретикулум; Ex, экзоспора; TN, тубулярная сеть; PD, полярный диск; PF, полярная трубка; PP, поляропласт; PP1, передняя часть роляропласта; PP2, задняя часть поляропласта; Ps, постеросома; Spl, спороплазма. Масштаб: А, С–Е, G–L, 1 мкм; В, 0.5 мкм; В'), 125 нм; F, 5 мкм.



**Рисунок 3-14.** Тканевая локализация *L. patagonica* и взаимодействие с клеткой хозяина. (А) Интенсивно заражённые клетки кишечного эпителия. (В) При интенсивной инвазии заражены также трахеолы, расположенные вблизи кишечника. (С) Увеличенный участок В. Лизосомы (стрелки) заметны практически около каждой споры. (D–F) Споры внутри фагосом на различных стадиях переваривания. DS, «пустая» спора с выстрелившей спороплазмой; Me, меронт; N, ядро клетки хозяина; Ph, фагосома; S, спора; Sp, споронт; Tr, просвет трахеолы. Масштаб: А, 10 мкм; В, 5 мкм; С–F, 1 мкм.

В заражённых клетках наблюдалось множество фагосом (вторичных лизосом) со спорами внутри, многие из которых были в процессе выброса (или скорее выхода) спороплазмы. Мы предполагаем, что взаимодействие с кислой средой лизосом как раз служит стимулом для выворачивания полярной трубки. Большинство наблюдаемых спор *L. patagonica* на срезах имело симптомы, свидетельствующие о запуске механизма выворачивания трубки (Рис. 3-13). Интересно, что задняя вакуоль спор в «интактном» и «стимулированном» состоянии содержала многочисленные тубулярные структуры и напоминала «постеросому», компонент транс Гольджи, выявляемый в споробластах и молодых спорах микроспоридий и содержащий белки полярной трубки (Sokolova et al., 2003; Takvorian, Cali, 1994), из которой в зрелых спорах формируются дистальные витки. Наличие постеросомы и малое число витков полярной трубки указывало на недоразвитие аппарата экстрезии у спор, локализованных в клетках кишечника. Таким образом, третьим приспособлением *L. patagonica* к условиям размножения в энтероцитах,

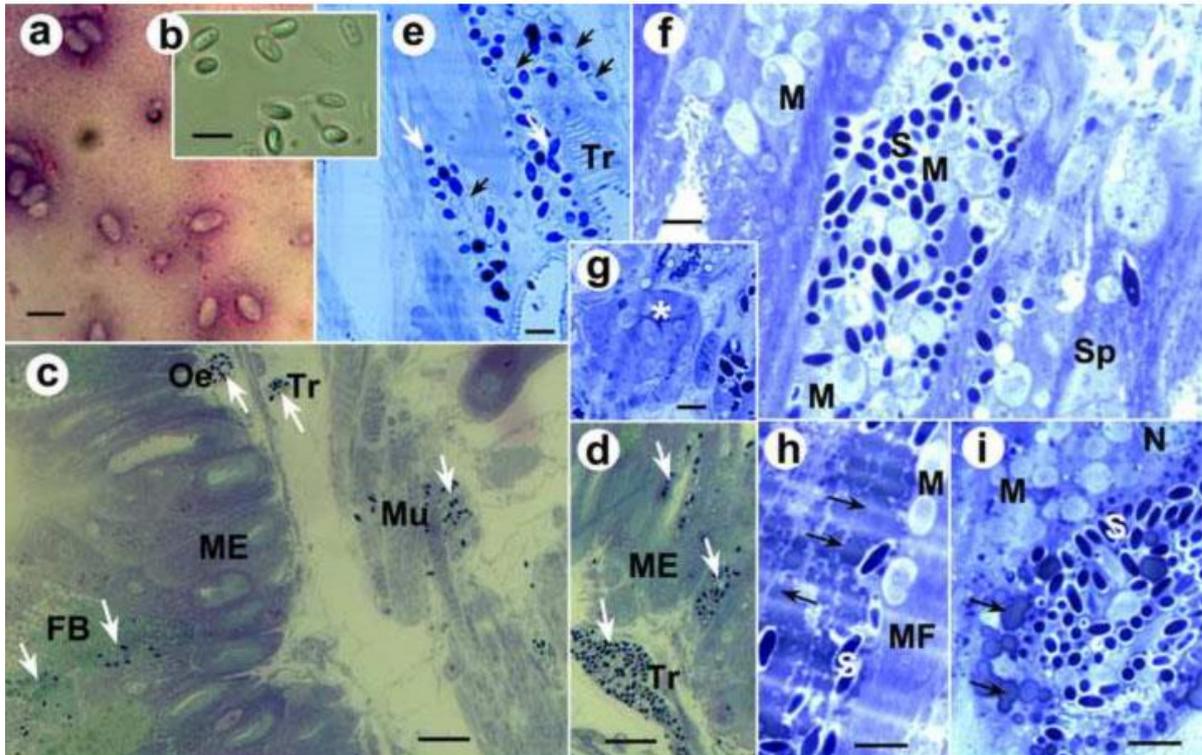
возможно, стало приобретение спорами способности к выбрасыванию зародыша на более ранней стадии жизненного цикла, своеобразная неотения. Процесс, который мы наблюдали в энтероцитах, трудно назвать «выбрасыванием» трубки – это скорее «вытекание» спороплазмы через отверстие в апикальном конце споры, напоминающее выход спороплазм мечниковеллид (Рис. 3-13). Предположительно, такой механизм служит для автоинвазии, т.е. заражения той же клетки. Те споры, которые участвуют в горизонтальной передаче инфекции, возможно, «дозревают» в отпадающих клетках эпителия и/или во внешней среде и формируют полноценный экстрозивный аппарат.

### 3.3.3 Филогенетическое положение *Nosema disstriae* и диверсификация близкородственных видов в группе *Nosema bombycis*

*Nosema disstriae* – паразит лесного кольчатого коконопряда *Malacosoma disstria*. Для этого вредителя характерны регулярные вспышки высокой численности, уничтожающие гектары лиственных лесов в Канаде. *M. disstria* – карантинный вредитель в России. Вид *N. disstriae* давно и кратко описан (Nordin, Maddox, 1974) на световом уровне. Автором диссертации изучена его ультраструктура и филогения; выяснено, что *N. disstriae* заражает многие ткани, включая мышцы и жировое тело, но преимущественно локализуется в эпителии трахей (Рис. 3-15). Изредка наблюдается редуцированная спорогония, заканчивающаяся формированием одноядерных спор в паразитофорном пузырьке. В остальном морфология и ультраструктура этого вида типична для нозем из Lepidoptera (Рис. 3-16). Для *N. disstriae* характерна реверсия генов РНК цистрона (5'–LSU–ITS–SSU–IGS–5S–3') (Рис. 3-17), что говорит о принадлежности вида к кладе *N. bombycis* (NbK). Филогении, на основе генов RPB1, SSU-RPB1 and RPB1-LSU-ITS-SSUrDNA поддерживают базальное положение этого вида внутри клады и группировку с *Nosema (Vairimorpha) anthereaeae* (Куйе-Покю, Sokolova, 2017) (Рис. ПЗ-4, ПЗ-5).

Это исследование помогло разобраться с большой группой близкородственных видов, принадлежащих к роду *Nosema*. Почти все виды этой группы – паразиты насекомых, подавляющее большинство описанных видов – паразиты чешуекрылых. Спраг и Исси идентифицировали от 80 до 150 видов нозем, паразитирующих в 150 видах ночных и дневных бабочек (Sprague, 1977a; Исси, 1986). По Исси (1986), каждый вид Lepidoptera имеет, как минимум, один вид паразитирующей на нем ноземы. Световая микроскопия (СМ) не позволяет проверить точность этих расчетов, так как морфологически *Nosema* spp. различаются слабо. В частности, с помощью только СМ невозможно отличить *N. disstriae* от восьми других видов нозем чешуекрылых, например, от *N. bombycis*, *N. trichoplusiae*, *N. mesnili* и *N. fumiferana* (Nordin, Maddox, 1974; Sprague, 1977a). Размер и форма спор, цикл развития, как и тканевая и хозяйственная специфичность не могут служить

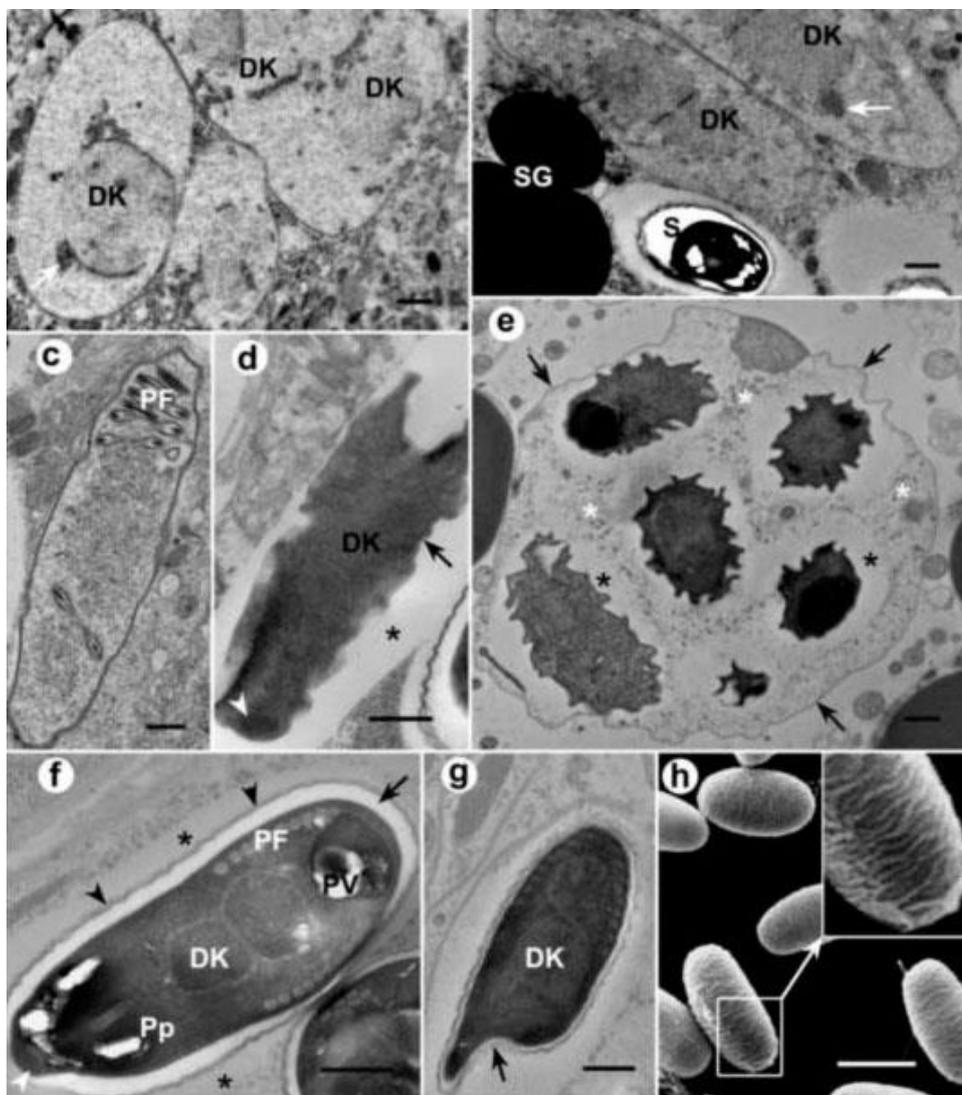
надёжными характеристиками для дифференциации видов этого рода. Например, вид *N. bombycis* заражает более 30 естественных и экспериментальных хозяев и широкий спектр тканей (Wang, 2012). Электронная микроскопия мало помогает с дифференциацией видов, выявляя весьма однотипную тонкую морфологию спор и стадий большинства изученных в настоящее время представителей рода *Nosema* (и близкого, а для ряда видов синонимичного рода *Vairimorpha*) (Canning et al., 1999a, b; Hopper et al., 2016; Maddox et al., 1999; Соколова, Исси, 1997; Соколова et al., 1988). Для многих видов родов *Nosema* и *Vairimorpha*, паразитирующих в Lepidoptera, включая и *N. disstriae*, характерны сходные черты ультраструктуры и особенности внутриклеточного паразитизма, такие как: наличие диплокариона во всех стадиях развития, развитие в прямом контакте с клеткой хозяина, ассоциация пролиферативных стадий с митохондриями клеток хозяина, трубчатые структуры на поверхности меронтов, наличие 4-ядерной стадии, предшествующей диспоровластической спорогонии, «звездчатые» споробласты (артефакт фиксации, отражающий изменения в проницаемости оболочки паразита) (Sokolova, Lange, 2002), а также формирование тонкостенных «ранних спор» в начале инфекции, предназначенных для автоинвазии. Ранние споры наблюдались у нескольких видов нозем (Maddox et al., 1999) – у *N. bombycis* (Iwano, Ishihara, 1991), *N. furnacalis* (Iwano, Kurtti, 1995) и *N. disstriae* (Kurtti et al., 1983). Применение молекулярной филогении, базирующейся на МСрДНК, показало, что ноземы, паразитирующие в чешуекрылых, принадлежат к двум сестринским группам (Baker et al., 1994) (Рис. 3-21). Первая группа, «true *Nosema* subgroup», включает *N. bombycis* – паразита шелкопряда *Bombyx mori*, наиболее изученного и экономически важного вида микроспоридий из Lepidoptera. Вторая группа, «*Vairimorpha* subgroup», включает вид *Vairimorpha necatrix* из непарного шелкопряда *Lymantria dispar*, характеризующегося, как и другие *Vairimorpha* spp., диморфным развитием с образованием диплокариотических спор «ноземного типа» в результате асексуального цикла, и толстостенных одноядерных «*Thelohania*-подобных» спор (октоспор), объединённых по 8 в спорофорных пузырьках, формирующихся в результате мейоза и полового процесса. Внутри первой группы выделяется большой кластер видов, родственных *Nosema bombycis*, который в дальнейшем мы будем называть клада *Nosema bombycis* (NbК), и которому относится *N. disstriae*. Кроме паразитов чешуекрылых, первая группа включает *N. granulosis* – вид, паразитирующий в ракообразных и имеющий отличную от нозем чешуекрылых морфологию спор (Terry et al., 1999).



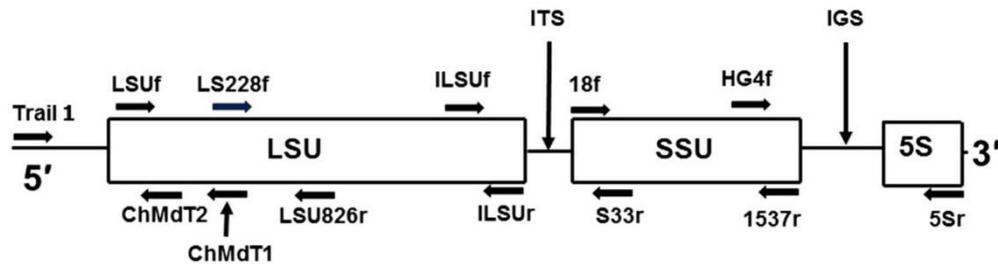
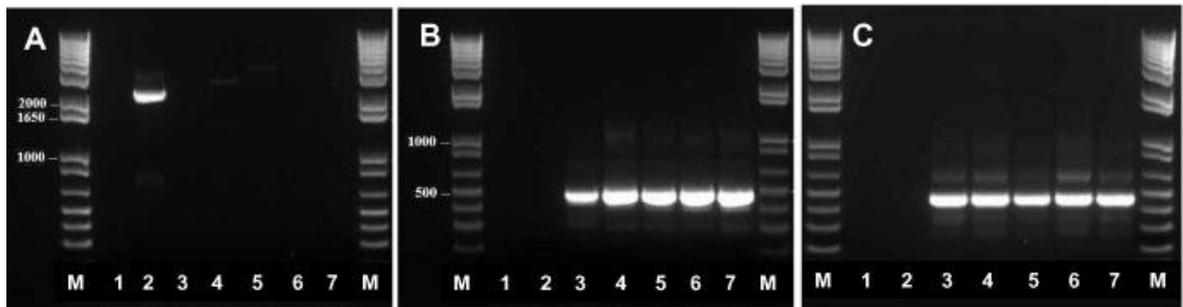
**Рисунок 3-15.** *Nosema disstriae*: световая микроскопия. (a) Споры на мазках заражённых гусениц, фиксированных метанолом и окрашенных по Гимза-Романовскому. (b) Живые споры в фазово-контрастном микроскопе. (c–i) 0.5 мкм-срезы, окрашенные метиленовым синим. (c) *N. disstriae* заражает различные ткани (белые стрелки): мышцы, кишечный эпителий, энциты и эпителий трахей. (d) Эпителий трахей со спорами и незначительное заражение эпителия средней кишки. Заражённые клетки указаны белыми стрелками. (e) Споры микроспоридий (белые стрелки) в трахеях. Черные стрелки указывают на выстрелившие споры. (f) Меронты, споронты и споры в эпителии среднего кишечника. (g) Энцит (белая стрелка), «нагруженный» стадиями микроспоридий. (h) Споры и меронты в мышцах: разрушенные фибриллы замещаются жировыми отложениями (стрелки). (i) Преспоровые стадии и споры в адипоците. Жировые гранулы указаны стрелками. Сокращения: FB, жировое тело; M, меронт; ME, эпителий средней кишки; MF, миофибриллы; Mu, мышцы; N, ядро; Oe, энцит; S, спора; Sp, споронт; Tr, трахея. Масштаб: a, b, e–i, 5 мкм; c-d, 20 мкм.

Вторая группа, подгруппа вэйриморф (*Vairimorpha* subgroup), включает паразитов Lepidoptera, Coleoptera и Hymenoptera, в том числе, хозяйственно важных паразитов пчел *N. apis* и *N. ceranae* (Baker et al., 1994; Guan et al., 2012; Hopper et al., 2016; Ironside, 2007; Kyei-Poku et al., 2008, 2012). Хорошей новостью для систематиков стало выявление инвертированной структуры РНК цистрона у видов клады *NbK* (и только у них из всех Terrosporidia) (Kyei-Poku et al., 2012). Выявление инвертированной структуры РНК-цистрона у *N. disstriae* (Рис. 3-17) с помощью специфичных праймеров (см. Главу 2) не оставила сомнений в принадлежности вида к *NbK*. Более детально филогенетические связи внутри *NbK* с помощью анализов, основанных на МСрДНК, разрешить невозможно, т.к. для этой группы характерно наличие множественных полиморфных копий РНК цистрона, разбросанных по всему геному, которые эволюционировали

независимо (Liu et al., 2008; O'Mahony et al., 2007; Tay et al., 2005). Генетические вариации между копиями РНК внутри одного генома зачастую превышают межпопуляционные и межвидовые различия, и применение МСрДНК в качестве генетического маркера родства малоэффективно.



**Рисунок 3-16.** Споргония *N. disstriae*: электронная микроскопия. (a, b) Делящиеся споронты в цитоплазме бокаловидной клетки эпителия средней кишки. Один споронт содержит 2 диплокариона. Стрелки указывают на тубуло-везикулярный кластер, аппарат Гольджи споронта. (c) Срез через споробласт, демонстрирующий увеличенную цистерну транс Гольджи – предшественника полярной трубки. (d) Споробласт на «звездчатой» стадии, окружённый электронно-прозрачной зоной (звёздочка). Белый наконечник указывает на якорный диск, чёрная стрелка – на тонкую оболочку споробласта, будущую экзоспору. (e) Спорофорный пузырь (СП) с шестью споронтами в поле зрения. Стрелки указывают на мембрану СП, чёрные звёздочки отмечают электронно-прозрачные зоны вокруг споробластов, белые звёздочки – тубулярный секрет внутри СП. (f) Зрелая спора. Чёрные стрелки указывают на толстую эндоспору, чёрные наконечники – на ундулирующую экзоспору, белый наконечник – на якорный диск, чёрные звёздочки маркируют электронно-прозрачную зону вокруг споры. (g) Спора с тонкой экзоспорой – «ранняя спора». Чёрная стрелка указывает на выемку на месте задней вакуоли, характерный признак «ранних спор». (h) Споры в сканирующем микроскопе. Вставка демонстрирует характерные гребни на поверхности спор, соответствующие ундулирующей экзоспоре. DK, диплокарион; PF, полярная трубка; Pp, полярoplast; PV, задняя вакуоль; S, спора; SG, секреторные гранулы. Масштаб: a–g, h, 2 мкм.



**Рисунок 3-17.** Определение последовательности субъединиц гена рРНК с помощью ПЦР. **Сверху:** ампликоны ПЦР в агарозном геле. **А.** Реакция с праймерами SS530F/580R, амплифицирующими типичный порядок генов РНК цистрона; **Б.** Реакция с праймерами ILSUF/S33R, амплифицирующие инвертированный порядок; **С.** Реакция с праймерами HG4f/5SR, инвертированный порядок. Дорожки: 1. Нет ДНК (контроль); 2. *Nosema thomsoni* (член *Nosema-Vairimprpha* клады с типичной организацией РНК цистрона); 3. *Nosema* sp. FCWex *Dioryctria abietivorella*; 4. *N. disstriae*; 5. *N. fumiferanae*; 6. *Nosema* sp. CO ex *Choristoneura occidentalis*, 7. *Nosema* CPP ex *C. pinus* (члены *N. bombycis* клады). **Внизу:** схема организации рРНКцистрона *Nosema* spp. группы *Nosema bombycis* и праймеры для ПЦР (см. список праймеров в Главе 2).

Дерево, изображённое на Рисунке ПЗ-4, хорошо демонстрирует неспособность этого маркера МСрДНК разрешить родственные связи в *NbК*. Использование 2-х других рибосомальных генов (БСрДНК и ITS, внутренний транскрибируемый спэйсер) лишь незначительно улучшает разрешение анализа. В дополнение к трём рибосомальным генам, мы воспользовались геном RPB1 (DNA-directed RNA polymerase II subunit). Этот однокопийный ген, демонстрирующий большее генетическое разнообразие (полиморфизм) по сравнению с консервативными рибосомальными генами, давно предложен в качестве альтернативного филогенетического маркера микроспоридий (Cheney et al., 2001) и продемонстрировал хорошие результаты для разрешения филогенетических связей внутри клад «*Vairimorpha* subgroup» (Ironsides, 2007). В нашем исследовании анализы, основанные на сиквенсах гена RPB1, а также на конкатенированных RPB1+ МСрДНК+ ЛСрДНК + ITS последовательностях, давали более высокое разрешение и лучшие статистические поддержки ветвей (Рис. ПЗ-5). Во-первых, RPB1- и мультигенные анализы позволили уверенно отделить собственно *NbК*, состоящую целиком из паразитов чешуекрылых (за исключением одного вида *Nosema* sp. PA из *Phyllobrotica armata* (Coleoptera, Chrysomelidae)), от паразитов ракообразных,

*N. granulosis* и *N. cheracis*, и от *N. empocapsae*, и структурировать саму NbК кладу. Во-вторых, оказалось, что *N. disstriae* группируется с *N. antheraeae*, паразитом дубового шелкопряда, и что эти два вида образуют базальную ветвь клады. Базальное положение этой дихотомии и, на первый взгляд, неожиданная группировка видов из неблизкородственных чешуекрылых хорошо соответствует сходству жизненных циклов, которые у обоих видов включают анцестральный признак – продукцию октоспор, свидетельствующих о наличии полового процесса и мейоза. Следует отметить, что синоним *N. antheraeae* в русскоязычной литературе *Vairimorpha antheraeae* (Ефименко и др., 1990), что отражает факт продуцирования этим видом *Thelohania*-подобных одноядерных спор при определённых условиях. У *N. disstriae* наличие октоспор известно из литературных источников (Nordin, 1975; Nordin, Maddox, 1974), и мы также зафиксировали один спорофорный пузырек при ЭМ исследовании (Рис. 3-16). Не известно, продуцируют ли этот вид функциональные октоспоры или же имеет место незавершённая («абортивная») октоспорогония, как у микроспоридии *Vairimorpha imperfecta* (Canning et al., 1999a, b; Canning, Vávra, 2000). *V. imperfecta* также относится к NbК, и в МСрДНК филогениях (другие гены для этого вида в Генбанке отсутствуют) располагается базально по отношению к остальной части клады (Рис. ПЗ-4). Ранняя дивегенция видов NbК с октоспоровой спорогонией хорошо подтверждает гипотезу о том, что сложные жизненные циклы со сменой сексуальной и асексуальной фаз представляют собой анцестральный признак, и что «асексуальные» виды эволюционировали из «сексуальных» (Vossbrinck et al., 2004; Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005) неоднократно и независимо в разных кладах Microsporidia. Ранее считалось, что в кладе *Nosema-Vairimorpha* (“true *Nosema*” + “*Vairimorpha* subgroup”), асексуальные ветви возникали как минимум дважды на базе сексуальных предковых форм: в точке расхождения *N. apis* от ветви *V. nectarix*, характеризующейся диморфным развитием, и в точке расхождения группы *N. bombycis* от *V. imperfecta* (Ironsides, 2007). Присутствие октоспоровой спорогонии в ветви *N. disstriae-V. antheraeae* говорит о том, что выпадение сексуальной фазы происходило неоднократно (как минимум дважды) в процессе диверсификации NbК. Следует отметить, что октоспоровая спорогония не является регулярной частью жизненных циклов *V. imperfecta*, *N. antheraeae* и *N. disstriae*. У *V. imperfecta* половая часть цикла считается «абортивной» и не приводящей к формированию функциональных спор (Canning et al., 1999a). У *V. antheraeae* формирование октоспор – крайне редкое явление (И.В. Исси, личное сообщение), а у *N. disstriae* половая часть цикла также редка и, возможно, абортивна. Одним словом, эти виды уже довольно далеко зашли на пути перехода от анцестрального признака –

диморфного жизненного цикла с формированием октоспор к продвинутому мономорфному асексуальному развитию, характерному для большинства современных нозем. Впрочем, высока вероятность, что во многих видах *NbK* сексуальная часть цикла также не полностью исчезла, а просто еще не обнаружена. Октоспоровая спорогония может быть редким и скрытым событием, происходящим в определенных тканях, в альтернативных хозяевах и при экстремальных условиях среды, учитывая тот факт, что у облигатно полиморфных микроспоридий толстостенные октоспоры функционируют как стадия для переживания во внешней среде (Ironsides, 2007; Pilley, 1976; Sokolova, Fuxa, 2008). Интересно, что *N. mesnili*, паразит капустной белянки *Pieris brassicae*, в северной части своего ареала (Северо-Запад России) формирует октоспоры один раз в 4 года в августе-сентябре перед зимней диапаузой хозяина на пике эпизоотии (Sokolova, Entzeroth, 1995; Исси, 1986; Соколова, Исси, 1997). К сожалению, молекулярные данные по *N. mesnili* отсутствуют, но вероятность размещения этого вида в *NbK* довольно высока, судя по морфологии, ультраструктуре и тканевой специфичности. Ironsides (2007) предположил, что селективная эволюция, приводящая к потере мейоза и полового процесса у микроспоридий, направлена не против полового процесса, который практически всегда выгоден для вида в долгосрочной перспективе, а против энергетически затратной продукции толстостенных октоспор. Для представителей *NbK* как раз характерны пути передачи инфекции, которые минимизируют нахождение спор во внешней среде и делают формирование октоспор излишним. Например, у многих видов, в т.ч. и у *N. disstriae* (Kurtti et al., 1983) регулярно наблюдается трансвариальная передача, а также горизонтальная передача инфекции с помощью перепончатокрылых паразитоидов. (Andreadis, 1980, 1986; Brooks, 1968; Canning et al., 1999a; Johnny et al., 2006; Siegel et al., 1986; Solter et al., 1991; Wang, 2012; Yefimenko и др., 1990).

Основным результатом нашей работы по сравнительной филогении и ультраструктуре микроспоридии из кольчатого шелкопряда вкупе с анализом литературных данных стало упорядочение таксономии *NbK* клады (Таблица 3-3). Большая часть многочисленных *Nosema* spp. из чешуекрылых (Sprague, 1977b; Исси, 1986), возможно, принадлежит к *NbK*. Однако в настоящее время молекулярная филогения подтверждает принадлежность к этой группе только 13 видов, включая *N. disstriae* (Table 1A). Эта клада также включает 11 формально неописанных видов, генетически близких к *N. bombycis*, не изученных или слабо изученных морфологически и известных только по сиквенсам в Генбанке. Мы предложили считать их подвидами *N. bombycis* до тех пор, пока они не будут описаны как независимые виды или подвиды другого вида.

**Таблица 3-3. А. Виды микроспоридий клады *Nosema bombycis* (Куйе-Поку, Sokolova, 2017)**

| Виды, авторы (ареал)   | Номер в Генбанке Сходство сиквенса с <i>N. bombycis</i> (%) |                               | Первичный хозяин   | Ткани <sup>1</sup>            | СМ: размер, мкм; тип спорогонии            | ЭМ: число витков ПТ; др.    | Литература  |
|--|---|-------------------------------|--|-------------------------------|--|-----------------------------|---|
|  | МСрПНК  | RBP1                          |  |                               |  |                             |   |
| <i>Nosema bombycis</i> Naegeli 1857 (Asia, Europe)                     | L39111, 100%<br>AB093009, 98.7%                             | DQ996231 100%<br>JX213754 98% | <i>Bombyx mori</i> (Bombycidae)  | Киш, шелк, ген                | 3-4x1.5-2; спорог-2, рс/пс                 | 10-12, пс; 3-5, рс; вня; тс | Ishihara, 1969<br>Iwano, Ishihara, 1991<br>Takizava et al., 1973<br>Wang, 2012      |
| <i>N. antheraeae</i> Simchuk, Lysenko, Chetkarova 1979 (China, Russia) | EU864526, 99,3%*<br>DQ073396, 99,1%                         | HQ215550 92,6%                | <i>Antheraea pernyi</i> (Saturniidae)  | Киш, гем, жт, гон             | 3-4x1.5-2; спорог-2, 8                     | 9-11; вня; тс;              | Simchuk et al., 1979;<br>Ефименко и др., 1990; Wang et al., 2006                    |
| <i>N. disstriae</i> (Thomson, 1959) (North Ontario, Canada; USA)       | EU219085, 99.4%   | HQ457438, 92.8 %              | <i>Malacosoma disstria</i> (Lasiocampidae)   | Киш, трах, мыш, ген           | 4.3x2.2<br>3.9-4.7x1.7-2.4; спорог-2,8     | 9-12 тс                     | Thomson, 1959<br>Nordin, 1975<br>Куйе-Поку et al., 2008; 2011                       |
| <i>N. fumiferanae</i> (Thomson 1955) (Canada)                          | EU219083 99.3 %   | HQ457435, 92.4 %              | <i>Choristoneura fumiferana</i> (Tortricidae)  | Киш, малъп, ген               | 3.8x1.9; спорог-2                          | 11-15                       | Thomson, 1955;<br>Percy, 1973; Куйе-Поку et al., 2008;<br>Hopper et al. 2015        |
| <i>N. furnacalis</i> Wen, Sun 1988 (Asia)                              | U26532 97.6 %   | Нет данных                    | <i>Ostrinia furnacalis</i> (Crambidae)   | Шелк                          | 3.4x2.0 (2.9-4.0x1.9-2.4); спорог-2, рс/пс | 8-12, пс 3-5, рс            | Iwano, Kurtti, 1995<br>Fries et al., 1996   |
| <i>N. heliothidis</i> Lutz, Splendore, 1904 (Americas, Eurasia)        | FJ772435 99.5 %   | Нет данных                    | <i>Helioverpa armigera</i> (Noctuidae);<br><i>Parasitoids</i> (Hymenoptera)              | Киш, сл, ттрах, мыш, гон, ген | 2.5-6.6x1.7-3.5 2 sporog                   | Нет данных                  | Sprague, 1977;<br>Dong et al., 2011   |
| <i>N. pyrausta</i> (Paillot, 1927) (North America, Europe)             | AY958071, 99.4 %  | Нет данных                    | <i>Ostrinia nubilalis</i> (Crambidae);<br><i>Parasitoids</i> (Hymenoptera)               | Киш, жт, ген                  | 3.5-6x1.8-3 (4.7x2.6); спорог-2            | 10-12                       | Sprague, 1977<br>Andreadis, 1980<br>Tokarev et al., 2015                            |
| <i>N. spodopterae</i> Hsu, Hsu, Yen, 1992 (Taiwan)                     | AY211392, 99.5 %  | DQ666959, 97.5 %              | <i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)   | No data                       | 4.0x1.9                                    | Нет данных                  | Hsu, Hsu, Yen, 1992<br>Tsai et al., 2005  |
| <i>N. trichoplusia</i> Tanabe, Tamashiro 1967 (Japan)                  | U09282, 99.5 %  | DQ996234, 98.0 %              | <i>Trichoplusia ni</i><br><i>Hyphantria cunea</i> (Arctiidae)                            | Киш, гем, ген                 | 3-4x2 (3.6x2.0); спорог-2                  | Нет данных                  | Tanabe, Tamashiro, 1967;<br>Sprague 1977;<br>Pieniazek et al, 1996; Ironside, 2006. |
| <i>N. tyriae</i> Canning, Curry, Cheney et al., 1999 (England)         | AJ012606, 99.4 %  | AJ278948, 97.2%               | <i>Tyria jacobaeae</i> (Erebidae)  | Киш, шелк, жт, ген            | 4.7 x 2; спорог-2                          | 10-15; тс                   | Canning et al., 1999<br>Philogéne, Massalski, 1977                                  |
| <i>N. mesnili</i> <sup>2</sup> Paillot 1918 (China, Russia)            | Нет данных  |                               | <i>Pieris brassicae</i> , <i>P. rapae</i> (Pieridae)<br><i>Parasitoids</i> (Hymenoptera) | Сл, киш, жт, гем              | 3-4x1.5-2; спорог-2,8                      | 11-12 тс                    | Sprague, 1977;<br>Соколова и др., 1988; Соколова, Исси, 1997;<br>Cheung, Wang, 1995 |
| <i>V. imperfecta</i> Canning, Curry, Cheney et al., 1999 (Malaysia)    | AJ131645, 99.6%<br>AJ131646 99.4%                           | Нет данных                    | <i>Plutella xylostella</i> (Plutellidae)   | Киш, жт, ген                  | 4.3x2.0; спорог-2,8                        | 15                          | Canning et al., 1999  |

Таблица 3-3. Б. Неописанные виды клады *Nosema bombycis*\*

| Виды<br>[Имя в<br>оригинальной<br>публикации]<br>авторы<br>(ареал)  | Номер в Генбанке<br>Сходство сиквенса<br>с<br><i>N. bombycis</i> (%) |                    | Первичный<br>хозяин   | Ткани <sup>1</sup>           | СМ:<br>размер,<br>мкм;<br>тип<br>спорогон<br>ии | ЭМ:<br>число<br>витков<br>ПТ; др. | Литерат<br>ура                                 |
|---|--|--------------------|---|------------------------------|---|-----------------------------------|--|
|   | МСрPHK   | RBP1               |   |                              |   |                                   |  |
| <i>N. bombycis armata</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. PA]<br>(China)   | EU864528<br>99.4%  | KJ728831<br>100%   | <i>Phyllobrotica armata</i> (Coleoptera, Chrysomelidae)               | Шелк, киш, мыш, жт, гон, ген | 4.7x2.6   | 13-14                             | Zhu et al., 2011                               |
| <i>N. bombycis atrilineata</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. HA]<br>(China)                                      | EU864527,<br>99.3 %  | Нет данных         | <i>Hemerophila atrilineata</i> (Geometrida)                           | Нет данных                   | Нет данных                                      | Нет данных                        | Liu et al., 2012                               |
| <i>N. bombycis blanda</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. ex <i>Eurema blanda</i> ]<br>(Taiwan)                    | EU338534<br>99.0%  | Нет данных         | <i>Eurema blanda arsakia</i> (Pieridae)<br><i>L.dispar</i> cell lines | Нет данных                   | Нет данных<br>(2.7x1.2 на срезах)               | 12<br>Вня,тс                      | Tsai et al., 2009                              |
| <i>N. bombycis cynthia</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. SC /<br>“ <i>Nosema philosamia</i> ”]<br>(India, China) | FJ767862<br>99.5%  | Нет данных         | <i>Philosamia cynthia ricini</i> (Saturniidae)                        | Нет данных                   | 4.1x2.2   | Нет данных                        | Talukdar 1961<br>Zhu et al., 2010<br>Xie, 1989 |
| <i>N. bombycis litura</i> Ind.<br>[ <i>Nosema</i> sp. NSD],<br>(India)                                    | DQ323510<br>99.5%  | Нет данных         | <i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)                                  | Жт                           | 3.8-4x1.8-2<br>(3.9x1.9)                        | Нет данных                        | Johny et al., 2006                             |
| <i>N. bombycis litura</i> Jap.<br>[ <i>Nosema</i> sp.]<br>(Japan)   | No data  | Нет данных         | <i>Spodoptera litura</i> (Noctuidae)                                  | Жт, нерв, киш, мыш           | 3.0-4.5 x<br>1.7x2.2<br>(3.6x 2)                | Нет данных                        | Watanabe, 1976                                 |
| <i>N. bombycis machaon</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. PM1]<br>(China)   | KM190863<br>99.5%  | KM207665<br>98.0 % | <i>Papilio machaon</i> (Papilionidae)                                 | Киш, жт, ген                 | 3.2x2.0   | 10-13                             | Liu et al. 2015                                |
| <i>N. bombycisoccidentalis</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. CO ]<br>(Canada)                                    | EU219084,<br>99.2%   | HQ457436<br>92.1 % | <i>Choristoneura occidentalis</i> (Tortricidae)                       | Нет данных                   | No data   | Нет данных                        | Kyei-Poku et al., 2008, 2011                   |
| <i>N. bombycispinus</i> [ <i>Nosema</i> sp. CPP] (Canada)   | EU219082,<br>99.4 %  | HQ457437<br>92.4%  | <i>Choristoneura pinus</i> (Tortricidae)                              | Нет данных                   | No data   | Нет данных                        | Kyei-Poku et al., 2008, 2011                   |
| <i>N. bombycis rhodopae</i><br>[ <i>Nosema</i> sp. HR]<br>(China)   | KP100640<br>99.5%  | Нет данных         | <i>Histia rhodopae</i> (Zygaenidae)                                   | Шелк, киш, жт, мыш, ген      | 3.1x1.9   | 14-15                             | Liu et al., 2015                               |
| <i>N. bombycis stipatana</i><br>[“ <i>Vairimorpha ceraces</i> ”]<br>(China)                               | EU267796<br>99.2 %   | Нет данных         | <i>Cerace stipatana</i> (Tortricidae)                                 | Нет данных                   | 3.1x1.9<br>спорог-2, 8                          | 14-15                             | Ma et al., 2008                                |
| <i>N. bombycis xylostella</i> 1<br>[ <i>Nosema</i> sp. PX1]<br>(China)                                    | AY960986<br>99.5%  | DQ083405<br>99.3%  | <i>Plutella xylostella</i> (Plutellidae)                              | Нет данных                   | Нет данных                                      | Нет данных                        | Ku et al., 2007<br>Tsai et al. 2003            |
| <i>N. bombycis xylostella</i> 2<br>[ <i>Nosema</i> sp. PX2, « <i>N. plutellae</i> »]<br>(Taiwan)          | AY960987<br>99.0%  | DQ083406<br>97.7%  | <i>Plutella xylostella</i> (Plutellidae)                              | Нет данных                   | 4.0x1.9   | Нет данных                        | Ku et al., 2007<br>Tsai et al., 2009           |

\*Эти таксоны классифицированы здесь как подвиды *N. Bombycis*.

<sup>1</sup>ткани, отмеченные как основное место локализации выделены жирным шрифтом; <sup>2</sup>*N. mesnili* предварительно отнесена к *NbK* на основании морфологического сходства.

Виды, хорошо изученные (ЭМ), залиты тёмно-серым, недостаточно изученные в ЭМ – светло-серым, неизученные – не залиты. **Сокращения:** вня, развитие внутри ядра; гем, в гемоцитах; ген, генерализованная инфекция; гон, гонады; жт, жировое тело; киш, в кишечнике, Мальп, в Мальпигиевых сосудах; мыш, мышцы; нерв, ткани нервной системы; ПТ, полярная трубка; рс/пс, ранние и поздние споры; сл, слюнных железах; СМ, световая микроскопия; спорог-2, диспоробластическая спорогония: формируются изолированные диплокариотические споры; спорог-8, октоспоровая спорогония: формируется октет одноядерных спор; трах, трахеи; тс, трубчатые структуры на плазмалемме/оболочке пролиферативных стадиях; шелк., шелковые железы; ЭМ, электронная микроскопия.

Кроме того, автором выделены следующие характеристики, позволившие *NbK* стать одной из самых процветающих групп наземных микроспоридий. 1. Широкое распространение альтернативных путей передачи инфекции способствует уменьшению роли рискованного перорального пути, а также ведет к переживанию неблагоприятных условий внешней среды. Транссексуальная, особенно трансвариальная, трансмиссия, кроме того, обеспечивает постоянное присутствие паразита в популяции хозяина и понижает риск её перезаражения. 2. Биохимические адаптации к широкой тканевой специфичности, обычной среди всех представителей *NbK*, обеспечивают успешность заселения хозяина независимо от места первоначального заражения (portal of entry). Побочным эффектом широкой тканевой специфичности стала, возможно, способность развиваться в ядре клетки хозяина, наблюдаемая у многих видов этой группы (Maddox et al., 1999; Takizawa et al., 1973; Tsai et al., 2009; Ефименко и др., 1990), необычная для микроспоридий за пределами сем. Enterocytozoonidae (Sprague et al., 1992; Stentiford, Dunn, 2014). 3. Формирование тонкостенных «ранних» спор с короткими полярными филаментами на начальных этапах заражения обеспечивают быстрое распространение и заселение хозяина за счет автоинвазии.

В заключение необходимо отметить, что *NbK* включает в себя многочисленные близкородственные формы, находящиеся на разных стадиях видообразования и представляющие собой идеальную естественную модель для изучения диверсификации (образования новых форм), внутри- и межвидового полиморфизма и ко-эволюции паразито-хозяинных отношений.

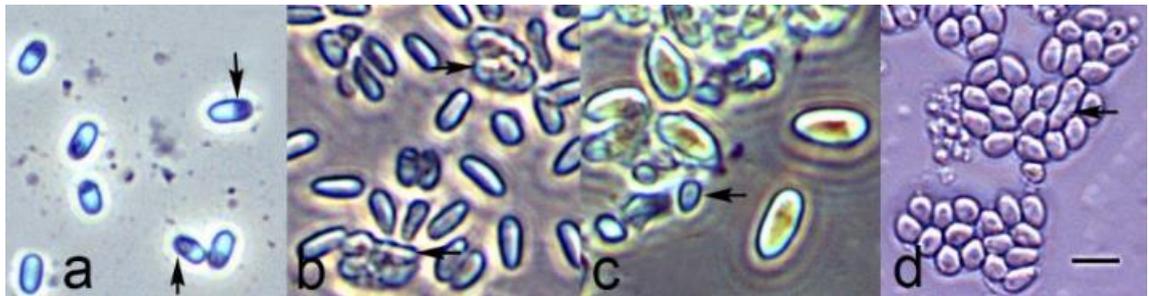
#### 3.3.4 Сложный жизненный цикл микроспоридии *Kneallhazia solenopsae*, адаптированный к паразитизму в колонии общественных насекомых

Изучение микроспоридии *Kneallhazia (Thelohania) solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* в лаборатории Джима Фуксы, известного патолога насекомых, стало одним из интереснейших разделов диссертационной работы. Огненные муравьи были случайно интродуцированы из Аргентины в США, а позднее и в другие страны с тропическим и субтропическим климатом (Австралию, страны ЮВ Азии). Благодаря агрессивной жизненной стратегии, организации колоний и отсутствию естественных врагов и болезней, они вытесняют местные виды, распространяются с устрашающей скоростью по местообитаниям с нарушенными биоценозами и становятся настоящей проблемой на «захваченных» ими территориях. Основными задачами исследований автора стали оценка роли микроспоридий в контроле численности муравьёв и определение потенциальной возможности использования микроспоридий в качестве биопестицидов, а также выработка экспресс-методов оценки заражённости

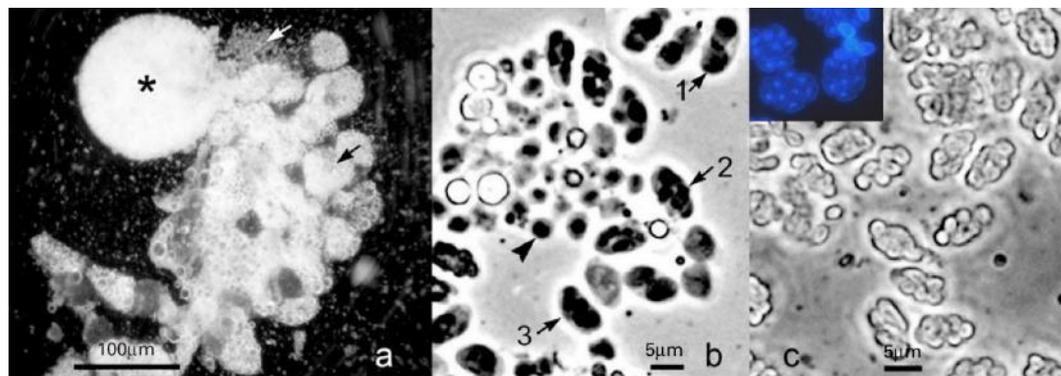
колоний, изучение жизненного цикла, путей передачи инфекции и распределения инфекции по штату Луизиана.

Жизненный цикл этой микроспоридии ранее не был изучен и оказался столь же сложным, как организация колонии муравьёв. Он включает четыре типа развития, в результате которых в спорогониях регулярно формируется 4 морфологически различных типа спор, а также, нерегулярно, тератоспоры (Рис. 3-18) (Sokolova, Fuxa, 2008).

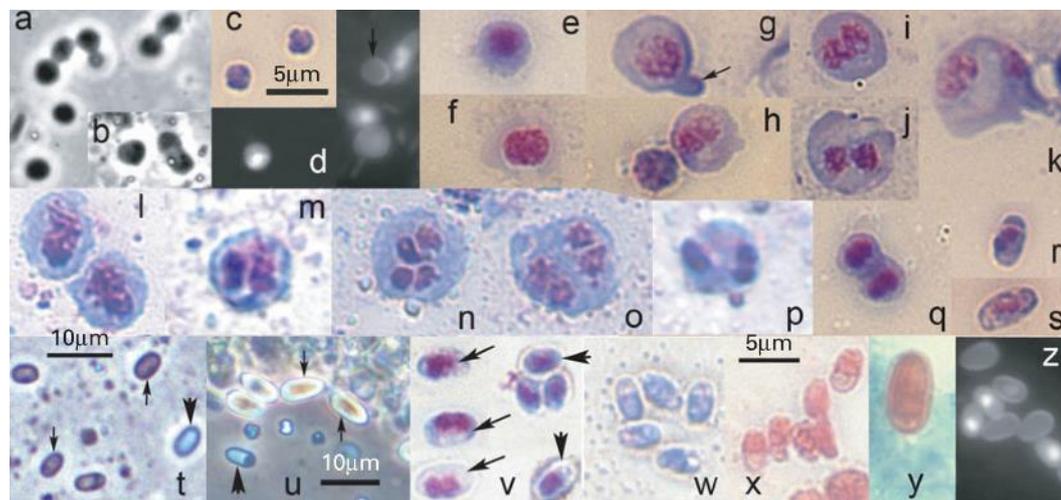
**А**



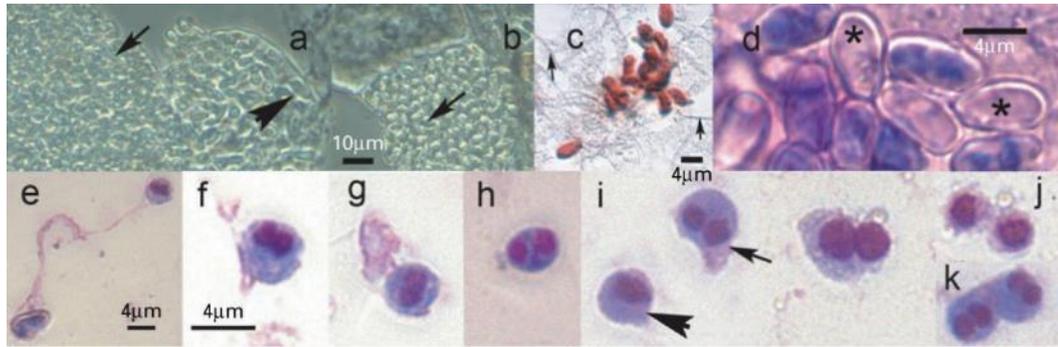
**Б**



**С**



Д



**Рисунок 3-18.** Световая микроскопия стадий жизненного цикла *Kneallhazia solenopsae*. **А.** Четыре вида спор, фазовый контраст. (а) ДК споры первого типа (ДКС1) с заметной задней вакуолью (стрелка). (б) ДК споры второго типа (ДКС2) и спорофорные пузырьки (СП) с октоспорами (стрелки). (с) Мегаспоры и октоспоры (стрелка). (d) Октоспоры. Стрелка указывает на тератоспору – результат дефекта последнего пост-мейотического деления. **Б.** Свежий мазок жирового тела из заражённой рабочей особи (minor worker) *Solenopsis invicta* под бинокуляром (а), в фазово-контрастный микроскоп при 400X (b-c) и во флуоресцентный после окраски Калькофлором и ДАПИ (с, вставка). (а) Незаражённые адипоциты указаны чёрной стрелкой; заражённая гипертрофированная клетка, превратившаяся в «цисту», помечена звёздочкой; многочисленные СП, высвободившиеся из «цисты» – белой стрелкой. (б) Стадии спорогонии: однаядерная меронт/споронт переходная стадия со слившимися ядрами ДК в процессе мейоза, и клетки – продукты 3-х последовательных пост-мейотических делений – 2-ядерные клетки (1, первое деление), 4-ядерные клетки (2, второе деление), 8-ядерные (3, третье деление), и СП с 8 споробластами. (с) Октеты октоспор, высвободившиеся из цист. **С.** Стадии *K. solenopsae*, развивающиеся в личинках 4 возраста и в куколках. (a-d) Однаядерные мелкие клетки, предположительно гаметы. На окрашенных ДАПИ препаратах видно, что одна из клеток пары лишена ядра. (e–g) Однаядерная клетка с крупным ядром, предполагаемый продукт слияния 2-х гаплоидных ядер. Стрелка указывает на аппендикс, характерную черту этой стадии (остаток 2-й гаметы?). (h–j) Диссоциация ядер. (k–d) Обособление ядер и цитокinesis с формированием 2-х диплокариотических меронтов. (m–q) 4-х ядерные споронты в личинках и (n–p) в куколках. (r-s) Споробласты ДКС1 типа развития. (t) Автоинвазия в жировом теле куколки: выстрелившие споры указаны стрелкой, интактные – наконечником. (u) Мегаспоры (стрелка) и ДКС1 (наконечник) в жировом теле куколок. (v) ДКС1 (наконечник) и споробласты (стрелка). (w–x) ДКС1. (y) Мегаспора. (z) Октоспоры, (a, b, t, u) фазовый контраст; (d, z) окраска ДАПИ нефиксированных препаратов. (e–s, v, w) окраска Гимза-Романовским и (x, y) трихромом препаратов, фиксированных метанолом. Масштаб для a–s, v–z показан на с и x. **Д.** Заражение в королевах (=оплодотворенных бескрылых самках). (а) Мазок жирового тела: две прилежащие друг к другу клетки заполнены: одна – октоспорами (стрелка), другая – мегаспорами (наконечник). (б) Овариолы заполнены мегаспорами (стрелка). (с) Группа мегаспор, окружённая сперматозоидами (стрелки) на мазке яичника. (d) Пустые (выстрелившие) (наконечник) и интактные споры. (e) Мегаспора с выброшенной спороплазмой. (f-g) Двухядерные спороплазмы. (h) Ранняя стадия с диссоциированными ядрами. (i) Стадии, наблюдаемые на мазках яичников: однаядерные клетки, наконечник; 2-ядерная стадия, стрелка; и клетка с двумя ядрами в процессе деления. (j) Две однаядерные клетки. (k) Две клетки с диплокарионами. (a-b) фазовый контраст; (с) окраска Трихромоми; (e–k) окраска по Гимза-Романовскому.

Принадлежность всех этих четырёх типов спор к одному виду доказана автором с помощью лазерной микродиссекции индивидуальных спор, выделения из них ДНК и сравнения продуктов амплификации участков рибосомального гена (Sokolova et al., 2003b, 2004b) (Рис. 2-1, Глава 2).

**Таблица 3-4.** Распределение типов спор *Kneallhazia solenopsae* между кастами и стадиями жизненного цикла муравьев, собранных из 3-х заражённых колоний (на основании окраски мазков Трихромом.<sup>1</sup>

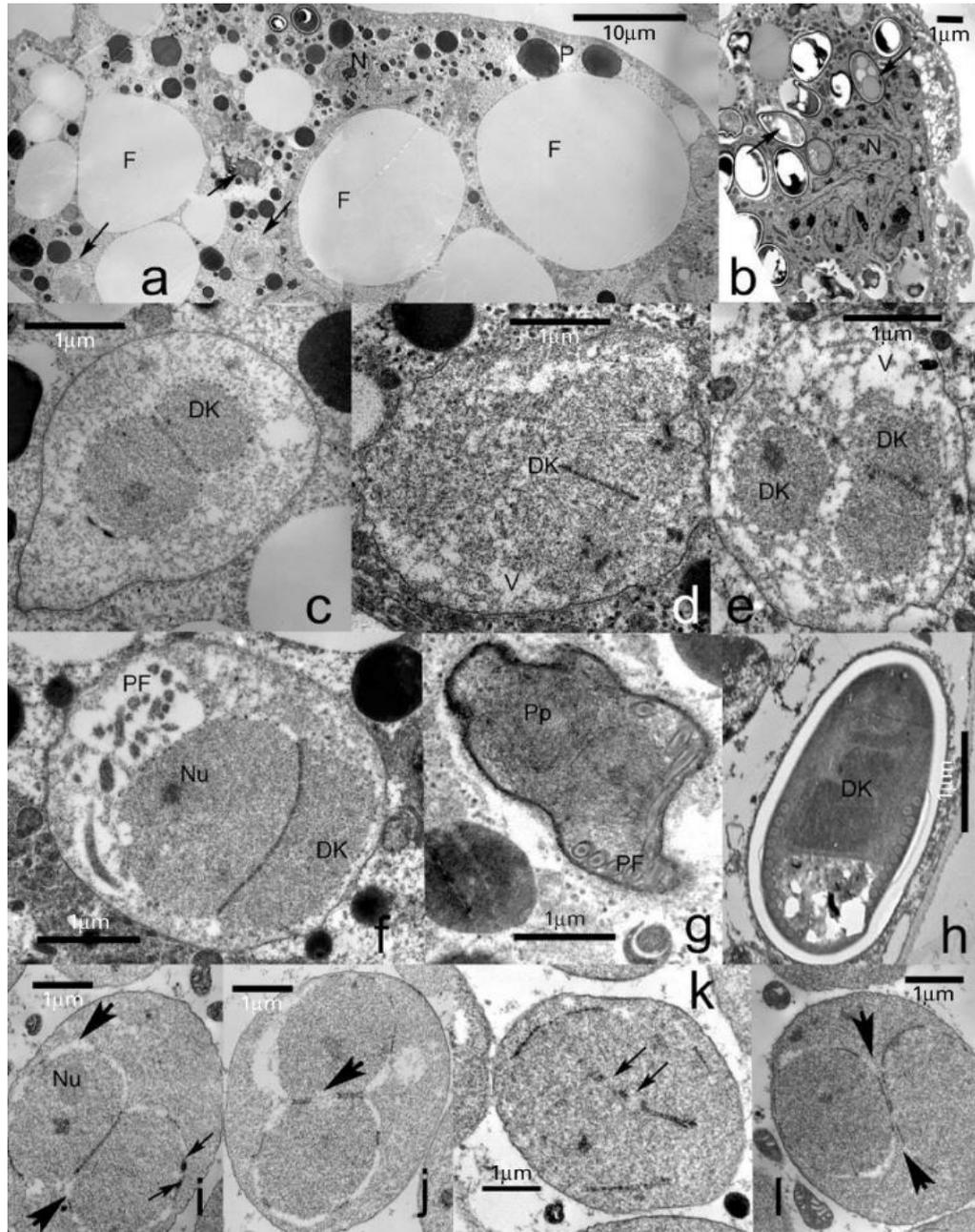
| Тип спор          | % заражения (n) <sup>2</sup> |                    |                     |                    |
|-------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                   | имаго<br>(бескрылые самки)   | имаго<br>(рабочие) | личинки IV          | куколки            |
| <b>октоспоры</b>  | 75.6 (50) abc                | 98.6 (78) a        | 0.0 (0) d           | <b>8.8 (2)d</b>    |
| <b>мегаспоры</b>  | 90.6 (58) ab                 | 29.5 (24) cd       | 68.0 (17) abc       | <b>91.7 (26)ab</b> |
| <b>ДК споры 1</b> | 37.6 (24) bcd                | 41.4 (32) bcd      | 0.0 (0) d           | <b>0.0 (0) d</b>   |
| <b>ДК споры 1</b> | <b>0.0 (0) d</b>             | <b>0.0 (0) d</b>   | <b>67.7 (17) ab</b> | <b>100.0(29)a</b>  |

<sup>1</sup> Было просмотрено 413 насекомых, 198 из которых были заражены, как правило, более чем одним типом спор.<sup>2</sup>Средние, за которыми следуют одинаковые буквы, не отличаются при  $P < 0.05$ . Тест Туки (TukeyHSDtest).

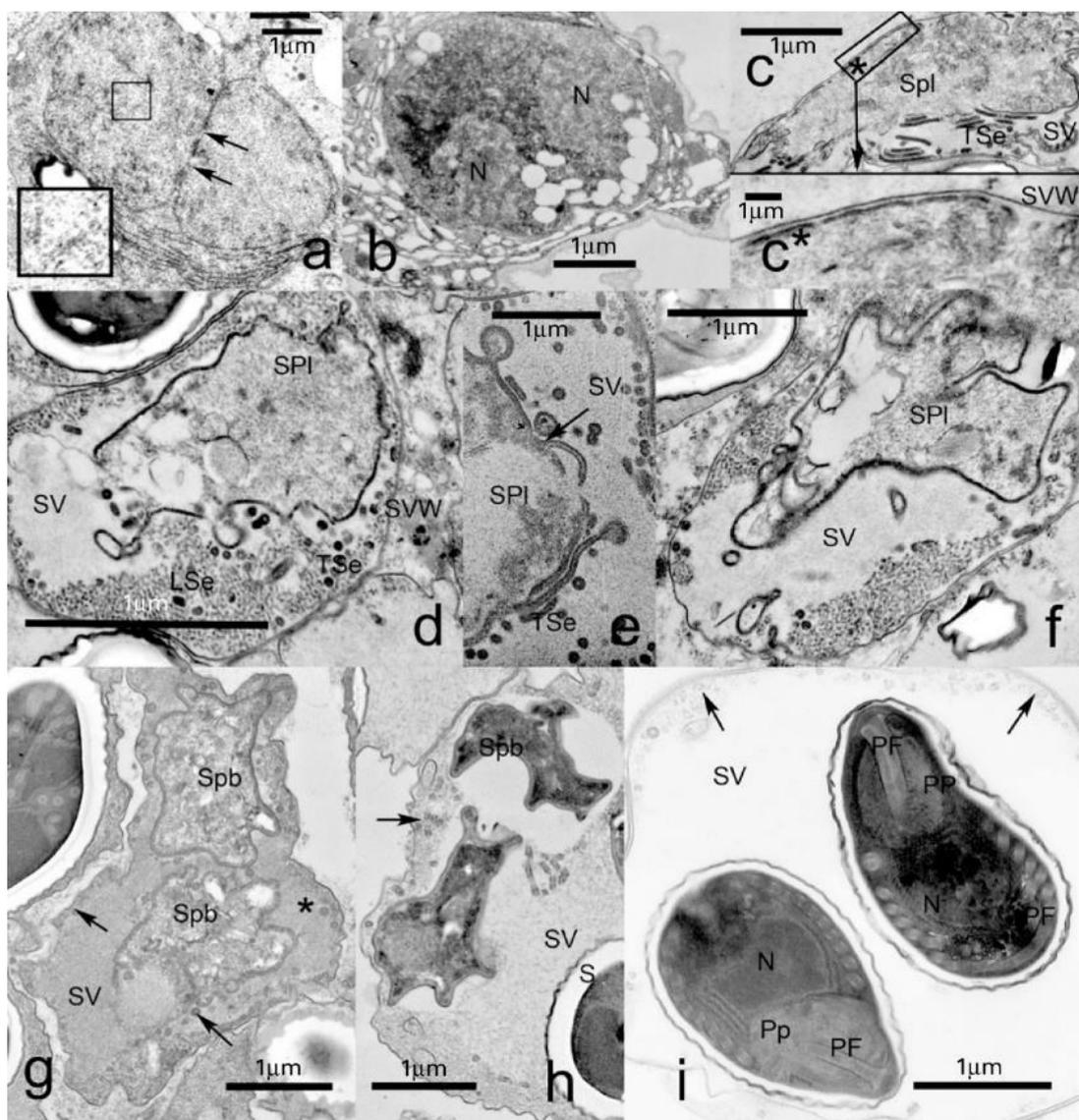
Изучена морфология и ультраструктура стадий, меро- и спорогонии, всех типов спор<sup>11</sup>, а также их локализация в различных тканях и членах колонии (Рис. 3-18–3-22, Табл. 3-4). Диплокариотические споры первого типа (ДКС1) развиваются только в личинках IV возраста и куколках. Это овальные тонкостенные споры с большими задними вакуолями и короткими изофилярными полярными трубками с 3-4 витками. Размеры живых спор  $4.5 \pm 0.10 \times 2.3 \pm 0.05$  мкм ( $n=50$ ), фиксированных метанолом –  $3.9 \pm 0.33 \times 2.0 \pm 0.24$  ( $n=50$ ) (Рис. 3-18), данные ЭМ (по Shapiro et al., 2003). Второй тип развития реализуется в жировом теле имаго всех каст. ДК стадии развиваются в прямом контакте с цитоплазмой адипоцита. ДК споры второго типа (ДКС2) формируются в диспоробластической спорогонии. Размеры живых ДКС2 –  $4.93 \pm 0.58 \times 1.85 \pm 0.16$  мкм ( $n=50$ ), фиксированных –  $4.6 \pm 0.29 \times 2.3 \pm 0.20$  мкм ( $n=50$ ). Изофилярная полярная трубка образует 11-13 витков, уложенных в один ряд, оболочка спор – относительно тонкая ( $0.13 \pm 0.045$  мкм), с гладкой экзоспорой ( $0.04 \pm 0.014$  мкм) (Рис. 3-18, 3-19). Эти два типа спор, ДКС1 и ДКС2, легко выстреливают полярные трубки в тканях и на стеклах. Третий тип развития заканчивается формированием мегаспор, а четвертый – одноядерных толстостенных октоспор. Грушевидные одноядерные октоспоры заключены в слегка вытянутые спорофорные пузырьки длиной примерно 9 мкм, по 8 спор в каждом (Рис. 3-18, 3-20). Они встречаются во всех кастах имаго, но преобладают у рабочих муравьёв и никогда не развиваются в личинках. Размер живых октоспор  $3.32 \pm 0.48 \times 1.95 \pm 0.20$  мкм ( $n=100$ ), фиксированных  $3.1 \pm 0.38 \times 2.1 \pm 0.23$  мкм ( $n=100$ ). Ультраструктурный анализ этого типа спор выявляет изофилярную полярную трубку, 9-

<sup>11</sup> Электронная микроскопия спор, развивающихся в личинках, изучена ранее (Shapiro et al., 2003).

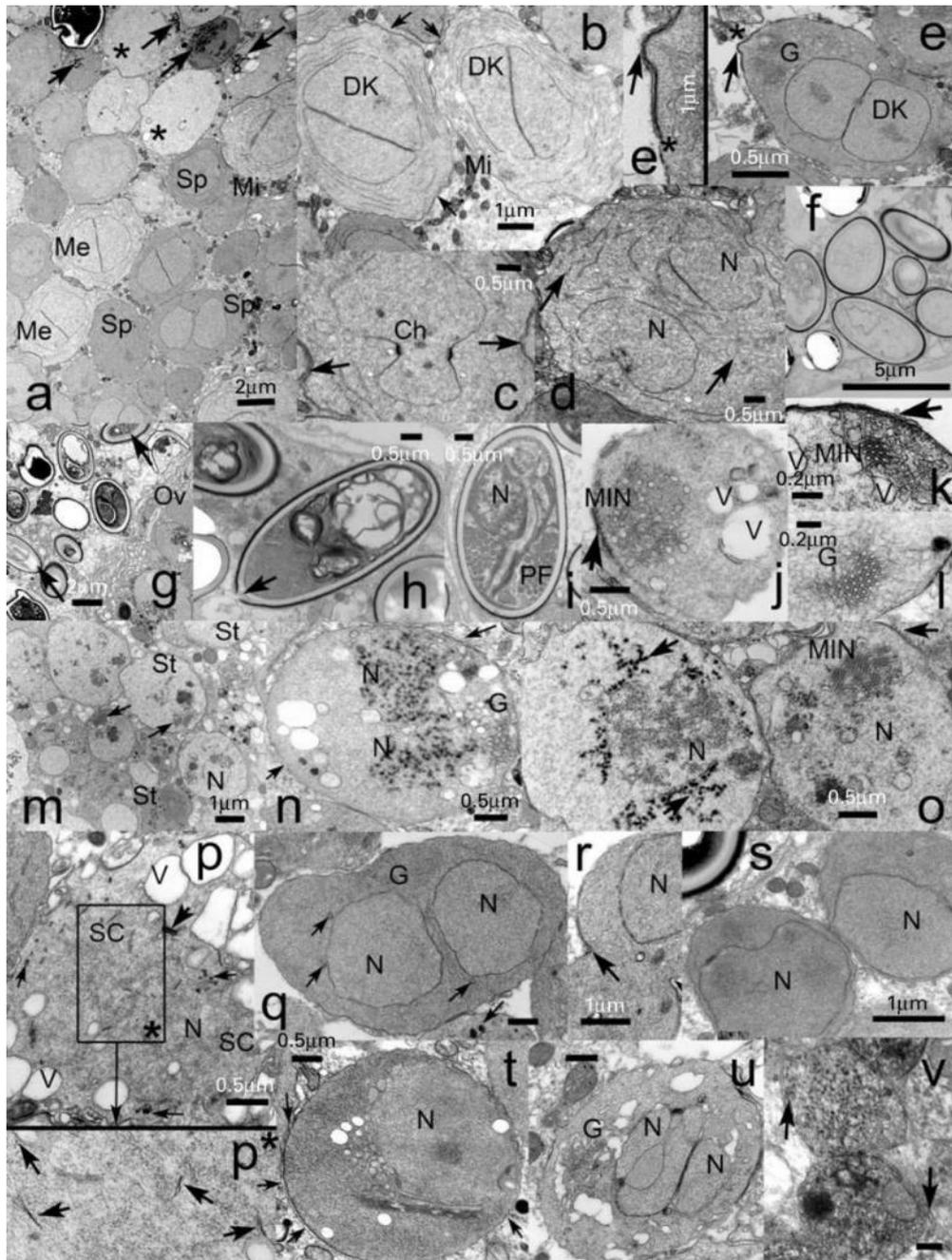
12 витков которой уложены в один ряд, оболочку толщиной  $0.15 \pm 0.062$  мкм, состоящую из толстой эндоспоры и тонкой ( $0.040 \pm 0.011$  мкм) ундулирующей экзоспоры, и длинный полярный сак, окружающий переднюю часть поляропласта. Спорофорные пузырьки содержат два типа секрета: электронно-плотные трубочки, отходящие от поверхности спорогонального плазмодия, и «лабиринто-подобные» скопления гранулярного секреторного материала. Оба типа секрета исчезают из центральной области пузырька по мере созревания спор (Рис. 3-20). Мегаспоры образуются в яичниках самок и участвуют в трансвариальной передаче. В небольшом количестве этот тип спор встречается в имаго всех каст, личинках последнего возраста и куколках, но выстреливание зародыша происходит только в оплодотворенных (со сперматофорами) яичниках самок (королев): это подтверждается тем, что только в яичниках и окружающих их тканях встречаются «пустые» споры и выброшенные из спор зародыши-спороплазмы. Размеры мегаспор  $7.3 \pm 0.1$   $7 \times 3.7 \pm 0.13$  мкм (живые) и  $6.2 \pm 0.41 \times 3.6 \pm 0.29$  мкм (фиксированные) (Рис. 3-21, 3-22). Мегаспора имеет овальную форму, содержит диплокарион и слегка анизофилярную полярную трубку, уложенную в 2-3 ряда и 18-23 витков. Оболочка этих спор ( $0.4 \pm 0.10$  мкм) характеризуется относительно толстой  $0.14 \pm 0.053$  экзоспорой (Рис. 3-22). Внешне заражение муравьев *K. solenopsae* проходит практически бессимптомно. При микроскопировании обращает на себя внимание гипертрофия жирового тела заражённых особей и наличие в брюшках заражённых рабочих особей 1-20 «цист», варьирующих в диаметре от 70 до 260 мкм и заполненных октоспорами (Рис. 3-18Б). Как показало исследование, каждая циста – производное одной клетки жирового тела (Sokolova et al., 2005b). Переключение диплокариотической ноземо-подобной части цикла на формирование октоспор и мегаспор происходит после кариогамии ядер диплокариона и последующего мейоза. Восстановление диплокариотичности происходит, по-видимому, в результате слияния гамето-подобных одноядерных клеток, которое наблюдали в световой микроскоп на окрашенных ДАПИ препаратах личинок IV возраста (Рис. 3-18С). Октоспоры – самый массовый тип спор, служащих для переживания во внешней среде и горизонтальной передачи инфекции. Полиплоидные мегаспоры передают паразитов трансвариально. От стадии яйца до личинки 4-го возраста заражение микроспоридиями муравьёв может быть выявлено только с помощью ПЦР. Спорогонии, ведущие к формированию диплокариотических спор 1-го типа и мегаспор, начинаются на стадии личинок 4-го возраста.



**Рисунок 3-19.** Диплокариотические споры второго типа (ДКC2) (а–h) и переход к октоспоровой спорогонии в зараженном жировом теле рабочего муравья (i–l). (а) Адипоцит со стадиями ДКC2 типа развития (стрелка). (b) Адипоцит с ДКC2. Некоторые споры – пустые (выстрелившие) (стрелки). (c) ДК меронт. (d) ДК споронт в процессе деления ядра. (e) 4-ядерный споронт. (f-g) Споробласты. (h) ДКC2. (i) Ранний споронт. Наконечники указывают на расширенное перинуклеарное пространство, стрелки – на разделившиеся ЦОМТы, свидетельствующие о начале деления. (j) Споронт с характерной «брешью» (наконечник) в зоне контакта между ядрами, появляющейся перед слиянием ядер. (k) Меронт в процессе кариогамии, «брешьи» указаны стрелками. (l) Споронт с диссоциированными ядрами (наконечники). ДК, диплокарион; F, жировые гранулы; N, ядро клетки хозяина; Nu, ядрышко; PF, полярная трубка; P, белковые гранулы; Pp, полярoplast; V, вакуоль.

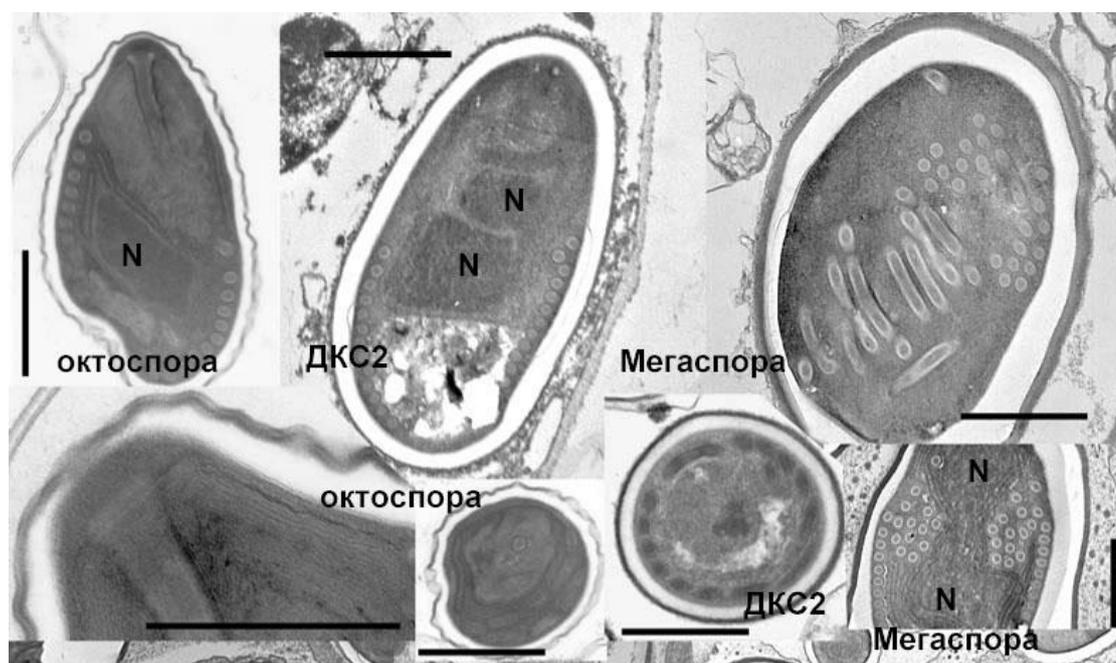


**Рисунок 3-20.** Октоспорогония внутри «цист». (а) ДК стадии в процессе кариогамии; стрелки указывают на «бреши» в зоне контакта между ядрами; в рамке – увеличенный фрагмент с синаптомемальными комплексами. (b) Вакуолированная клетка с разделившимися ядрами (N). (c) Спорогональный плазмодий (SPI) внутри спорогонного пузырька (СП) (обозначен SV на рисунке); тубулярный секрет (TSe) заполняет СП. (c\*) Увеличенный фрагмент (c): электронноплотный слой, состоящий из оболочки плазмодия и будущей экзоспоры, откладывается под плазмалеммой. Плазмалемма плазмодия становится оболочкой СП (SVW). (d) Спорогональный плазмодий внутри СП, заполненного двумя типами секрета: тубулярным (TSe) и гранулярным «лабиринто-подобным» секретом (LSe). (e) Тубулярный секрет (TSe), отщепляющийся от оболочки СП (Spl) (стрелка). (f) СП(SPI) в процессе деления на споробласты. (g) Срез через СП со споробластами (Spb). Звёздочка отмечает аморфный материал внутри СП, стрелка указывает на остатки тубулярного секрета. (h) СП со спорами (S), споробластами (Spb), аморфным материалом и остатками тубулярного секрета (стрелка). (i) Зрелые октоспоры внутри СП с тубулярным секретом на периферии СП (стрелка). а–i, Масштаб = 1мкм. N, ядро паразита; остальные обозначения как на Рис. 3-25.



**Рисунок 3-21.** Пролиферация и мейоз в спорогонии, заканчивающейся формированием мегаспор. *Kneallhazia solenopsae* в яичниках оплодотворённых королей *Solenopsis invicta*. (a) Срез через жировую клетку яичника, заполненную стадиями. Цитоплазма меронтов (Me) более светлая по сравнению со споронтами. Стрелки указывают на электронно-плотные тела, выходящие из ядер. Звездочками помечены стадии, приступающие к мейозу. (b) Две типичные стадии. (c) Делящиеся меронты, стрелки указывают на мелкие уплощённые везикулы, окружающие клетку паразита. (d) Спорогональный плазмодий в процессе митоза: стрелки указывают на цистерны Гольджи, распадающиеся при митозе. (e) Ранний споронт с участком электроно-плотной оболочки, формирующейся под слоем уплощённых везикул (стрелка, вставка e\*). (f) Пустые споры в тканях, прилегающих к овариолам. (g) Срез через овариолу (OV) с пустыми оболочками спор и активированными спорами. (h-i) Споры на различных стадиях активации. (j-д) Срезы через спороплазмы и тубулярную сеть MIN (аппарату Гольджи спороплазмы), расположенную вблизи соединения спороплазмы с полярной трубкой (стрелка). (m) Срез через питающую клетку (nurse cell), заполненную спороплазмами и ранними пролиферативными стадиями, MIN указаны стрелками. (n) Ранние стадии с электронно-плотными гранулами, выходящими из ядра в цитоплазму. Уплощённые везикулы снаружи от плазмалеммы указаны стрелками. (o) Две ранние стадии: левая демонстрирует электронно-плотные гранулы в цитоплазме (стрелки). Левая – MIN.

(p) Стадия со слившимися ядрами, приступающая к мейозу. Внутри ядра заметны синаптонемальные комплексы (SC). Тонкие стрелки указывают на электронно-плотные гранулы. (p\*) Синаптонемальные комплексы при большем увеличении (стрелки). (q) Ранний споронт (спорогональный плазмодий), с двумя диссоциированными ядрами; стрелки указывают на везикулы, отпочковывающиеся от оболочки ядра. (r) Ранний споронт в процессе цитокинеза; стрелки указывают на инвагинацию цитоплазмы. (s) Две клетки с одиночными ядрами, предшественники спорогонального плазмодия. (t) Срез через спорогональный плазмодий, окружённый уплощёнными цистернам (стрелки). (u) Спорональный плазмодий в процессе множественного деления ядра (v). Ранние пролиферативные клетки, окруженные плоскими везикулами (стрелки) внутри ооцита. Ch, хромосомы; DK, диплокарион; G, аппарат Гольджи; Me, меронты; MIN, multilayered interlaced network, тубулярная сеть спороплазм, АГ спороплазм; N, ядро; Ov, овриолы; SC, синаптонемальные комплексы; S, споры; SP, споронты; ST, стадии; V, вакуоли.



**Рисунок 3-22.** Сравнительная ультраструктура 3-х изученных спор *K. solenopsae*. ДКС2, диплокариотические споры второго типа; N, изолированное ядро октоспор или ядра диплокарионов ДКС2 и мегаспор. Масштаб, 0.5 мкм.

Основные результаты исследования микроспориоза муравьёв можно суммировать следующим образом. Во-первых, на основании изучения морфологии и ультраструктуры стадий жизненного цикла, а также филогенетического (МСрРНК) анализа показано отсутствие родства изученного паразита с другими описанными из муравьёв видами микроспоридий, а также со всеми видами рода *Thelohania*, что подтверждает валидность вида, ранее описанного как *Thelohania solenopsae* Knell, Allan, Hazard 1977 (Knell et al., 1977), и обосновывает выделение нового рода *Kneallhazia* Sokolova, Fuxa 2008. Филогенетический анализ еще раз подтвердил полифилетичность рода *Thelohania* (Sokolova, Fuxa, 2008).

Во-вторых, жизненный цикл *K. solenopsae*, раскрытый (хотя и не полностью) исследованиями автора, представляет собой яркий пример пластичности ядерных и клеточных циклов у микроспоридий. ДК меронты *K. solenopsae* – источник генетической информации для четырёх альтернативных программ дифференциации. Реализация конкретной программы связана с комбинацией собственных паразитарных (цикл меронта, запрограммированный на определённое количество делений), хозяинно-организменных (пол и каста хозяина, тип клетки хозяина, гуморальный/гормональный статус) и внешних (сезонность, температура, влажность) факторов. Из 6 описанных ранее полиспоровых родов микроспоридий (*Amblyospora*, *Culicosporella*, *Edhazardia*, *Hazardia*, *Parathelohania* и *Vairimorpha*) только *Edhazardia* демонстрирует 4 различных типа споруляции (остальные – по 3) (Sokolova, Fuxa, 2008). Жизненный цикл и набор морфотипов спор *E. aedis* удивительно напоминают *K. solenopsae*. *E. aedis* развивается в одном хозяине, комаре *Aedes aegypti*, формирует тонкостенные ДК споры в личинках, крупные ДК споры в ооцитах самок для трансвариальной передачи, одноядерные грушевидные споры для автоинвазии, заражающие жировое тело, и октоспоры (мейоспоры) для горизонтальной передачи паразита (Becnel et al., 1989). Такое сходство сложных жизненных циклов у неродственных микроспоридий свидетельствует о врождённом потенциале мультивариантных типов споруляции, как об универсальной черте всего типа Microsporidia (Flegel, Pasharawipas, 1995; Vossbrinck, Debruner-Vossbrinck, 2005).

В-третьих, автором впервые исследован и описан полиморфный жизненный цикл микроспоридии, адаптированной к паразитизму в колонии общественных насекомых. Основная особенность *K. Solenopsae* – это уникальное соответствие жизненного цикла паразита биологии хозяина, который в данном случае представлен колонией муравьев. Морфологические данные позволяют интерпретировать жизненный цикл *K. solenopsae* следующим образом (Рис. 3-28). Тип развития, формирующий ДКС2 споры, осуществляется в жировом теле имаго, характеризуется низкой интенсивностью и экстенсивностью инфекции и проходит бессимптомно на клеточном и организменном уровнях. Роль этого этапа – распространение инфекции в организме рабочих муравьев, а также крылатых самцов и самок. Под действием определённого стимула или как часть регулярного развития, ДК меронты приступают к активной пролиферации, а затем переключаются на «половые типы» развития. Запуск двух альтернативных половых типов развития – формирующих либо окто-, либо мегаспоры, вероятно, контролируются градиентом гуморальных факторов. Октоспорогенез в абдоминальных адипоцитах ведёт к гиперплазии жирового тела и формированию «цист». Гаплоидные октоспоры –

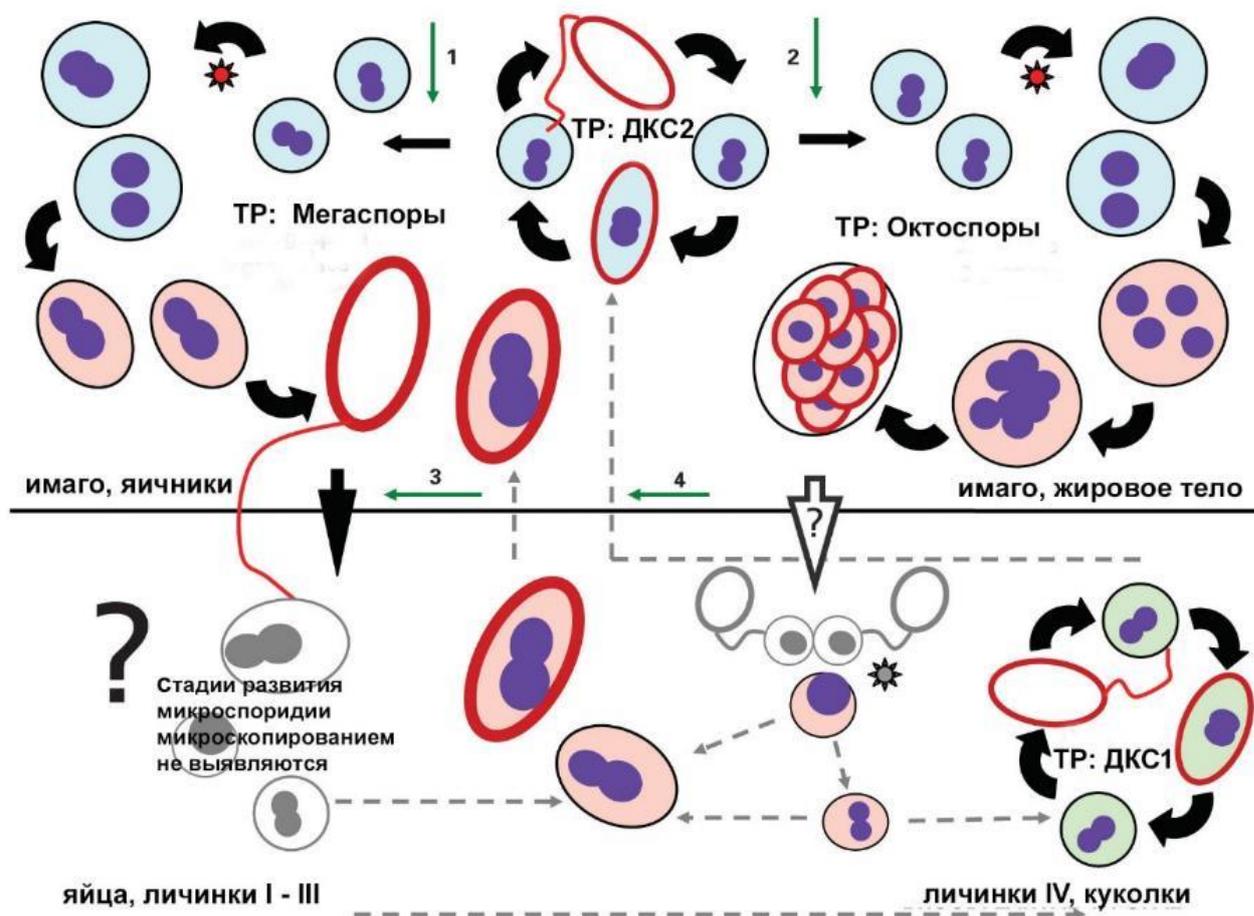
наиболее заметный и многочисленный тип спор, а также единственный тип спор, соприкасающихся с внешней средой. Автором высказано предположение, что октоспоры участвуют в горизонтальной диссеминации инфекции во внешней среде. Продуцирование паразитом избыточного количества октоспор (r-стратегия) поддерживает идею о том, что они могут быть вовлечены в рискованный путь передачи инфекции. Формирование цист обеспечивает концентрацию инфекционного начала и благоприятствует его сохранению во внешней среде или переносу насекомоядными животными. Заражение членов колонии через пищу может осуществляться только личинками IV возраста, у которых отсутствует буккальный фильтр, вследствие чего они способны поглощать частицы пищи размером более 0,88 мм (Glancey et al., 1981). Рабочие муравьи скармливают твёрдую пищу личинкам IV возраста, которые играют центральную роль в распределении продуктов питания среди членов колонии через трофаллакис (Holldobler, Wilson, 1990). Имеются косвенные доказательства того, что личинки IV возраста участвуют в распространении *K. solenopsae*. Во-первых, заражение королев возможно только в присутствии заражённых личинок IV (Oi et al., 2001). Во-вторых, октоспоры замечены в средней кишке и мекониях личинок IV возраста (Chen et al., 2004). В-третьих, мы наблюдали пустые октоспоры и одноядерные гамето-подобные стадии только на мазках этих личинок. Рабочие особи могут захватывать мертвых муравьёв, инфицированных октоспорами, и в случае дефицита белковой пищи скармливать их личинкам IV возраста. Это предположение основано на частом наблюдении в «мусорных кучах» (middens) мёртвых и умирающих крылатых особей с откусанными брюшками. Кроме того, другой вид микроспоридий огненных муравьёв, *Burenella dimorpha*, распространяется путём каннибализма членов колонии, заражённых спорами (Jouvenaz, 1981). Мегаспоры, напротив, в основном, локализируются в тканях яичников, выстреливание стимулируется оплодотворением, и их основная функция – трансвариальная передача. Мы выявляли спороплазмы и ранние пролиферативные стадии в клетках фолликулярного эпителия и в незрелых яйцеклетках. Это говорит о том, что инфицирование происходит до того, как фолликулярные клетки секретируют хорион яйца. Дальнейшая судьба паразитов в яйце и личинках ранних возрастов не ясна – микроскопия не выявляет микроспоридий, но положительные результаты ПЦР говорят о персистировании инфекции. Возможно, ингибирование размножения и спорообразования в яйцах и младших личинках, наиболее уязвимых стадиях онтогенеза, служит частью жизненной стратегии паразита. Тонкостенные ДК споры (ДКС1), продуцируемые в личинках IV и куколках, структурно напоминают «ранние споры» ноземных циклов, о которых речь шла в предыдущем разделе этой главы. ДКС1 служат

для распространения инфекции на пре-имагинальной фазе и инициируют тип развития ДКС2 у имаго. Показано, что ДКС1 служат для горизонтального распространения инфекции между колониями через «рейдерство» личинок и куколок рабочими муравьями соседних колоний (brood raiding) (Oi et al., 2001), а также, видимо, и для распространения заражения внутри муравейника, т.к. личинки IV возраста и куколки регулярно используются для питания колонии (Tschinkel, 2006).

В-четвертых, выявлены две интересные черты цитологии микроспоридий, подтверждающие предыдущие наблюдения автора. В частности, наблюдали электронно-плотные гранулы (Рис. 3-21, n-o), появляющиеся в ядрах одновременно с их диссоциацией после первого мейотического деления. Сходные структуры ранее видели у *Paranosema* spp. при переходе от мерогонии к спорогонии (Sokolova, Lange, 2002; Sokolova et al., 2003a, 2005b; Соколова и др., 1998). Попытки их идентификации с помощью антител к ДНК и snRNPs дали негативные результаты и не опубликованы. Эти гранулы транспортируются в цитоплазму с помощью везикулярного механизма, отпочковываясь от внешней мембраны ядерной оболочки. Известно, что рибосомы и другие белковые комплексы, которые по размеру существенно мельче электронно-плотных гранул *K. solenopsae*, проходят в цитоплазму через ядерные поры (Ossareh-Nazari et al., 2001). Могут ли эти гранулы представлять собой продукты внутриядерного белкового синтеза, транспортируемые сначала в перинуклеарное пространство, которое у микроспоридий служит промежуточным компартментом Гольджи (Глава 3), а затем в цитоплазму? Вопрос остаётся открытым, как и проблема ко-транскрипционной трансляции белков внутри ядра эукариот (Aguilera, 2002; Hentze, 2001), у которых трансляция и транскрипция, как правило, разделены сплайсингом, и трансляция происходит на цитоплазматических рибосомах с мРНК, освободившихся от интронов. При этом большинство компонентов трансляционного механизма (например, факторы инициации и элонгации, aminoacyl-t-RNA синтетазы) присутствуют в ядрах всех изученных эукариот (Iborra et al., 2004a, b; Mangiarotti, 1999). Предполагаемая функция внутриядерной трансляции эукариот связана с проверкой транскриптов на ошибки (Hentze, 2001). Протеиновый синтез на внутриядерных полирибосомах продемонстрирован на *Dictiostelium* и клетках HELA. Не могли ли микроспоридии, для большинства видов которых с прочитанными геномами характерна значительная редукция механизмов (генов) сплайсинга и минимальное количество интронов (Williams et al, 2014, использовать древний механизм внутриядерной транскрипции для синтеза функциональных белков? Эта гипотеза, безусловно, заслуживает экспериментальной проверки.

Вторая выявленная автором любопытная черта – это присутствие в спороплазмах и ранних пролиферативных стадиях *K. solenopsae* структуры, идентичной MIN (Рис. 3-26, j-1), описанной ещё только у *Anncaliia algerae* (Cali et al., 2002) – своеобразного комплекса Гольджи микроспоридий. Более подробно об этой структуре сказано в Главе 4, посвящённой организации секреторного компартмента.

Также изучено географическое распределение микроспоридии в зависимости от типов колоний (полигинных и моногинных), но рассмотрение данной части исследования не входит в задачи диссертации (Fuxa et al., 2005a,b; Sokolova et al., 2004a).



**Рисунок 3-23. Схематическая интерпретация сложного полиморфного жизненного цикла *Kneallhazia solenopsae*.** Обозначения: ДКС1 и ДКС2, диплокариотические споры 1-го и 2-го типа; TP, тип развития; TP: мегаспоры/ TP: октоспоры/ TP: ДКС1/ TP: ДКС2, тип развития с формированием мегаспор/октоспор/ДКС1/ДКС2; TP: ДКС2 проходит в жировом теле имаго. Внешний или внутренний (гормональный?) стимул запускает интенсивное деление ДК меронтов, кариогамию диплокарионов и мейоз. Формирование октоспор происходит, в основном, в абдоминальных адипоцитах рабочих муравьев. Мегаспоры продуцируются в мышцах и жировом теле, прилегающем к овариолам крылатых самок и королев. Мегаспоры выстреливают спороплазмы в яичниках оплодотворённых королев. Присутствие микроспоридий в яйцах и личинках 1-3 возраста выявляется только с помощью ПЦР. В личинках IV возраста и куколках продуцируются ДКС1 и быстро распространяются между личинками с помощью трофоллакиса. Мегаспоры также могут образовываться в личинках IV и куколках. Связь между скрытой

инфекцией у личинок 1-3 возраста и возникновением ДКС1 и мегаспор у личинок IV, как и происхождение TP: ДКС2 у имаго гипотетичны и обозначены серой прерывистой линией. Толстые черные стрелки указывают на стадии жизненного цикла, подтвержденные прямыми наблюдениями. Белые стрелки с вопросительными знаками соответствуют гипотетической трансмиссии оогоспор от трупов к личинкам IV, в которых происходит восстановление диплокариотического состояния ядер. Тонкие зелёные стрелки с номерами указывают на гормональные или иные стимулы, переключающие типы развития. Звёздочки обозначают мейоз. Знак вопроса в нижнем левом углу и серые контуры стадий развития обозначают недостаток информации о развитии паразита в период от яйца до личинок III.

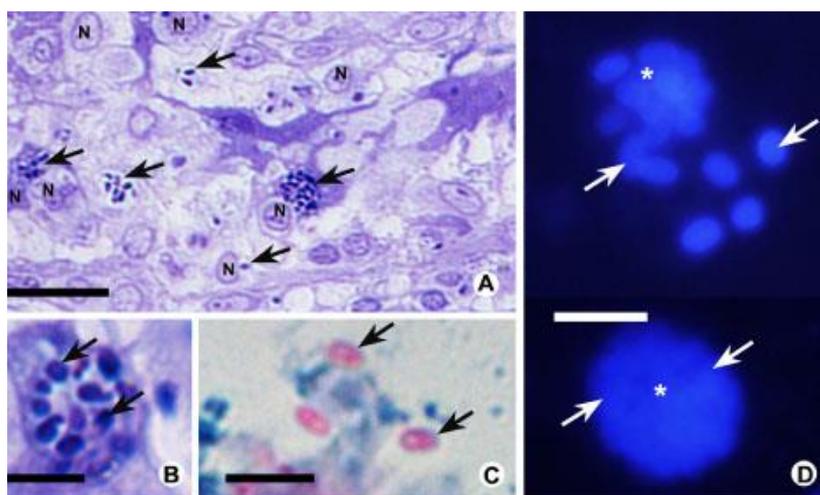
### 3.4 Микроспоридии – паразиты позвоночных животных и человека

Распределение микроспоридий по группам хозяев не равномерно. Из примерно 1400 описанных видов 70% паразитируют в беспозвоночных, 10% – в рыбах и амфибиях, и лишь около 1% обнаружены в пресмыкающихся и теплокровных (птицах и млекопитающих) (Vecnel, Andreadis, 2014).

#### 3.4.1 Микроспоридии рептилий: *Encephalitozoon pogonae* – новый вид микроспоридий из бородатой агамы *Pogona vitticeps*. Диверсификация рода *Encephalitozoon* по позвоночным хозяевам

Микроспоридии рептилий крайне слабо изучены. В последнем обзоре микроспоридий позвоночных паразитам рептилий и амфибий уделяется одно предложение со ссылкой на таблицу, цитирующую 4 упоминания о находках микроспоридий в рептилиях (Snowden, 2014). Однако изучение микроспоридий рептилий важно с учётом того, что все три класса «высших позвоночных», Reptilia, Mammalia и Aves, составляют одну эволюционную кладу и происходят от общего предка (Donoghue, Benton, 2007). В результате интенсивного поиска свидетельств распространения микроспоридий среди рептилий автором обнаружено 18 опубликованных упоминаний о микроспоридиозах рептилий, 14 из которых представляют собой краткие отчеты практикующих ветеринаров зоопарков и клиник. Подавляющее большинство идентификаций проведено только по данным световой микроскопии, а некоторые из них – ошибочные (Sokolova et al., 2016). Интересно, что микроспоридии обнаружены в трех из четырех отрядов рептилии (Squamata, Rynchocephalia и Crocodilia) и не обнаружены только у черепах (Testudines). Пять из 6 упоминаний микроспоридиозов змей относится к заражению представителей сем. Colubridae общими с рыбами родами микроспоридий, такими как *Pleistophora* (Canning et al., 1964) и *Heterosporis* (Richter et al., 2014), возможно, благодаря вовлечению в общие пищевые цепи водных экосистем. Остальные немногочисленные находки относили к роду *Encephalitozoon*, причем до исследования автора все эти виды, за исключением одного, *E. lacertae* (Canning, 1981), считались изолятами *E. cuniculi*.

Автором диссертации был исследован возбудитель микроспориоза бородатой агамы *Pogona vitticeps*, 2-х ящериц с опухолями головы и конечностей, находящихся в летаргическом состоянии. Эти симптомы, как показал анализ, были вызваны микроспориозом. Обе ящерицы погибли, а вскрытие показало многочисленные гранулемы внутренних органов. СМ выявила споры в макрофагах и очагах грануломатозного воспаления. На основании ультраструктуры, патогенеза и секвенирования участка рибосомального гена (ITS-МСрДНК) был описан новый вид *Encephalitozoon pogonae*, родственные *E. lacertae* и *E. cuniculi* (Рис. 3-18, 3-19, ПЗ-6).



**Рисунок 3-18.** *Encephalitozoon pogonae*: световая микроскопия. (А) Толстые (500-нм) срезы через гранулему, окрашенные метиленовым синим. Стрелки указывают на споры микроспоридий внутри макрофагов. N, ядро макрофага. (В) Группа спор (стрелки) в паразитофорной вакуоли при большем увеличении. (С) Споры на мазках, фиксированных метанолом после окраски трихромом. (D) Споры (стрелки) и паразитофорная вакуоль (звездочка) окрашенные калькофлуором. Масштаб: А, 20 мкм; В–D, 5 мкм.

Анализ литературы по вереринарии показал, что заражение *E. pogonae* наблюдалось и ранее, но патоген либо не был идентифицирован, либо обозначен как изолят *E. cuniculi*. Таким образом, скорее всего, *E. pogonae* – обычный патоген рептилий, вызывающий заболевание у особей с ослабленной защитной системой. Вследствие слишком влажного климата и дефекта иммунной системы, бородатые агамы, интродуцированные из Австралии, в Луизиане оказались особенно подвержены различным бактериальным, вирусным и грибным инфекциям (Crossland et al., 2018; Le Donne et al., 2016). Все стадии *E. pogonae* развиваются в паразитофорной вакуоли. Размеры спор на мазках, фиксированных метанолом, 2.1 x 1.1

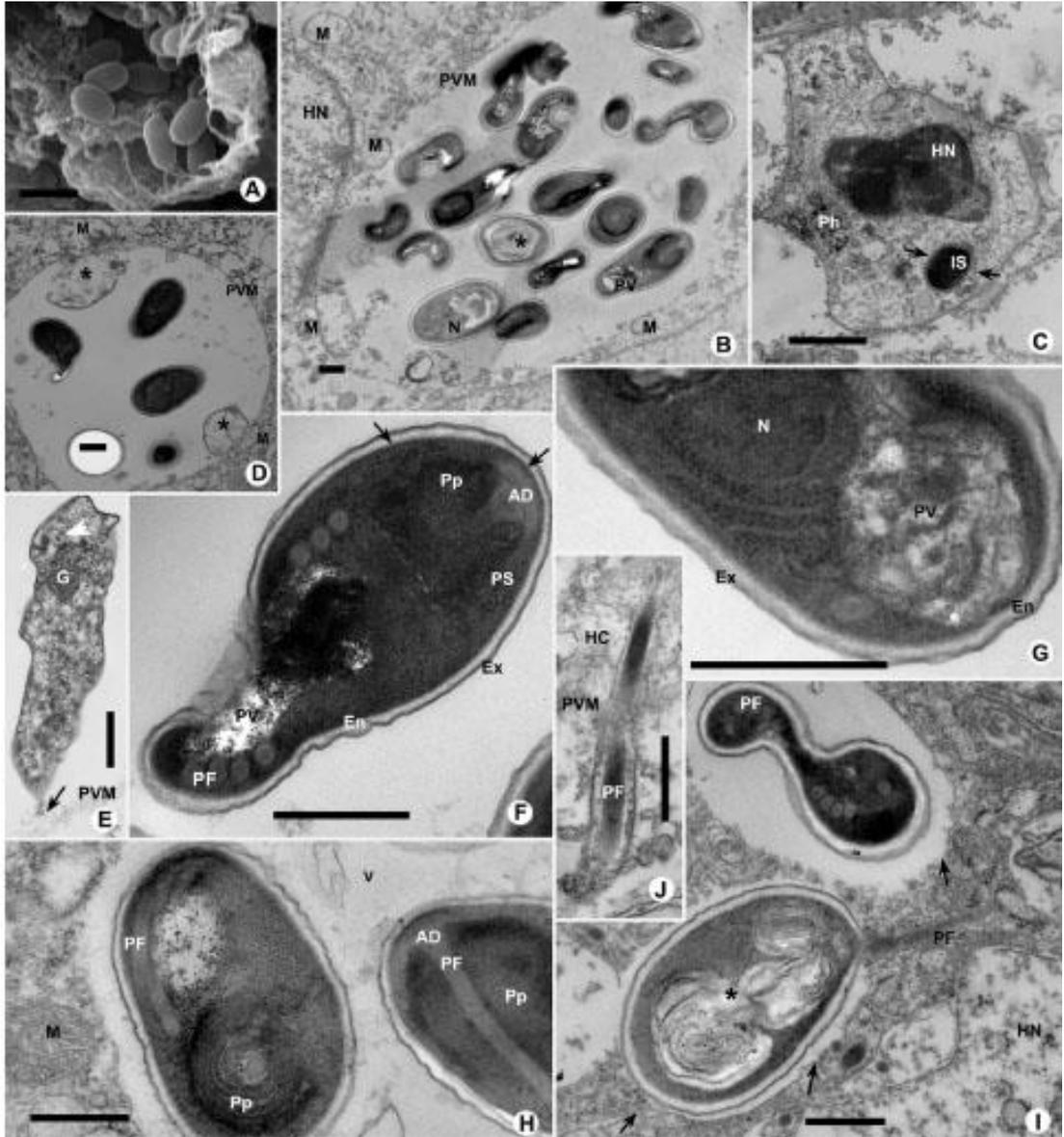
**Таблица 3-4.** Сравнение морфологии спор трёх изолятов *Encephalitozoon* из бородачатой агамы *Pogona vitticeps* и пяти *Encephalitozoon* ns pp. (по Sokolova et al., 2016)

| Вид/изолят                                     | Число витков полярной трубки | Ширина x длина фиксированных спор: (среднее значение), мкм | ширина/длина | Источники                                   |
|--|------------------------------|--|--------------|---|
| <i>Encephalitozoon ex. Pogona</i> <sup>1</sup> | 6                            | 1.8-2.9 x 0.8-1.8  | -            | Johnson et al. 1998                         |
| <i>Encephalitozoon ex. Pogona</i> <sup>2</sup> | 5-6                          | 1.4-2.1 x 0.9-1.2  | -            | Richter et al. 2013                         |
| <i>Encephalitozoon pogonae</i>                 | 3-5.5                        | 1.7-2.6 x 0.9-1.7<br>(2.1 x 1.1)                           | 0.52         | Sokolova et al., 2016                       |
| <i>E. cuniculi</i>                             | 5-7                          | 2.0-3.0 x 1.0-1.5<br>(2.5 x 1.5)                           | 0.60         | Visvesvara et al. 1999 Ghosh et al. 2014;   |
| <i>E. intestinalis</i>                         | 4-7                          | 2.0-2.5 x 1.0-1.2<br>(2.0 x 1.2)                           | 0.60         | Del Aguila et al. 1998<br>Ghosh et al. 2014 |
| <i>E. hellem</i>                               | 4-9                          | 2.0-2.5 x 1.0 -1.5<br>(2.0 x 1.0)                          | 0.50         | Didier et al. 1991                          |
| <i>E. romaleae</i>                             | 7-8                          | (3.0 x 1.8)  | 0.60         | Lange et al., 2009                          |
| <i>E. lacertae</i>                             | 5-7                          | 2.5-3.5 x 1.0 -1.5<br>(2.7 x 1.2)                          | 0.44         | Coudela et al., 1998<br>Canning 1981        |

<sup>1</sup>В оригинальной публикации *Microsporidium* sp. (Jacobson et al., 1998); 2*E. cuniculi* (Richter et al., 2013).

мкм (1,7-2,6 x 0,9-1,7), на ультратонких срезах 0,8-1,1 x 1,8-2,2 мкм. Полярный филамент свернут в 3-6 витков. Общая морфология и внутриклеточное развитие *E. pogonae* похожи на другие виды *Encephalitozoon* spp. (Sokolova et al., 2016).

Идентификация ещё одного вида рода *Encephalitozoon* – специализированного паразита рептилий, отличного от других видов этого рода, демонстрирует, что род *Encephalitozoon* диверсифицирован по группам позвоночных хозяев, единственный из всех известных родов микроспоридий. Из 5 видов рода, два вида, *E. lacertae* и *E. pogonae* – специализированные паразиты рептилий; 3 вида, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* и *E. hellem*, заражают птиц и млекопитающих, причем *E. hellem* в большей степени ассоциирован с птицами, *E. intestinalis* – с человеком, а *E. cuniculi* – универсальный вид, находящийся в процессе разделения на подвиды. В настоящее время известно как минимум 3 генотипа этого вида, обладающие определенной хозяйной специфичностью (Didier et al., 1995). *E. romaleae*, родственник *E. hellem*, вторично перешел к паразитированию в насекомых, вероятно, с птиц (ссылки в: Sokolova, 2015; Sokolova et al., 2010).



**Рисунок 3-19.** *Encephalitozoon rogonaе*: ЭМ тканей, префиксированных 10% формалином. (А) СЭМ: споры *Encephalitozoon* sp. с гладкой поверхностью экзоспоры в разрушенной паразитофорной вакуоли (ПВ). (В–I) ТЭМ. (В) Срез через ПВ со спорами. Звездочка (\*) маркирует спору в процессе выстреливания. (С) Индивидуальная (предположительно фагоцитированная) спора внутри вакуоли (стрелки) в цитоплазме макрофага. (D) Срез через ПВ: две плохо сохранившиеся преспоровые стадии (\*) контактируют с мембраной ПВ. (Е) Споробласт, соединённый с мембраной ПВ (стрелка). (F–H) Срезы через зрелые споры. (I) Срез через ПВ, вблизи ядра клетки хозяина. Нижняя спора – в процессе выброса полярной трубки (ПТ). (J) Вывернутая ПТ проходит через мембрану ПВ. AD, якорный диск; En, эндоспора; Ex, экзоспора; G, Гольджи; HC, цитоплазма клетки хозяина; HN, ядро хозяина; IS, индивидуальная спора; M, митохондрия; N, ядро паразита; Ph, фагосома; Pp, полярoplast; PV, задняя вакуоль; PVM, мембрана ПВ. Масштаб: А, С, 2 мкм; В, D–J, 500 нм.

*E. pogonae* отличается от морфологически сходных *E. cuniculi*, *E. intestinalis* и *E. hellem* (Таблица 3-4), в первую очередь, паразитированием в пресмыкающихся. От другого вида рода – паразита рептилий *E. lacerate*, этот вид отличается формой и меньшими размерами спор, а также тканевой специфичностью (*E. lacerate* заражает энтероциты). *E. pogonae* отличается от *E. romaleae* паразитированием в позвоночном хозяине и размером спор. Присутствие уникальной последовательности 5' GTTTTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTT 3' в участке ITS рибосомального цистрона позволяет отличать *E. pogonae* от других представителей рода *Encephalitozoon* на молекулярном уровне.

Все *Encephalitozoon* spp. из позвоночных могут вызывать сходную патологию – гранулематозное воспаление различных органов и диссеминированную инфекцию. Фагоцитирующие клетки, в первую очередь макрофаги, часто служат первичным очагом инфекции и разносят паразитов по всему организму.

#### 3.4.2 Микроспоридии – реальные и потенциальные патогены человека

***Микроспоридии человека: первое выявление случаев микроспоридиоза среди ВИЧ-инфицированных пациентов с синдромом иммунодефицита человека (СПИД) в России.*** Хорошо известно, что проблема ВИЧ инфекций и СПИДа в России стоит достаточно остро (Kozlov et al., 2006), а микроспоридии относятся к одной из типичных оппортунистических инфекций, третьим по важности возбудителем диаррей и синдрома потери веса у ВИЧ-инфицированных после цитомегаловируса и криптоспоридий (Sharpstone, Gazzard, 1996; Weiss, 2014). При этом в России диагностика микроспоридиозов у человека никогда не проводилась, и данные о роли этой инфекции в картине СПИДа российских пациентов отсутствовали полностью. Данное исследование, проведенное совместно с медиками Инфекционной больницы имени Боткина и Американскими коллегами в рамках проекта CRDF, было инициировано участвовавшими случаями острой и хронической диарреи неясной этиологии у ВИЧ-положительных пациентов с низким титром CD4-Т клеток в крови. Мы предположили, что эти симптомы вызваны микроспоридиозом. ВИЧ-инфицированные пациенты с диарреями неясной этиологии и/или низким уровнем CD4-Т лимфоцитов были проверены на наличие микроспоридий в стуле. Методами гистохимии (окраска мазков трихромом и калькофлуором) и ПЦР (с помощью праймеров к ITS и фланкирующим участкам МС и БС рДНК) микроспоридии были идентифицированы в образцах стула 30 пациентов из 159 обследованных (18,9%) (Рис. 3-32). Вклад каждого из методов в диагностику и определение видового состава микроспоридий приведён в Таблице 3-5. Секвенирование ампликонов показало, что наиболее распространён вид *E. intestinalis*, выделенный у 21

пациента. *E. cuniculi* идентифицирован у 3-х пациентов. Характерно, что в ампликонах *E. cuniculi* от разных пациентов варьировало число повторов 5'-GTTT-3' в ITS участке рДНК, которое определяет принадлежность изолята *E. cuniculi* к одному из 3-х генотипов (Didier et al., 1995). Ампликон одного пациента содержал 3 повтора, что характерно для генотипа I, а два других ампликона содержали по 2 повтора, что характерно для генотипа II. *E. hellem* (генотип 1A) выделен из одного пациента, а *E. bieneusi* (генотип D) – из двух пациентов. Ампликоны рДНК из 2-х других пациентов были одинакового размера с ампликонами *Encephalitozoon* spp. (примерно 300 по), однако их сиквенсы продемонстрировали низкую гомологию с какими-либо сиквенсами из Генбанка. Эти сиквенсы депонированы под именами *Microsporidium* sp. 1 (№ GQ408914) и *Microsporidium* sp. 2 (№ GQ408914). Первый сиквенс выявляет максимальную гомологию с сиквенсом *Larssonia obtusae* (86%) из копепод, второй – с *Vairimorpha* sp. (84%) из чешуекрылых. В Таблице 3-6 представлен сравнительный нуклеотидный анализ новых сиквенсов и их ортлогов из Генбанка. Статистических достоверных корреляций заражения с полом, возрастом и стадией СПИДа не выявлено, однако ВИЧ-инфицированные пациенты демонстрировали сниженное количество CD4+ Т-лимфоцитов (<100кл/мкл крови) (P = 0,0116) и потерю веса (>10% от исходного уровня) (P = 0,0352) по сравнению с пациентами без микроспориоза.

В целом, распространенность заражения микроспоридиями в этом пилотном исследовании совпадает с таковой в странах с ограниченным применением антиретровирусной терапии (см. ссылки в: Sokolova et al., 2011). Корреляция микроспориоза с такими симптомами как пониженный титр CD4-Тклеток и потеря веса также соответствует данным других авторов (Kotler, Orenstein, 1998). Неожиданной была более высокая распространенность *E. intestinalis* по сравнению с *Enterocytozoon bieneusi*, обычно наиболее распространенного вида среди ВИЧ-инфицированных пациентов с диарреями (Didier, Weiss, 2006). Также уникальным было выявление генотипа II вида *E. cuniculi*, никогда раньше не выявляемого у людей. Наиболее часто у людей встречается генотип I (3 повтора 5'-GTTT-3', впервые выделен из кролика) и генотип III (4 повтора, впервые выделен из собаки) (Didier et al., 1995). Человеческие инфекции *E. cuniculi* считаются зоонозными, а генотип II ранее выделяли из мышей, крыс, лисиц и других диких животных. Возможно, что крысы, поддерживающие высокую численность в С.-Петербурге, могли быть источником заражения ВИЧ-инфицированных людей.

**Таблица 3-5.** Распространенность микроспоридий идентифицированных различными методами в образцах стула 159 пациентов с ВИЧ инфекцией

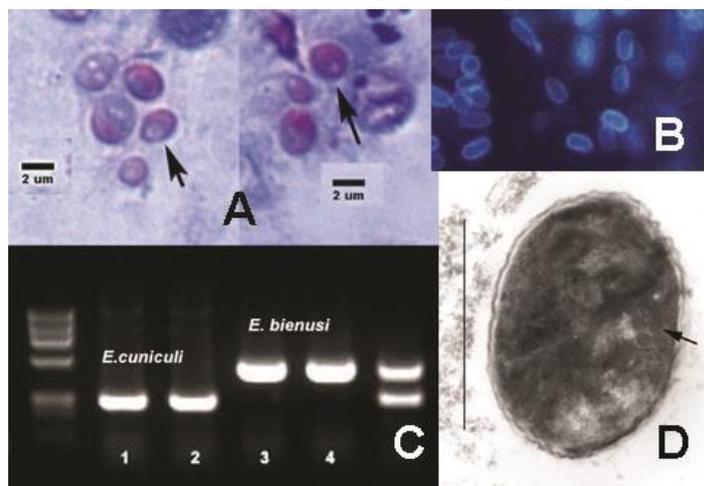
| Метод  | Число диагнозов (% от 159) |   |
|--|----------------------------|---|
| <b>Положительные диагнозы при использовании световой микроскопии и ПЦР</b> | <b>18 (11.3)</b>           |   |
| Калькофлор и ПЦР положительные   | 3                          |   |
| <i>E. cuniculi</i>   |                            | 0 |
| <i>E. hellem</i>   |                            | 0 |
| <i>E. intestinalis</i>   |                            | 3 |
| <i>E. bieneusi</i>   |                            | 0 |
| <i>E. cuniculi</i> и <i>E. intestinalis</i>                                |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 1  |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 2  |                            | 0 |
| Трихром и ПЦР положительные  | 4                          |   |
| <i>E. cuniculi</i>   |                            | 0 |
| <i>E. hellem</i>   |                            | 1 |
| <i>E. intestinalis</i>   |                            | 2 |
| <i>E. bieneusi</i>   |                            | 1 |
| <i>E. cuniculi</i> и <i>E. intestinalis</i>                                |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 1  |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 2  |                            | 0 |
| Калькофлор, Трихром и ПЦР положительные                                    | 11                         |   |
| <i>E. cuniculi</i>   |                            | 0 |
| <i>E. hellem</i>   |                            | 0 |
| <i>E. intestinalis</i>   |                            | 9 |
| <i>E. bieneusi</i>   |                            | 1 |
| <i>E. cuniculi</i> и <i>E. intestinalis</i>                                |                            | 1 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 1  |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 2  |                            | 0 |
| <b>Световая микроскопия- положительные</b>                                 | <b>2 (1.3)</b>             |   |
| Calcofluor White stain only  |                            | 0 |
| Modified Trichrome Blue stain only   |                            | 0 |
| Both stains  | 2                          |   |
| <b>ПЦР- положительные</b>  | <b>10 (6.1)</b>            |   |
| <i>E. cuniculi</i>   |                            | 2 |
| <i>E. hellem</i>   |                            | 0 |
| <i>E. intestinalis</i>   |                            | 6 |
| <i>E. bieneusi</i>   |                            | 0 |
| <i>E. cuniculi</i> и <i>E. intestinalis</i>                                |                            | 0 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 1 <sup>a</sup>                                   |                            | 1 |
| <i>Microsporidium</i> sp. 2 <sup>b</sup>                                   |                            | 1 |
| <b>Общее число положительных диагнозов</b>                                 | <b>30 (18.9)</b>           |   |

<sup>a</sup> Депонирован Генбанк, № GQ408913

<sup>b</sup> Депонирован Генбанк, № GQ408914

**Таблица 3-6.** Сравнение секвенированного участка рРНК (ITS), выделенного из образцов стула, с сиквенсами, депонированными в Генбанке (query)

| Виды                   | № пациента | № Генбанке | Позиция нуклеотида (query) и мотив сиквенса |           |           |           |           |           |
|------------------------|------------|------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                        |            |            | 7641-7644                                   | 7801-7804 | 7809-7912 | 7813-7816 | 7817-7820 | 7821-7824 |
| <i>E. cuniculi</i>     |            |            |   |           |           |           |           |           |
|                        | Query      | AL391737   | TCGC  | GGAT      | GTTT      | GTTT      | GTTT      | GTGT      |
|                        | 51         |            | ***T  | ****      | ****      | ****      | ****      | ****      |
|                        | 124        |            | ***T  | ****      | ****      | ****      | **_       | ****      |
|                        | 156        |            | ***T  | ****      | ****      | ****      | **_       | ****      |
| <i>E. hellem</i>       |            |            | 291-299                                     |           |           |           |           |           |
|                        | Query      | AF338367   | TAG-CGACG                                   |           |           |           |           |           |
|                        | 114        |            | **AR*****                                   |           |           |           |           |           |
| <i>E. intestinalis</i> |            |            | 143-149                                     |           |           |           |           |           |
|                        | Query      | Y11611     | GAGGATT                                     |           |           |           |           |           |
|                        | 140        | CQ408911   | *****C                                      |           |           |           |           |           |
|                        | 152        | CQ408912   | *****C*                                     |           |           |           |           |           |



**Рисунок 3-20.** Диагностика микроспоридий в образцах стула ВИЧ-инфицированных пациентов. А. Окраска трихромом мазков стула. Стрелки указывают на споры микроспоридий. В. Окраска калькофлором (*E. intestinalis*, референтный образец, культур в ТНР-1). С. Дифференциация *Enterocytozoon bienusi* (ампликон 500 по) vs. *Encephalitozoon* spp. (300 по) с помощью ПЦР с MSP праймерами. D. Верификация инфекции в ЭМ: Спора *E. bienusi* из фекальных образцов. Стрелка указывает на витки полярной трубки, расположенные в несколько рядов, характерный признак споры *E. bienusi*. Масштаб, 1 мкм.

В ходе данного исследования впервые испытана Технология FTA® (Whatman FTA technology <http://www.whatman.com/>) для сбора, архивирования и молекулярного анализа ДНК микроспоридий из образцов стула. Эта «бумажная» технологии специально разработана и внедрена в практику, чтобы облегчить сбор, перевозку и очистку

нуклеиновых кислот из различных биологических субстанций, включая образцы крови и кала (Jaravata et al., 2006). Данную технологию уже успешно использовали для анализа ДНК вирусов, бактерий, одноклеточных и многоклеточных паразитов. Метод показал хорошие результаты при генотипировании организмов, в частности, при анализе сайтов единичного нуклеотидного полиморфизма (SNPs) в разнообразных популяционных и эпидемиологических исследованиях (см. ссылки Соколова и др., 2011). Специально обработанная фильтровальная бумага быстро захватывает и стабилизирует ДНК, что позволяет длительное время хранить эту ДНК при комнатной температуре. Считается, что при адсорбировании ДНК на ФТА-карточки удаляется значительное количество ингибиторов ПЦР (Mullen et al., 2009). Этот метод успешно применен при изучении распространения и генетической вариабельности микроспоридии *Kneallhazia* (= *Thelohania*) *solenopsae* из колоний *Solenopsis invicta* в Техасе, США (Snowden et al., 2002). Работа американских ученых, проведенная на насекомых, так же, как и наше исследование, показывает, что ДНК микроспоридий хорошо адсорбируется на ФТА-карточки, и ФТА-метод может быть использован в клинических и полевых условиях для выделения и хранения генетического материала микроспоридий. В нашем случае, ДНК микроспоридий успешно амплифицирована в 6 из 50 образцов стула, нанесённых на специально обработанную фильтровальную бумагу (FTA-Cards, Whatman Inc. FlorhamPark, NJ, USA). Ампликоны (фрагменты гена рибосомальной РНК) были прочитаны прямым секвенированием. Виды микроспоридий – *E. intestinalis*, *E. cuniculi*, *E. hellem* и *Enterocytozoon bieneusi* идентифицированы в Генбанке с помощью программы NCBI BLAST. Метод иммобилизации ДНК на фильтровальной бумаге особенно перспективен для эпидемиологических и популяционно-полевых исследований, требующих генотипирования видов и изолятов микроспоридий. В то же время, результаты применения «бумажного» и стандартного ПЦР не всегда совпадали. Причина такого несоответствия требует дополнительного анализа и проведения специальных исследований. Без сомнения, «бумажная» технология может рассматриваться как перспективный метод для идентификации микроспоридиозов человека, однако введение этой технологии в рутинную клиническую практику требует дальнейшей работы по ее оптимизации (Соколова и др., 2011; Sokolova et al., 2011).

В целом, изучение биоразнообразия микроспоридий и сравнительный анализ видов, паразитирующих в беспозвоночных и позвоночных, позволили показать, что роль микроспоридий как паразитов человека не слишком велика. Она определяется оппортунистической природой микроспоридий. При этом риск микроспоридиозов для людей с врожденными, приобретенными или конституциональными дефектами

иммунитета нельзя недооценивать, особенно учитывая природную очаговость инфекции и постоянное (пропорциональное успехам медицины) расширение групп риска. Проведенное автором выявление микроспоридий у ВИЧ-инфицированных пациентов Больницы им. Боткина в СПб подтверждает это положение.

**Происхождение и филогенетические связи видов микроспоридий, паразитирующих у теплокровных животных.** Всего у человека за всю историю изучения выявлено 14 видов микроспоридий, большинство – единичные находки у людей с пониженным иммунитетом (Таблица 3-7). Только 4 вида микроспоридий, относящиеся к 2-м родам, могут считаться естественными паразитами млекопитающих и человека (как наиболее изученного представителя класса Mammalia): *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Enc. intestinalis* и *Enc. hellem*. Все эти виды считаются зоонозными инфекционными агентами и представляют собой угрозу для людей, особенно с ослабленной по различным причинам иммунной системой, в том числе для детей и пожилых людей, особенно в эпидемиологически неблагополучных районах. Другие виды микроспоридий, обычно паразиты членистоногих, случайны и выявляются у людей с нарушениями иммунитета. В то же время, находки этих случайных видов можно интерпретировать как последовательные этапы адаптации микроспоридий к паразитизму в млекопитающих: (1) от транзитных сиквенсов микроспоридий членистоногих, выявленных в стуле больных СПИДом (Sokolova et al., 2011), (2) к инфекциям кожи и подстилающих тканей, вызванных *Microsporidium* sp. (из группы *Endoreticulatus*) и *Tubulinosema* spp. у пациентов с ослабленным иммунитетом, (3) развитию *Vittaforma* spp. в иммунно-привилегированных нишах типа роговицы глаза; (4) поражению мышц микроспоридиями-«универсалами», типа *Trachipleistophora* spp. и *Anncaliia* spp., (5) к специализированным инфекциям эпителия кишечника (*E. bieneusi*) и (6) системному микроспоридиозу, вызываемому *Encephalitozoon* spp. (Таблица 3-7). *E. bieneusi*, наиболее распространенный вид микроспоридий человека, эволюционно связанный с морскими ракообразными и рыбами, перешел к паразитированию в кишечнике млекопитающих, скорее всего, через пищевые цепи (Stentiford et al., 2016). Все остальные виды микроспоридий, обнаруженные у человека, ведут свое происхождение или родственны микроспоридиям насекомых. Потенциальные источники микроспоридиальных инфекций человека, возможно, связаны с «универсальными» паразитами насекомых с широким спектром хозяев и преадаптированных к высоким температурам (например, личинки комаров, развивающиеся в мини-водоемах при высокой температуре), а также с гиперпаразитами млекопитающих и их родственниками. Дальнейшие исследования микроспоридий в представителях

Таблица 3-7. Микроспоридии, выявленные у людей, их родственные связи и группы хозяев<sup>1</sup>

| Гены и роды                  | Тканевая специфичность             | Систематическое положение естественного хозяина | Ближайшие родственники (% сходства МСрДНК), систематическое положение их хозяев   |
|------------------------------|------------------------------------|---|---|
| <b>Encephalitozoon</b>       |                                    |   | <i>Mockfordia xanthocaecilliae</i> (79-81%) <sup>2</sup> , <b>Insecta</b> , Psocoptera<br><i>E. romaleae</i> (93-96%), <b>Insecta</b> , Orthoptera; <i>E. lacertae</i> , <i>E. pogonae</i> <sup>3</sup> (96-98%), <b>Reptilia</b> |
| <i>E. cuniculi</i>           | Мозг, жкт, диссемин.               | Mammalia, Aves, Reptilia                        |   |
| <i>E. hellem</i>             | диссемин.                          |   |   |
| <i>E. intestinalis</i>       | Жкт, желч. пузырь, почка, глаз     |   |   |
| <b>Enterocytozoon</b>        |                                    |   | <i>Paranucleospora theridion</i> (82%), <b>Crustacea</b> , Copepoda, <b>Actinopterygii</b><br><i>En.hepatopenaei</i> (84%), <b>Crustacea</b> : Decapoda<br><i>Nucleospora salmonis</i> (80%), <b>Actinopterygii</b>               |
| <i>E. bieneusi</i>           | Жкт, желч. пузырь, почка, глаз     | Mammalia  |   |
| <b>Anncaliia</b>             |                                    |   | <i>Anncaliia</i> spp. (97-99%), <b>Insecta</b> : Diptera, Coleoptera; <b>Crustacea</b> : Amphipoda;   |
| <i>A. vesicularum</i>        | Кожа, глаз, мышцы, диссемин. (A.c) | Insecta (A.a); Primates (A.v, A.c.)             |   |
| <i>A. algerae</i>            |                                    |   |   |
| <i>A. connori</i>            |                                    |   |   |
| <b>Tubulinosema</b>          |                                    |   | <i>Tubulinosema</i> spp. (99%), <b>Insecta</b> : Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera  |
| <i>T. acridophagus</i>       | Мышцы, диссемин.                   | Insecta, Primates                               |   |
| <b>Trachipleistaphora</b>    |                                    |   | <i>T.extenrec</i> (98%), <b>Mammalia</b> , exp. infection in insects; <i>Vavraiaculicis</i> (97%), <i>V. oncooperae</i> (96%), <b>Insecta</b> : Diptera, Lepidoptera  |
| <i>T. hominis</i>            | Глаз, мышцы                        | Неизвестна; Эксп.зарж: Insecta                  |   |
| <i>T. anthropoptera</i>      | Глаз, мозг, диссемин.              |   |   |
| <b>Vittaforma</b>            |                                    |   | <i>Endoreticulatus</i> spp. (89%), <i>Cystosporogenus</i> sp.(98%), <b>Insecta</b> : Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera  |
| <i>V. corneae</i>            | Глаз                               | Неизвестна<br>Эксп.зарж: Mammalia               |   |
| <b>Endoreticulatus group</b> |                                    |   | <i>Endoreticulatus</i> spp. (83-91%), <b>Insecta</b> : Lepidoptera  |
| <i>Microsporidium</i> sp.    | Мышцы                              | Неизвестна                                      |   |
| <b>Pleistophora</b>          |                                    |   | <i>Pleistophora</i> spp., <b>Actinopterygii</b>   |
| <i>P. ronneafiei</i> *       | Мышцы                              | Неизвестна                                      |   |
| <i>Pleistophora</i> sp.*     |                                    | Неизвестна                                      |   |
| <b>Nosema</b>                |                                    |   | Идентификация вызывает сомнения ( <i>V. corneae</i> ?)<br>Электронная микроскопия и молекулярные данные отсутствуют.  |
| <i>N. ocularum</i> *         | Глаз                               |   |   |
| <b>Microsporidium</b>        |                                    |   |   |
| <i>M. africanus</i> *        | Глаз                               |   |   |
| <i>M. ceilonensis</i> *      |                                    |   |   |

<sup>1</sup>Источники: Cali, Takvorian, 2003; Cali et al., 1998, 2005; Cheney et al., 2000; Docker et al., 1997; Franzen et al., 2006a, 2006b; Koudela et al., 1998; Lange et al., 2009; Nylund et al., 2010; Pilarska et al., 2015; Plischuk et al., 2015; Richter et al., 2013; Sokolova et al., 2007, 2010, 2016; Suankratay et al., 2012; Tokarev et al., 2017; Tourtip et al., 2009; Vávra et al., 2006, 2011; Weiss, 2014. <sup>2</sup> Ссылки см. в: Соколова, 2015. \*Молекулярные данные отсутствуют; сокращения: диссемин., диссеминирующая инфекция; желч. пузырь, желчный пузырь; жкт, желудочно-кишечный тракт.

отрядов Psocoptera, Phthiraptera и родственных им группах, а также в других эктопаразитических и кровососущих насекомых (блохи, постельные клопы, двукрылые и гематофаги-чешуекрылые) и в Asarina, укажут на конкретные паразито-хозяйинные системы, служившие источниками перехода микроспоридий к паразитизму в теплокровных животных, а также на возможные риски заражения. Только представители рода *Encephalitozoon* и *E. bieneusi* сумели преодолеть температурный барьер и гуморальный иммунитет – два центральных фактора, сдерживающих распространение микроспоридий у теплокровных (Sokolova, 2015; Sokolova et al., 2010; Stentiford et al., 2016).

### 3.5 Заключение по главе 3

На основе изучения ультраструктуры более 20 видов микроспоридий, включая двух представителей базальной группы Metchnikovellidae, а также *Paramicrosporidium* sp. (Rozellamycota), продемонстрирована структурная гомология органелл, представляющих собой модификации аппарата Гольджи: инвазионной трубки парамикроспоридий, манубриума мечниковеллид и центрального компонента экструзивного аппарата высших микроспоридий – полярной трубки, основной синапоморфии, обеспечившей широкое распространение микроспоридий как внутриклеточных паразитов почти всех групп билатеральных животных. Изученные виды принадлежат ко всем пяти известным филогенетическим группам (суперкладам) типа Microsporidia и паразитируют в различных тканях беспозвоночных и позвоночных хозяев, обитающих в разнообразных сухопутных и водных местообитаниях (Рис. ПЗ-7). Анализ многообразия изученных природных форм позволил оценить размах варибельности клеточной организации и выявить морфологические корреляты видообразования внутри отдельных групп микроспоридий. Полученные данные демонстрируют, что диверсификация микроспоридий, как и других паразитов, в целом следует за диверсификацией хозяев, а направления приспособительной эволюции в изученных таксонах определяются (1) типом паразитируемой ткани, т.е. различные признаки ультраструктуры и патогенеза реализуются в зависимости от локализации в эпителии кишечника, в его придатках, мускулатуре, адипоцитах или макрофагах; (2) жизненными циклами и экологическими предпочтениями хозяина, которые могут быть связаны с наличием промежуточного хозяина, формированием спор различного строения, чередованием морфотипов спор и типов развития; и (3) местообитанием хозяина – так для паразитов всесветно распространённых морских Descaroda характерно формирование «клинов» постепенно изменяющихся видов со слабо выраженными морфологическими и генетическими различиями. Выделение и характеристика нового

вида рода *Encephalitozoon* из агамы (Sokolova et al., 2016), анализ распространённости микроспоридий у рептилий и изучение филогенетических связей описанного вида с другими представителями рода *Encephalitozoon*, к которому принадлежат практически значимые паразиты сельскохозяйственных животных и человека (*E. cuniculum*, *E. hellem* и *E. intestinalis*), показало древние корни паразитирования рода *Encephalitozoon* у позвоночных животных, в отличие от всех других родов микроспоридий, филогенетически связанных с беспозвоночными хозяевами.

Впервые проведена идентификацию микроспоридий человека в России на небольшой экспериментальной группе ВИЧ-инфицированных пациентов и получены новые результаты по биоразнообразию микроспоридий человека. Возбудители микроспоридиозов человека экологически и эволюционно связаны с видами, паразитирующими в животных, и именно анализу этих связей была посвящена серия теоретических работ автора, выводы из которых изложены в последнем разделе главы.

Изучение ультраструктуры, жизненных циклов и молекулярной филогении разнообразных видов не только расширило знания о цитологии микроспоридий и показало разнообразие и одновременно единство их клеточной организации, но и помогло сформулировать задачи для дальнейших исследований. Какие же особенности клеточной организации и биологии «высших» микроспоридий определили их эволюционный успех и более широкое распространение среди беспозвоночных животных по сравнению с многочисленными кладами родственных Cryptomycota и базальных микроспоридий, представленными в настоящее время *Paramicrosporidium*, *Nucleophaga*, *Mitosporidium* и мечниковеллидами? Уникальным молекулярным и биохимическим адаптациям микроспоридий посвящено множество статей и обзоров (Williams et al., 2014), однако многие моменты остаются неясными, и еще больше субклеточных адаптаций, вероятно, предстоит открыть и изучить. На основании изучения морфологии и клеточной биологии микроспоридий, частично представленных в этой главе, можно выделить две принципиальных причины успешности микроспоридий. Это, во-первых, усовершенствование способа заражения клетки с помощью аппарата экстрезии, в котором центральную роль играет полярная трубка, состоящая из уникальных белков, способных к самосборке. Во-вторых, с точки зрения паразито-хозяйинных отношений, успешность микроспоридий как паразитов связана со способностью модулировать клеточный цикл хозяина, в частности, противодействуя естественным процессам гибели клетки-хозяина, а также способности развиваться в фагоцитирующих клетках. Именно способность индуцировать фагоцитоз и размножаться в фагоцитах помогла предками *Encephalitozoon* перейти к паразитированию в теплокровных. В связи с

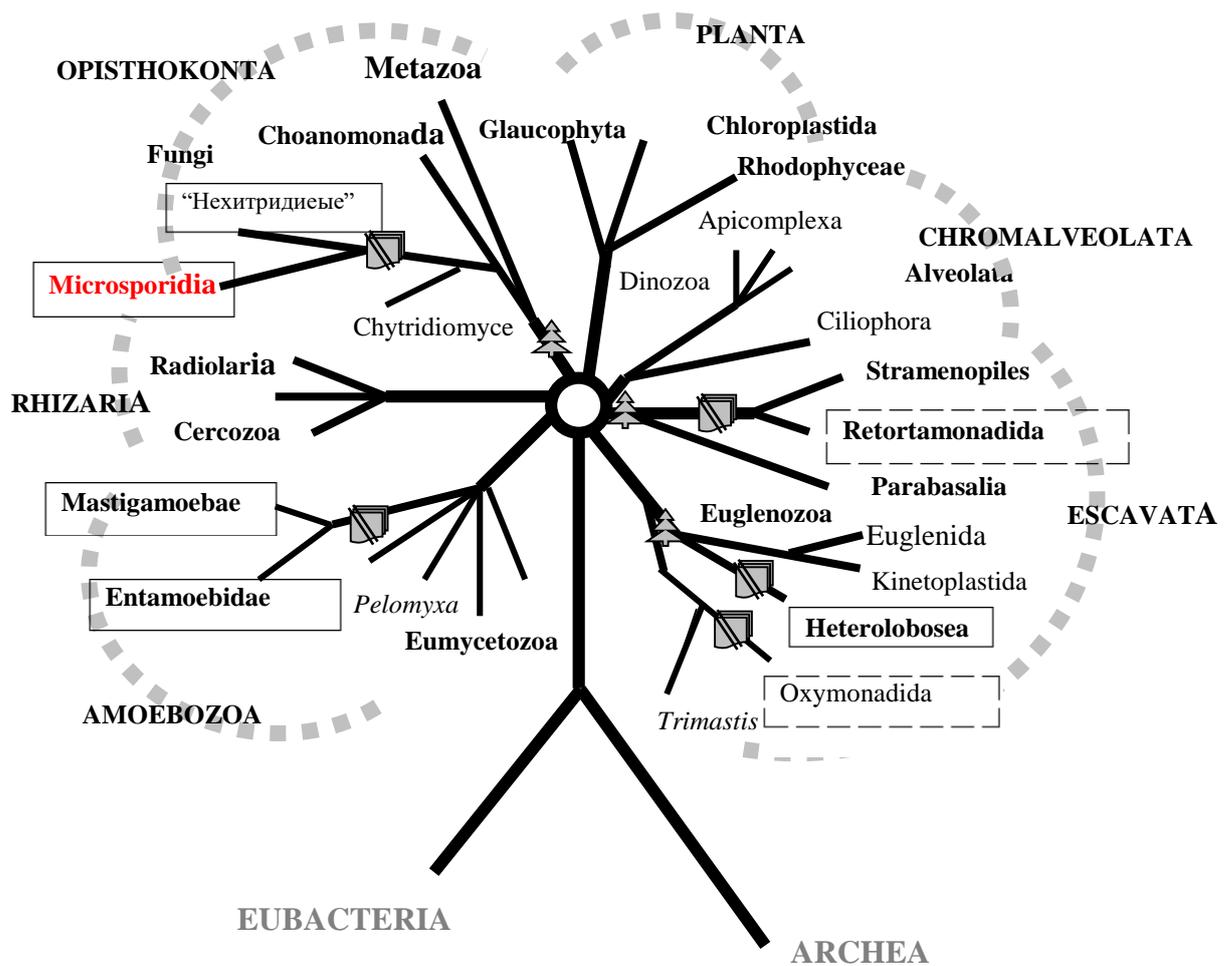
вышеупомянутым, в наших экспериментальных исследованиях мы сфокусировали усилия на изучении секреторной системы микроспоридий, непосредственно связанной с формированием аппарата экстррузии, а также на феномене ингибирования микроспоридиями апоптозного каскада клетки хозяина, одной из самых древних защитных клеточных реакций. Этим вопросам посвящены 4-ая и 5-ая главы диссертации.

## ГЛАВА 4. АППАРАТ ГОЛЬДЖИ И СЕКРЕТОРНЫЙ ТРАНСПОРТ МИКРОСПОРИДИЙ

### 4.1 Особенности структурно-функциональной организации аппарата Гольджи микроспоридий по сравнению с другими эукариотами

Аппарат Гольджи (АГ) регулирует процессы секреторного транспорта. В АГ белки и липиды сортируются и подвергаются пост-трансляционной модификации, главным образом, гликозилированию специфическими гликозидазами и трансферазами (Rothman, 1994). Разделение двух мембранных доменов – эндоплазматического ретикулума (ЭР) и его части, ядерной оболочки, и плазматической мембраны (ПМ), отличает эукариот от прокариота, и первичная функция Гольджи как раз и состоит в поддержании химического состава ПМ (Schekman, 1994). Разделение мембранных доменов произошло в процессе эволюции предковой формы эубактерий, предположительно актинобактерий, способных производить стеролы (что обеспечило способность к фаготрофии), в эукариотическую клетку и потребовало развития переходной системы мембран для транспорта белков и липидов от сайтов их биогенеза (ЭР) к ПМ (Becker, Melkonian, 1996; Mowbrey, Dacks, 2009). Предполагается, что АГ уже присутствовал в клетке гипотетического общего предка эукариот и, скорее всего, имеется в клетках всех существующих эукариотических организмов. Анализ морфологии АГ у ныне живущих представителей различных таксонов говорит в пользу того, что предковый АГ был организован в виде стопок (“stacks”) цистерн Гольджи, окружённых мембранными мешочками и пузырьками, подобных диктиосомам клеток современных млекопитающих и растений. В процессе приспособительной эволюции морфология АГ в неродственных кладах эукариот менялась независимо (Dacks, Doolittle, 2001; Mowbrey, Dacks, 2009). Таким образом, структурная организация Гольджи в клетках эукариотических организмов разных групп весьма разнообразна и определяется, в первую очередь, экологическими потребностями организмов. Особенно наглядно это разнообразие можно проследить на примере различных групп протистов (Табл. 2-1, Рис. 2-1) (Becker, Melkonian, 1996; Dacks et al., 2003; Dacks, Doolittle, 2001; Mowbrey, Dacks, 2009; Sokolova, Mironov, 2008; Соколова и др., 2007).

У микроспоридий так же, как и у представителей многих групп эукариот, например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и других нехитридиевых грибов, отсутствует «стаковая» организация Гольджи. Важно отметить, что её отсутствие не мешает, в частности, дрожжам, иметь сходные с клетками млекопитающих механизмы внутриклеточного транспорта (Beznoussenko et al., 2016; Morin-Ganet et al., 1998; Rambourg et al., 1995; Rambourg et al., 2001).



**Рисунок 4.1.** Кладограмма (Adl et al., 2005) отражает концепцию монофилетического происхождения эукариотической клетки от прокариотической и расхождение основных ветвей эукариот. Наиболее вероятные позиции корня (▲): основания ветвей, ведущих к кладам Parabasalia/Diplomonada и Opisthokonta. Таксоны, у которых отсутствует стаковая организации Гольджи (◻), обведены непрерывной линией. Биохимические, ультраструктурные или молекулярные свидетельства наличия АГ получены для всех таксонов, за исключением Retortamonada и Охумоната (прерывистая линией). Предполагается, что общий предок эукариот обладал диктиосомами Гольджи. В процессе эволюции АГ изменял морфологию по крайней мере пять раз (перечёркнутые «стопки»).

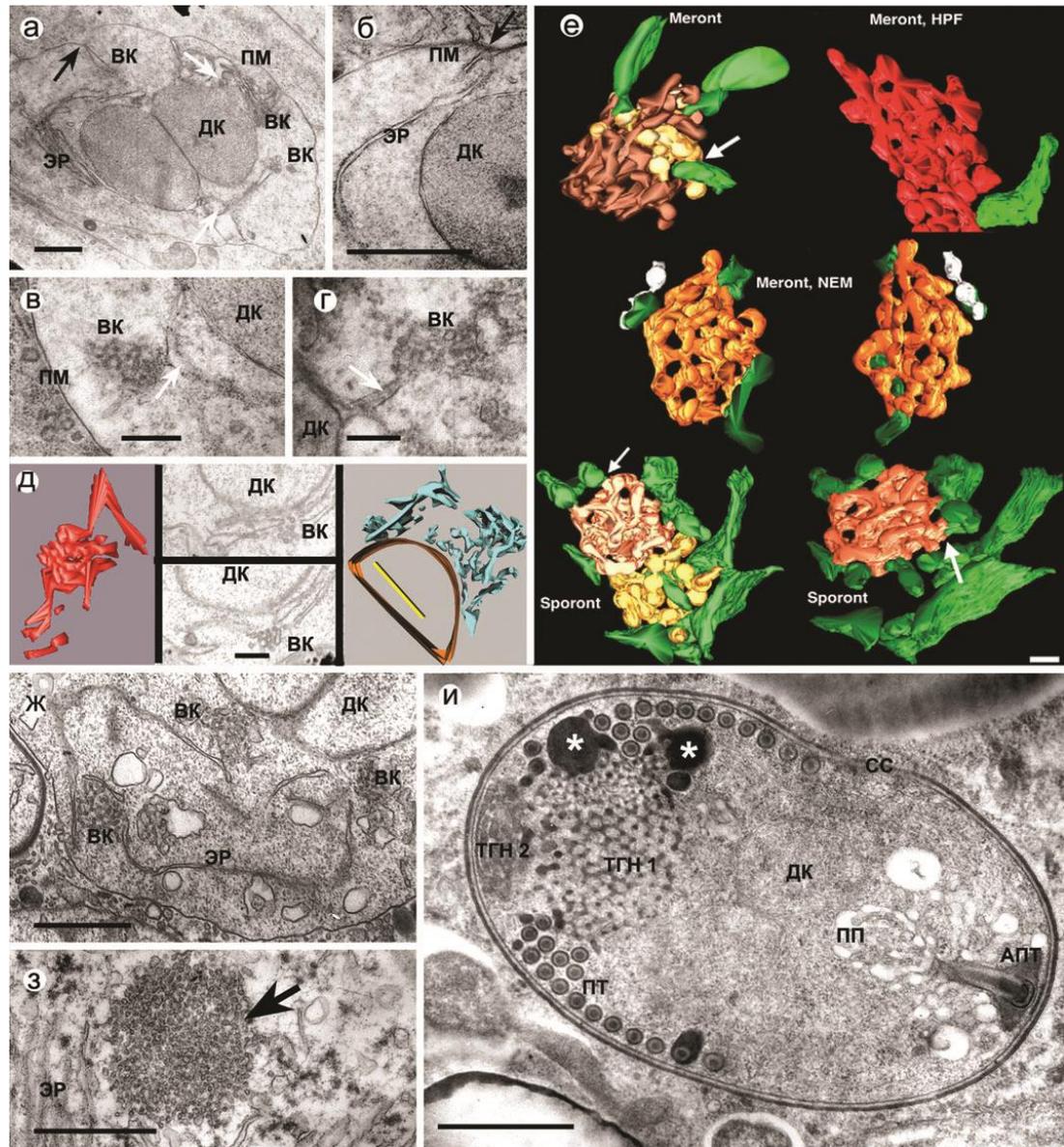
У простейших родов *Mastigamoeba* (Pelobionts), *Negleria* (Heterolobosea), *Entamoeba* (Entamoebids), *Giardia* (Diplomonadida), *Chilomastix* (Retortamonadida) (Dacks, Field, 2007; Ghosh et al., 2000; Lujan et al., 1995; Lujan, Touz, 2003; Manning-Cela et al., 2003; Marti, et al., 2003) стаки цистерн Гольджи также отсутствуют (Табл. П4-1, Рис. 4-1), что в своё время, наряду с отсутствием митохондрий, стало дополнительным аргументом в пользу «археозойной гипотезы» (Cavalier-Smith, 1993; Corliss, 1994; Vossbrinck et al.,

1987). Рутинный ультраструктурный анализ не позволял однозначно идентифицировать компоненты АГ у меронтов – ранних пролиферативных стадий микроспоридий. До наших исследований «примитивный везикулярный аппарат Гольджи микроспоридий» отмечался у споронтов и споробластов, главным образом, в связи с морфогенезом аппарата экстрюзии споры (Cali, Takvorian, 1999; Takvorian, Cali, 1996; Vávra, Larsson, 1999). В то же время, секреторная активность имеет место и на мерогональной стадии: наличие шероховатого и гладкого ЭР, а также многочисленные выросты, пузырьки и тубулы, отпочковывающиеся от плазмалеммы паразита в цитоплазму хозяина и характерные для многих изученных видов микроспоридий (Vávra, Larsson, 2014), свидетельствуют об интенсивном взаимодействии клетки паразита с клеткой хозяина, а биохимические данные о накоплении белков паразита в паразитофорной вакуоли (Ronnebaumer et al., 2008), в цитоплазме и даже в ядре клетки хозяина (Senderskiy et al., 2014), начиная с ранних стадий развития, доказывают, что секреция не ограничивается производством белков оболочки и полярной трубки спор поздними споронтами и споробластами. Накопленные данные по физиологии, биохимии и геномике микроспоридий позволяют сделать вывод о том, что секреторный транспорт играет важную роль в физиологии микроспоридий в период их внутриклеточного развития. Он обеспечивает сортировку, модификацию и транспорт к сайтам конечной локализации (1) белков, секретлируемых в клетку хозяина для создания благоприятной для паразита среды обитания, (2) трансмембранных белков-переносчиков, модулирующих транспорт ресурсов хозяина для обеспечения паразита АТФ и другими молекулами хозяина, необходимыми для жизнедеятельности паразита, а также (3) белков аппарата экстрюзии (полярной трубки и полярного сака) и оболочки стадий спорогонии (Williams et al., 2014). Задачей автора диссертации было изучить организацию секреторного компартмента у микроспоридий, в особенности, на ранних стадиях жизненного цикла, не изученных в этом отношении.

#### **4.2 Ультраструктурная организация тубулярных сетей (ТС) – аппарата Гольджи микроспоридий и модификации ТС в ходе жизненного цикла**

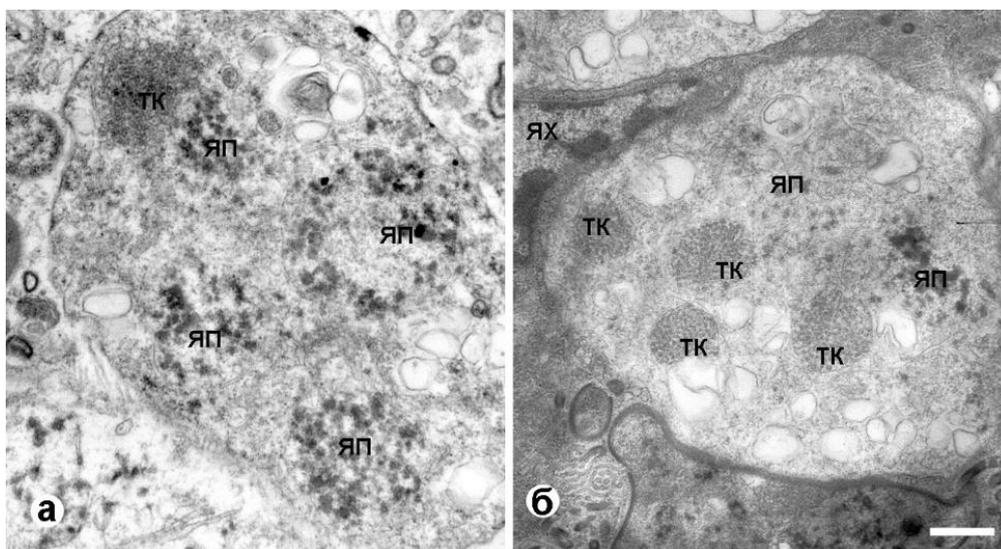
На модельной системе *Gryllus bimaculatus* – *Paranosema (Nosema) grylli*, используя комбинации стандартной электронной микроскопии (ЭМ), ультраструктурной цитохимии, трёхмерной реконструкции серийных ультратонких срезов, а также электронной томографии толстых (150-200 нм) срезов, было показано, что небольшие (300-900 нм) скопления округлых или овальных мембранных профилей 25-50 нм в диаметре, наблюдаемых вблизи цистерн ЭР и связанных с перинуклеарным пространством, представляют собой гомологи диктиосом аппарата Гольджи. В

дальнейшем изложении эти структуры названы «везикулярными кластерами» (ВК), хотя структуры, на срезах выглядевшие как везикулы, при объёмной реконструкции серийных срезов оказались разветвлённой сетью гладких и варикозных тубул. Количество ВК на клетку варьировало от 1 до 8. Трёхмерная реконструкция ВК показала, что каждый кластер состоит из двух частей. Первая часть представляет собой разветвлённую сеть гладких трубочек 30-45 нм в диаметре, вторая – менее разветвлённую сеть трубочек с неравномерно утолщёнными стенками («варикозные трубочки»), со средним диаметром 25 нм. В меронтах эти структуры были немного меньше (300 - 700 нм), чем в споронтах (500 - 900 нм) (Рис. 4.2.) Также доля варикозных трубочек в споронтах почти двукратно возросла по сравнению с меронтами. По-видимому, именно в везикулярных кластерах осуществляется сортировка и модификация белков, экспортируемых на преспорогональных стадиях развития. Не исключено также, что часть белков экспортируется непосредственно из ЭР компартмента, минуя АГ, как это описано у других простейших и у прокариот (Marti et al., 2003), так как слияние цистерн гладкого ЭР с плазматической мембраной периодически наблюдалось на ультратонких срезах (Рис. 4.2 а-г). На последней преспорогональной стадии жизненного цикла *P. grylli* («поздний меронт» или «меронт/споронт промежуточная стадия»), становятся заметны более крупные кластеры везикул, окружённые цистернами гладкого ЭР и также изначально связанные с расширенными участками перинуклеарного пространства (Рис. 4.2 з). Они обозначены термином «тубулярные кластеры» (ТК), в отличие от везикулярных кластеров меронтов и ранних споронтов. Количество ТК соответствовало числу ядер в клетке, и в большинстве клеток наблюдался один такой кластер. В жизненном цикле *P. grylli* присутствует кратковременная 4-х ядерная стадия, т.е. в позднем меронте диплокарион делится надвое, происходит расхождение его ядер, после чего диплокариотическая структура ядра быстро восстанавливается. Тогда же становятся заметны синаптомембранные комплексы, маркеры мейоза, что свидетельствует о наличии полового процесса в этот период жизненного цикла *P. grylli* (Nassonova, Smirnov, 2005). Характерно, что на 4-х-ядерной стадии около каждого ядра находится по одному тубулярному кластеру, т.е. в клетке в это время присутствует 4 тубулярных кластера (Рис. 4-3), что говорит о взаимосвязи генерации АГ в дочерних клетках с делением ядра материнского меронта. Эти данные, как и результаты, полученные на других протистах, подтверждают одну из гипотез, согласно которой генезис АГ происходит de novo при делении клетки и топографически связан с клеточными центрами (ЦОМТами) (Hager et al., 1999). У некоторых видов вблизи от центриолярных пластинок (ЦОМТов



**Рисунок 4-2.** Ультраструктурная организация секреторного компартмента *Paranosema grylli*. **а-г.** Элементы секреторного компартмента зрелых меронтов, выявленные на толстых (150-200 нм) срезах при ускоряющем напряжении 200 кВ. Фиксация восстановленным осмием (2% ферроцианид калия + 2% четырехокись осмия), пост-фиксация 1% таниновой кислотой. **а.** В поле зрения 3 «везикулярных» кластера (ВК). ВК соединены с перинуклеарным пространством (белые стрелки) и с плазматической мембраной (черная стрелка). **б.** Черная стрелка указывает на соединение цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭР) с плазматической мембраной (ПМ). **в, г.** В поле зрения контакты ВК с цистернами ЭР – дериватами перинуклеарного пространства (белые стрелки). **д.** Компьютерная реконструкция везикулярного кластера (показан в двух проекциях) по 20 последовательным тонким (80 нм) срезам (программа IGL trace and 3D Viewer (Буданцев, 2009)). В центре – изображения крайних срезов через ВК. ВК представляет собой единую сеть тубулярных компонентов, соединённых с перинуклеарным пространством (белые стрелки). **е.** Трёхмерные реконструкции виртуальных срезов через тубулярные кластеры меронтов и споронтов, построенные с помощью метода ЭМ томографии. Клетки жирового тела сверчка фиксированы стандартным методом, за исключением правого верхнего изображения (Меронт, HPF), полученного со срезов ткани, быстро замороженной под высоким давлением (High Pressure Freezing), с последующей фиксацией методом замораживания-замещения. Средний ряд (Меронты, NEM) представляет собой изображения везикулярных кластеров (ВК) меронтов, предварительно обработанных NEM (блокирует формирование везикул) в течении

15 мин. Все ВК меронтов и споронтов представляют собой непрерывные тубулярные сети, разделённые на гладкие (окрашены в коричневый и красный цвета) и варикозные (окрашены жёлтым) участки. Места соединения тубулярных сетей с ЭР (окрашен зелёным) указаны стрелками. **ж-и.** Тонкие срезы через разные стадии жизненного цикла *P. grylli* (фиксация и постфиксация как указано для рис. **а-г**). **ж.** Везикулярные кластеры меронтов – конгломераты мембранных профилей 20-40 нм в диаметре, соединённых с перинуклеарным пространством и ЭР цистернами. **з.** В цитоплазме меронт-споронт промежуточной стадии появляется более крупный «тубулярный кластер» (ТК) (стрелка), который в дальнейшем трансформируется в тубулярную сеть, связанную с морфогенезом элементов аппарата экстрюзии. **и.** Поздний секреторный компартмент (транс Гольджи) споробласта заполняет почти всю клетку и представлен (а) тубулярной сетью, в которой различимы гладкий (ТГН1) и варикозный (ТГН2) участки; (б) вытянутой и свёрнутой под оболочкой споробласта цистерной, содержащей полярную трубку (ПТ), соединённой с ТГН2, а также (в) контейнер с апикальной частью аппарата экстрюзии – зачатком полярного диска и апикальной частью полярной трубки (АПТ). Этот контейнер связан с зачатком поляропласта (ПП). Звёздочкой отмечены электронно-плотные гранулы, содержащие белок полярной трубки. **Обозначения:** АПТ, апикальная часть ПТ; ВК, везикулярный комплекс; ДК, диплокарион; ПМ, плазматическая мембрана; ПП, зачаток поляропласта; ТС, тубулярная сеть; ЭР, эндоплазматический ретикулум. **Масштаб:** **а-б,** 250 нм; **в-е,** 100 нм; **ж-з,** 500 нм; **и,** 1 нм.



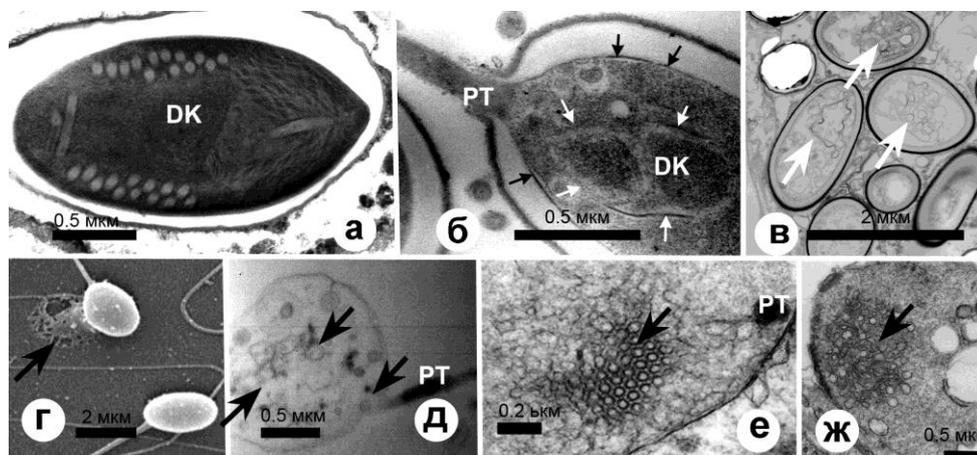
**Рисунок 4-3.** Тубулярные кластеры *P. grylli* (а) на 4-х-ядерной меронт-споронт промежуточной стадии. Около каждого из ядер (ЯП) находится по одному тубулярному кластеру (ТК), т.е. в клетке в это время присутствует 4 тубулярных кластера. (б). При делении материнской клетки каждый дочерний споронт получает по одному ТК. Эти данные подтверждают гипотезу, соответственно которой генезис АГ происходит de novo при делении клетки. ЯП, ядро паразита; ЯХ, ядро хозяина. Масштаб: 500 нм.

микроспоридий) описаны скопления округлых мембранных профилей, отделяющихся от ядерной мембраны (Vávra, Larsson, 1999, 2014), которые, возможно, служат зачатком ТК микроспоридий. В каждом зрелом споронте присутствует по одному ТК. По мере прохождения спорогонии эти кластеры увеличиваются в размере, и тубулярная организация составляющих их мембранных профилей становится все более заметной. В молодых споробластах (или поздних споронтах) тубулярный кластер теряет связь с ядром и мигрирует к дистальному концу клетки. На стадии споробласта везикулярный

кластер трансформируется в тубулярную сеть, описанную ранее как компартмент «с биохимическими свойствами транс-Гольджи» (Takvorian, Cali, 1994) или транс-Гольджи тубулярную сеть (Sokolova et al., 2001). Тубулярная сеть споробластов, в свою очередь, даёт начало цистернам, в которых формируется полярная трубка (ПТ) (Рис. 4.2). Характерно, что у *P. grylli* и других изученных автором микроспоридий созревающие элементы аппарата экструзии локализуются в двух обособленных компартментах: один содержит зачатки дистального конца ПТ, другой – зачатки апикальных структур споры: полярного сака, полярной шапочки и апикальной части ПТ, примыкающая к якорному диску (Рис. 4.2). Происходят ли оба компартмента из одного тубулярного кластера, связаны ли эти компартменты между собой, и как происходит их объединение для формирования функциональной полярной трубки в зрелой споре, выяснить не удалось. На стадии позднего споробласта элементы АГ заполняют практически всю клетку паразита (Рис. 4.2). Это (1) разветвлённая сеть трубчатых и варикозных тубулярных структур (на Рис. 4.2, ТС1 и ТС2), (2) одна или несколько глобул, состоящих из электронно-плотного материала, по всей видимости, запас материала ПТ, (3) вытянутая и свёрнутая спиралью цистерна – зачаток дистальной части ПТ, и (4) саккула, содержащая зачаток полярной шапочки и якорного диска с апикальной частью ПТ. Эта саккула в зрелой споре преобразуется в полярный сак, который так же, как и спиральная цистерна полярной трубки, остаётся внутри оболочки споры после выброса спороплазмы. В споробластах всех изученных «высших» микроспоридий (Microsporea Sprague, 1977) зачатки аппарата экструзии выглядят сходным образом, в то время как структура зрелых спор весьма изменчива. Полярная трубка «высших» микроспоридий гомологична разветвлённой манубриальной цистерне мечниковеллид (Глава 3) и может рассматриваться как ТС споры. Число витков ПТ варьирует у разных микроспоридий от 0 до нескольких десятков витков, расположенных в 1-2-3 и более рядов. Кроме того, запас белков ПТ может присутствовать в зрелой споре некоторых видов микроспоридий в виде «постеросомы», состоящей из мембранных тубулярных структур разного диаметра и также относящейся к структурам АГ споры (Weiser, Zizka, 1974; Vávra, Larsson, 2014). Число витков ПТ может быть одинаковым в молодых и зрелых спорах, а может возрасти по мере созревания спор. Форма и размер якорного диска, полярного сака, число, структура и угол наклона витков ПФ относительно оси споры относятся к диагностическим признакам родов и видов микроспоридий.

Недавно продемонстрировано, что структура с функцией АГ присутствует и в спороплазме микроспоридии *Anncaliia algerae*. В органелле MIN (multilayered interlaced network, многослойная разветвлённая сеть) (см. Главу 1) выявлены маркеры позднего

Гольджи, нуклеозид дифосфатаза и тиамин пиррофосфатаза. Трёхмерная реконструкция с помощью томографии показала, что MIN организована в виде уплощённых цистерн, связанных переплетающимися тубулами и саккулами, соединенными с плазматической мембраной (Takvorian et al., 2013). Эти авторы предположили, что MIN участвует в секреции компонентов клеточной стенки, которые у этого вида формируются уже на стадии ранних меронтов, а также что формирование Гольджи-подобной структуры у спороплазм – это уникальная адаптация, характерная исключительно для *A. algerae*. Однако, скорее всего, все микроспоридии нуждаются в подобной органелле, способной быстро модифицировать плазматическую мембрану спороплазмы после попадания в клетку хозяина. К сожалению, методические подходы к экспериментальной работе со спороплазмами ещё не разработаны, и наши знания об этой кратковременной стадии жизненного цикла ограничены случайными находками. Против уникальности MIN-подобной структуры, описанной у *A. algerae*, говорит тот факт, что подобная структура найдена нами у спороплазм и ранних меронтов микроспоридии огненных муравьёв *Kneallhazia solenopsae* (Рис. 4-4) (Sokolova, Fuxa, 2008). У обоих видов MIN-структуры наблюдались вблизи дистального конца полярной трубки сразу после внедрения спороплазмы в клетку хозяина. *K. solenopsae* не имеет в своём жизненном цикле стадии «толстостенного меронта», подобно *A. algerae*.



**Рисунок 4-4. Экструзия и ультраструктура спороплазмы.** а. Зрелая спора *P. grylli*. б. Спора *P. grylli* в процессе экструзии. Белые стрелки указывают на мембранные структуры (производные поляропласта), ограничивающие спороплазму. Мембрана споры (черные стрелки) остается внутри оболочки споры после выстреливания. в. Оболочки спор *Kneallhazia solenopsae* после выброса спороплазмы. Стрелки указывают на многочисленные мембранные структуры. г. Две споры с выброшенными нитями и спороплазма *Sprague lophii* в сканирующий электронный микроскоп (споры любезно предоставлены Earl Weidner). Стрелка указывает на вакуолизованный участок цитоплазмы на периферии споры, соответствующий тубулярной сети MIN-аппарату Гольджи спороплазм. д. Спороплазма *P. grylli* с мембранными профилями (стрелки), предположительно, производными сети MIN, разрушившейся в результате осмотического шока. е-ж. Сеть мембранных тубул (MIN) в спороплазмах *K. solenopsae* (стрелки). DK, диплокарион; PT, полярная трубка.

Эти два вида микроспоридий вообще не похожи ни по морфологии, ни по экологии, за исключением присутствия MIN органеллы в спороплазмах (Franzen et al., 2006; Sokolova, Fuxa, 2008). Интересно, что при всей непохожести, филогенетический анализ, основанный на сиквенсе МСрРНК, объединяет их в одну кладу (Sokolova, Fuxa, 2008). Возможно, морфологическое сходство организации секреторного компартмента на стадии спороплазм отражает генетическое родство этих видов. В опытах с экструзией у *P. grylli* (Рис. 4-4) и у других видов также наблюдались многочисленные мембранные структуры в спороплазмах – возможно, это остатки MIN, подвергшейся разбуханию и распаду из-за неадекватных условий содержания выстреленных спороплазм, например, слишком гипотоничной среды. Таким образом, скорее всего, и на стадии спороплазмы секреторный компартмент микроспоридий организован в виде тубулярных сетей.

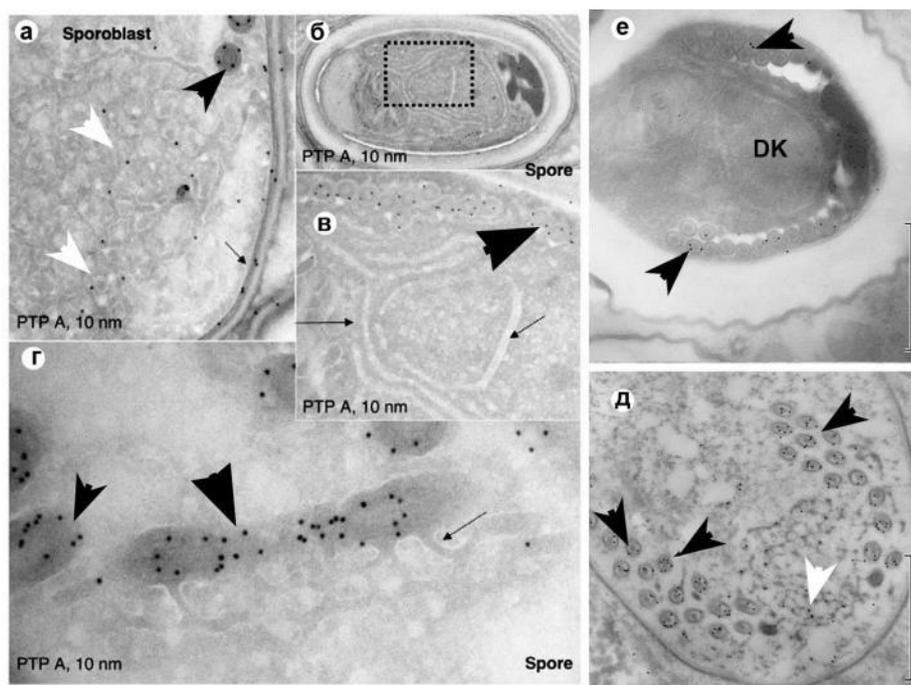
### **4.3 Морфофункциональные доказательства функций Гольджи у ТС**

#### **4.3.1 В ТС концентрируются секреторные белки микроспоридий**

Серией исследований была проверена гипотеза о том, что если везикулярные и тубулярные кластеры меронтов и споронтов представляют собой Аппарат Гольджи (АГ), то в них должны концентрироваться секреторные белки, как это происходит в АГ млекопитающих и дрожжей. Основные секреторные продукты микроспоридий – это белки полярной трубки и оболочки спор. Задолго до наших исследований было показано, что аппарат экструзии формируется на поздних стадиях спорогонии в «Гольджи-подобных цистернах с цитохимическими функциями транс-Гольджи» (Takvorian, Cali, 1994, 1996). Мы же с помощью очищенных поликлональных антител, полученных ранее группой В.В. Долгих против трех белков полярной трубки *P. grylli* (БПТ А, БПТ В и БПТ С) (Dolgikh et al., 2005), продемонстрировали методом иммунной электронной микроскопии, что эти белки начинают концентрироваться в тубулярных сетях поздних споронтов. В меронтах уровень метки, конъюгированной с БПТ А, находился на уровне «фона» (Табл. 4-1). В споробластах концентрация БПТ резко возрастала, и метка локализовалась в цистернах с зачатками аппарата экструзии, как в апикальном, так и в дистальном конце клетки. При этом она исчезала из тубулярной сети по мере формирования структур зрелой споры (Рис. 4-5). В спорах антитела интенсивно окрашивали все участки полярной трубки. Антитела к БПТ А окрашивали также и оболочку спор (Рис. 4-5а). Интересно, что более ранними пилотными исследованиями с использованием моноклональных антител к оболочке спор также показано, что одно из моноклональных антител, полученных на поверхностные антигены спор, окрашивало как оболочку споры, так и полярную трубку (Sokolova et al., 2000). Учитывая высокий уровень гликозилирования изученных белков полярной трубки и оболочки спор, этот

феномен можно объяснить присутствием сходных карбогидратных антигенов в молекулах БПТ А и одного из белков оболочки спор.

Показано, что основной белок оболочки спор *P. grylli*, р40 (охарактеризован ранее, Seleznev et al., 1995), начинает накапливаться уже в везикулярных кластерах меронтов. Его концентрация возрастает у споронтов (Табл. 4-1). В споробластах антитела к р40 концентрируются в периферической части сети тубулярных структур и в оболочке паразита, а у поздних споробластов и спор – исключительно в оболочке. Белок р40 – это белок экзоспоры, т.е. внешней оболочки споры (Рис. 4-6), которая начинает формироваться с самого начала спорогонии, поэтому не удивительно, что уже у поздних меронтов этот белок накапливается в секреторном компартменте. Характерно, что этот белок также ассоциирован с мембрано-подобными структурами (Рис. 4-6), выявляемыми в клетках жирового тела сверчка при переходе *P. grylli* к спорогонии. Скорее всего, эти структуры представляют собой избыток оболочки паразита, высвобождающийся при формировании спор (Bezoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2005).

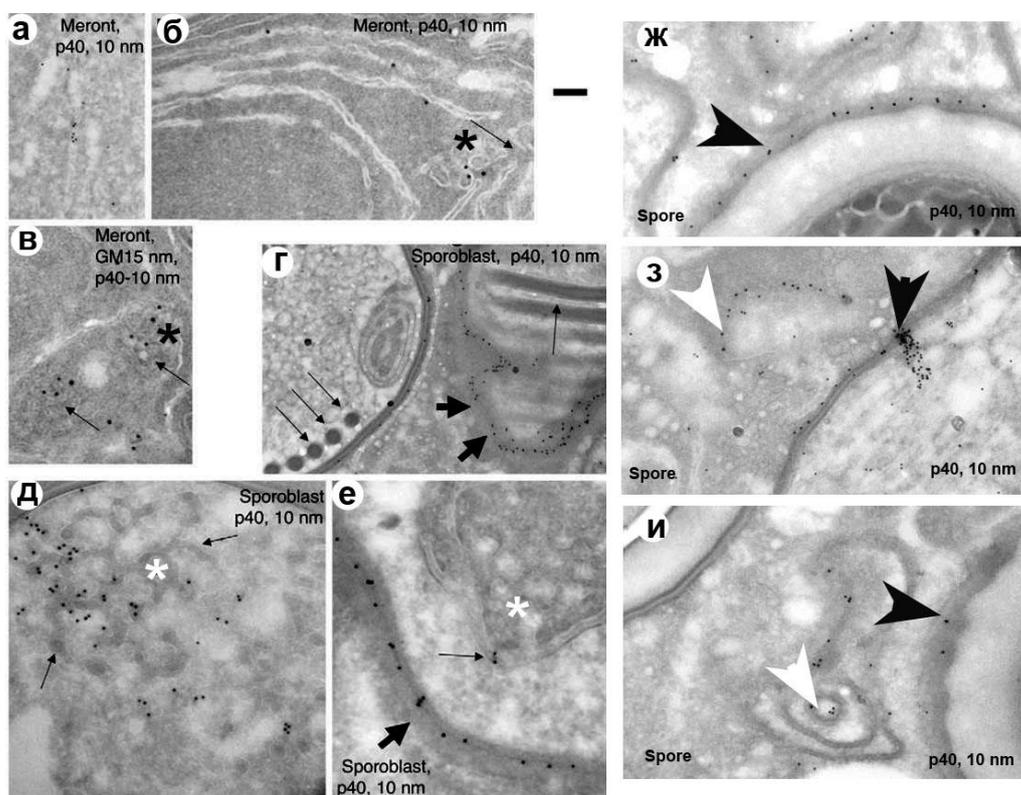


**Рисунок 4-5. Концентрация белка полярной трубки (ПТ) РТРА в тубулярных сетях (ТС) споробластов и спор *P. grylli*.** а, д. Иммуноэлектронная микроскопия (метка: 10 нм золото–антитела к РТРА) на замороженных срезах (а-г) и на срезах, залитых в LR White (д-е). б-г. Споробласты. е. Споры. В споробластах метка локализуется в ТС (белые наконечники) и в цистернах с зачатками ПТ (черные наконечники), но не в цистернах ЭР (тонкие стрелки, в-г). Метка исчезает из ТС по мере созревания споры. Некоторое количество метки локализуется в оболочке споробласта (короткая тонкая стрелка, а) за счёт сходных карбогидратных групп РТРА и одного из белков оболочки. В спорах антитела интенсивно окрашивали все участки ПТ. Масштаб: а, в, 100 нм; б, 300 нм; г, 70 нм; е-д, 500 нм.

**Таблица 4-1.** Плотность частиц золота, связанных с антителами против белка оболочки спор р40 и белка полярной трубки РТР А в мембранных структурах различных стадий микроспоридий

| Плотность мечения (% ЭР ± СО) |            |            |             |                |
|-------------------------------|------------|------------|-------------|----------------|
| Белок (n)                     | ЭР, меронт | ВК, меронт | ПМ, споронт | ПТ, споробласт |
| р40 (31)                      | 100±21     | 298±40*    | 657±72*     | --             |
| РТР А (29)                    | 100±25     | --         | 432±63*     | 1254±67*       |

n, число проанализированных везикулярных кластеров (ВК); -- нет результатов; ЭР, эндоплазматический ретикулум, ПМ, плазматическая мембрана; ПТ, полярная трубка; СО, стандартная ошибка. Данные нормализованы относительно средней плотности мечения цистерн ЭР, взятой за 100%. \*значение достоверно отличается от значения метки в ЭР.

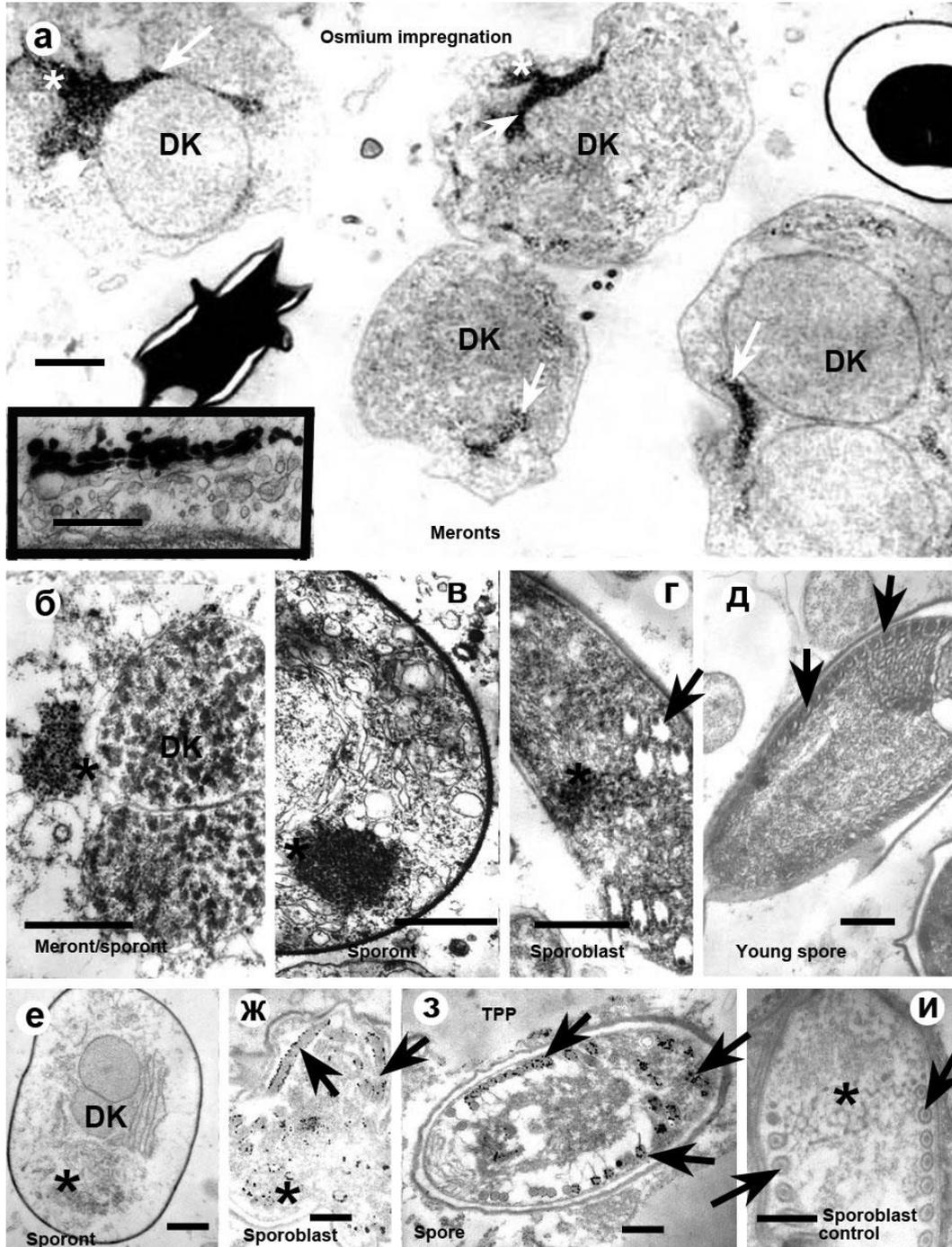


**Рисунок 4-6.** Концентрация р40, белка внешней оболочки спор (экзоспоры) в тубулярных сетях *P. grylli*. Иммуноэлектронная микроскопия на замороженных срезах. **а-в.** Белок р40 начинает концентрироваться в везикулярных кластерах (чёрная звёздочка) меронтов, связанных с ЭР (тонкие стрелки, **а-в**). В меронтах р40 ко-локализуется с белком GM130, маркером цис-Гольджи (**в**). В споронтах и споробластах р40 концентрируется в тубулярных кластерах (белые звёздочки, тонкие стрелки, **д-е**), но не на витках полярной трубки (тонкие стрелки, **г**) и на оболочке спор (толстые стрелки, **г-е**). В спорах р40 накапливается в экзоспоре (черные наконечники, **ж-и**) и в мембранных структурах клетки хозяина (белые наконечники, **з-и**). Масштаб: **а-г, е-и**, 80 нм; **д**, 90 нм.

4.3.2 ТС содержат специфические маркеры АГ и, следовательно, обладают его цитохимическими функциями

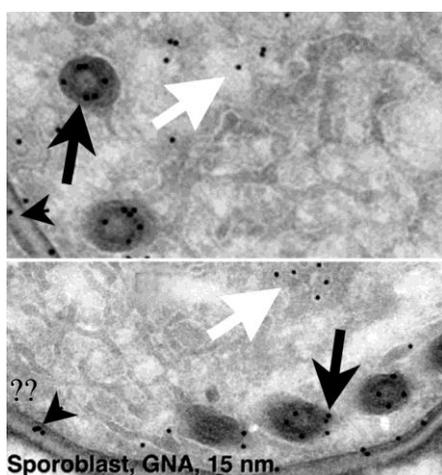
**Маркеры цис- и транс- Гольджи компартментов эукариот идентифицируют соответствующие зоны ТС микроспоридий.** Для идентификации цис-АГ был применен старый метод фиксации водным раствором четырехокси осмия в течение 24 часов (метод осмиевой импрегнации) (Novikoff, Goldfischer, 1961). Длительное импрегнирование приводит к отложению нерастворимых оксидов осмия в просветах цистерн цис-Гольджи в результате взаимодействия четырехокси осмия с альдегидными группами остатков сахаров, избирательно накапливающихся в этом компартменте. Показано, что участки перинуклеарного пространства, соединённые с цистернами ЭР, везикулярные кластеры меронтов и споронтов, тубулярные кластеры и сети споронтов и споробластов интенсивно окрашиваются «осмиевой чернью» (Рис. 4-7), что доказывает их принадлежность к цис-Гольджи (Sokolova et al., 2001; Sokolova, Mironov, 2008; Соколова et al., 2001). Мы не наблюдали окрашивание осмиевой чернью каких-либо структур в поздних споробластах и спорах, что может говорить об отсутствии в них цис-компартамента АГ. Для идентификации транс-Гольджи применили метод окрашивания тиамин пирофосфатазой (ТПФ) (Takvorian, Cali, 1994), специфическим цитохимическим маркером транс-Гольджи. Локализации ТПФ в тубулярной сети и в мембранных контейнерах, содержащих белки ПТ в споробластах и спорах, свидетельствует о том, что все эти компартменты выполняют функцию транс-Гольджи типичных эукариот. В то же время, ТПФ не выявлена на ранних пролиферативных стадиях (Рис. 4-7е). Возможно, ферменты транс-Гольджи не задействованы в процессинге белков, секретлируемых на ранних стадиях жизненного цикла микроспоридий, а их модификация происходит на уровне ЭР и цис-Гольджи.

Таким образом, ультраструктурный цитохимический анализ указывает на то, что компартаментализация АГ у микроспоридий происходит не в пространстве, или не только в пространстве, но и во времени. Интересно, что сходное разделение ранних и поздних компартментов АГ по стадиям жизненного цикла хозяина описано и для другого внутриклеточного паразита – *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa), вида, у которого секреторные пути формирования апикального комплекса досконально изучены (Hager et al., 1999). Авторы связывают такую необычную компартаментализацию во времени с маленькими размерами клетки внутриклеточного паразита, и эта интерпретация вполне подходит для микроспоридий. Что касается наших выводов, то нельзя исключить, что для выявления немногочисленных элементов цис-АГ на поздних стадиях и транс-АГ на ранних просто не хватило чувствительности использованных методов.



**Рисунок 4-7.** Цитохимические маркеры цис Гольджи (окраска осмиевой чернью, «osmium impregnation», а-д) и транс-Гольджи (окраска тиамин пирозинфатазой (ТПФ, е-и) идентифицируют различные тубулярные сети (ТС) микроспоридий. Участки перинуклеарного пространства, соединённые с ЭР (белые стрелки), везикулярные кластеры (белые звёздочки) и тубулярные кластеры (чёрные звёздочки) меронтов и споронтов окрашены осмием. Витки полярной трубки (чёрные стрелки), а также другие структуры в поздних споробластах и спорах не окрашены (д). В чёрной рамке положительный контроль: импрегнация цис Гольджи адипоцитов сверчка. ТПФ не выявлена в споронтах и меронтах (е), но присутствует в ТС и в мембранных контейнерах с ПТ (чёрные стрелки), в споробластах и спорах (ж, з). и, Отрицательный контроль (без субстрата). Масштаб: 500 нм.

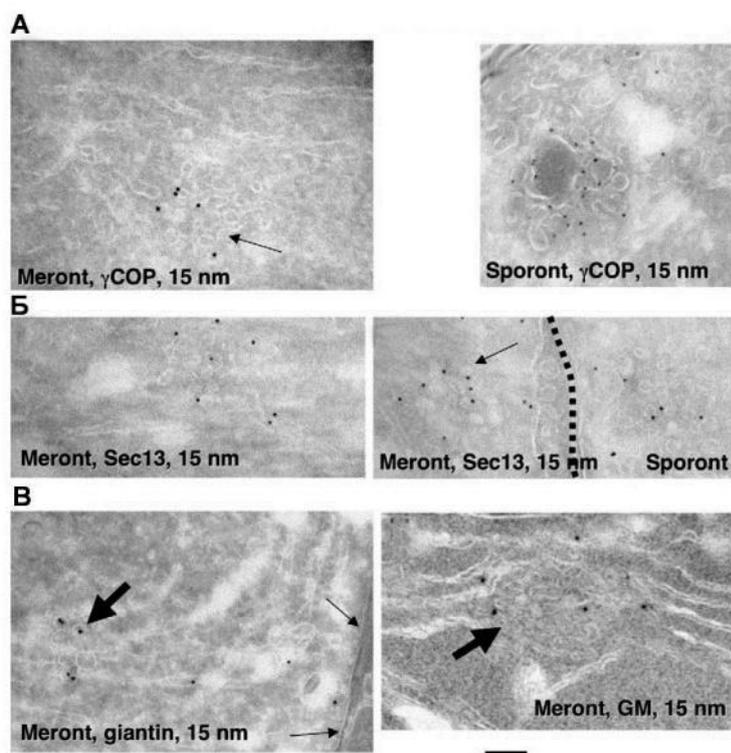
**Белки полярной трубки и клеточной стенки гликозилируются в ТС.** Ранее окрашиванием акриламидных гелей с белками стадий *P. grylli* реактивом Шифа было показано, что один из белков полярной трубки, РТР А (РТР-56) гликозилирован, причем даже в значительно большей степени, чем белки клетки хозяина (Dolgikh et al., 2005). Методом инкубирования белков микроспоридий с GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) лектином, связанным с агарозными шариками показано, что экстрагированный белок оболочки спор р40 связывался с манноза-специфичным GNA лектином. Это указывало на то, что белок р40 модифицировался маннозилтрансферазами микроспоридий, и мы предположили, что этот процесс должен происходить в Гольджи-подобном компартменте, т.к. по крайней мере одна из маннозил трансфераз ( $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase) Гольджи-специфична, и ген именно этой трансферазы выявлен в геноме микроспоридии *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001). На замороженных срезах зараженного *P. grylli* жирового тела, обработанных маннозо-специфичным GNA лектином, конъюгированным с частицами коллоидного золота, мы показали, что метка выявлялась на оболочке спор, цистернах с полярной трубкой споробластов и спор (черные стрелки), в тубулярной сети споробластов (белая стрелка). Эти данные подтверждают данные биохимии и указывают на то, что гликозилирование белков начинается в тубулярной сети споробластов. Интересно, что этот процесс идёт и в зрелых спорах со сформировавшимся аппаратом экструзии и полярной трубкой, готовой к выстреливанию.



**Рисунок 4-8.** На замороженных срезах заражённого *P. grylli* жирового тела, обработанных конъюгатами GNA-коллоидное золото, метка выявлялась на оболочке спор и споробластов (наконечники), в цистернах с полярной трубкой споробластов и спор (черные стрелки), в тубулярной сети споробластов (белая стрелка). Эти данные подтверждают данные биохимии (Dolgikh et al., 2005) и указывают на то, что гликозилирование белков РТРА и 40 начинается в тубулярной сети споробластов.

**В ТС присутствуют резидентные белки АГ.** Поликлональные антитела к белку Sec 13 *Paranosema locustae*, ближайшей родственнице *P. grylli*, сконструированы и наработаны группой В.В. Долгих (методики подбора праймеров, клонирования гена Sec 13, наработку белка в экспрессирующем векторе, иммунизации и очистки антител описаны в: Beznoussenko et al., 2007). Белок Sec 13 представляет собой субъединицу одного из двух гетеродимеров комплекса белков-коатомеров СОРІІ, участвующих в

окаймлении везикул anterograde транспорта из ЭР в АГ (ссылки в: Снигиревская и др., 2006). С помощью иммуноэлектронной микроскопии мы показали, что антитела к Sec 13 сконцентрированы в тубулярных сетях («ВК») меронтов, и в меньшей степени споронтов (Рис. 4-10). Большая часть метки располагалась вдоль вытянутых мембранных профилей.



**Рисунок 4-9.** В тубулярных сетях (ТС) *P. grylli* концентрируются резидентные белки цис-зоны аппарата Гольджи: Sec 13 (COPII), Sec 21(=γCOP, COPI), джиантина и GM-130. **А.** Антитела к Sec21 связывались с ТС меронтов, споронтов и, в меньшей степени, споробластов. **Б.** Антитела к Sec 13 метили ТС меронтов и споронтов; **В.** Антитела против джиантина и GM-130 локализовались с ТС меронтов и, в меньшей степени, с ТС других стадий. Масштаб: **А, В,** 100 нм; **С,** левый снимок, 180 нм; **С,** правый снимок, 120 нм.

Для дальнейшей характеристики секреторного компартмента микроспоридий использовали стандартный подход, который заключался в тестировании методом вестерн-гибридизации имеющихся антител к белкам целевого компартмента других организмов, против экстрактов белков *P. grylli* и *P. locustae* (Beznoussenko et al., 2007; Долгих, 2017). Антитела, наработанные против рекомбинантного белка Sec21 (γCOP) *Arabidopsis thaliana* (Pimpl et al., 2000), на блотах узнавали полипептид массой приблизительно 80 кДа в экстрактах *P. grylli* и *P. locustae*. Это было ожидаемо, т.к. максимальное сходство гена, кодирующего γCOP у *P. locustae*, наблюдалось именно у его ортолога из *A. thaliana*. Более того, масса белка, предсказанная для γCOP *P. locustae*, была 80кДа. (<http://jbpc.mbl.edu/Nosema/index.html>, *Nosema locustae* Genome Project,

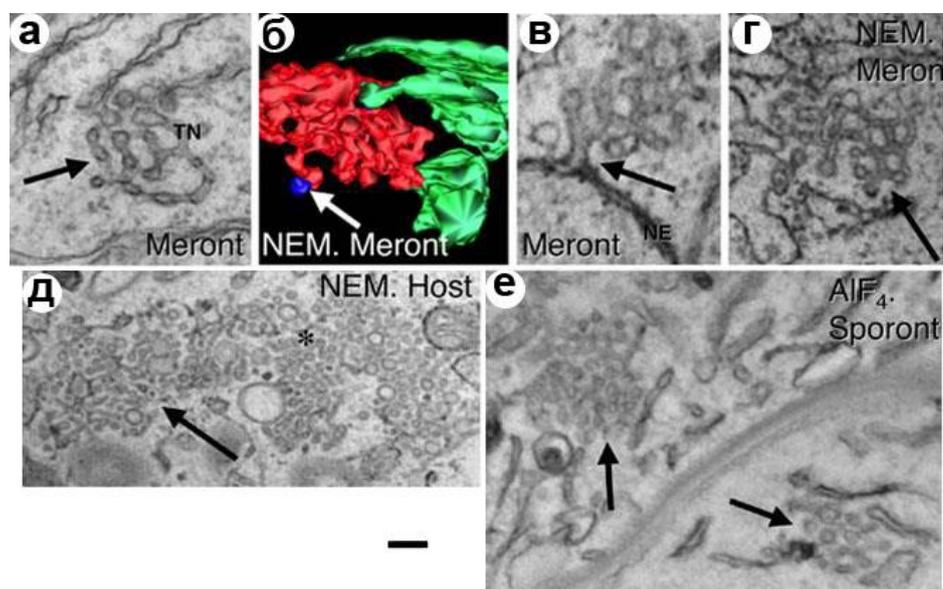
Marine Biological Laboratory at Woods Hole). На замороженных срезах жирового тела заражённых сверчков антитела метили тубулярные сети меронтов и споронтов, в которых метка ассоциировалась, главным образом, с округлыми профилями. В споробластах, вблизи контейнеров, содержащих полярную трубку, также было замечено довольно интенсивное мечение (Рис. 4-9).

Кроме того, вестерн-гибридизация выявила взаимодействие белков микроспоридий с мембранными белками АГ млекопитающих, джиантином и маркерным белком цис-Гольджи («гольджином») GM-130. Антитела к джиантину узнавали единственный белок массой 190 кДа в мембранной фракции внутриклеточных стадий *P. grylli*, в то время как анти-GM-130 антитела взаимодействовали с белком массой 90 кДа во фракциях стадий и спор (Bezoussenko et al., 2007). Иммуноэлектронная микроскопия на замороженных срезах показала, что оба антитела связываются с тубулярными сетями как ранних, так и поздних стадий внутриклеточного развития (Рис. 4-9). Таким образом, опыты с иммуномечением на замороженных срезах показали, что антитела против резидентных белков цис-Гольджи, Sec 13,  $\gamma$ COP, GM-130 и джиантина, локализуются в тубулярных сетях меронтов, споронтов и споробластов. Это указывает на цитохимическое соответствие ТС цис-Гольджи компартменту.

#### **4.4 Опыты, подтверждающие отсутствие везикул в АГ микроспоридий**

С помощью трехмерных реконструкций ультратонких срезов и виртуальных срезов, полученных методом электронной томографии было показано, что Гольджи-подобные структуры как ранних, так и поздних стадий жизненного цикла микроспоридий представлены тубулярными сетями (ТС). Эти ТС соединены с перинуклеарным пространством, эндоплазматическим ретикулумом, плазматической мембраной и контейнером, содержащим полярную трубку, который сам по себе является частью аппарата Гольджи, гомологичным транс-Гольджи цистерне клеток млекопитающих. Реконструировано более 10 клеток микроспоридий на разных стадиях жизненного цикла, и ни в одной из них не обнаружено пузырьков (везикул). Чтобы убедиться, что отсутствие везикул – не артефакт химической фиксации, использовали сверхбыструю криофиксацию методом замораживания под высоким давлением, предотвращающую возможное слияние везикул в результате взаимодействия с альдегидами фиксирующего раствора (Рис. 4-10). Везикулы теоретически могли быть транзитной кратковременной стадией транспорта, которую нам не удалось зафиксировать. Для исключения этой возможности мы ингибировали слияние мембран либо с помощью NEM (N-ethylmaleimide, фактор блокирующий SNARE-зависимое слияние везикул), либо с помощью флуорида алюминия (AlF<sub>4</sub>), который блокирует

разделение COP-1 везикул, необходимое для их слияния друг с другом или с другим мембранным компартментом. Ни в одном из этих экспериментов в клетках микроспоридий везикулы не обнаружены, хотя в клетках хозяина, в данном случае служивших положительным контролем, везикулы наблюдались и/или накапливались при использовании ингибиторов слияния мембран (Рис. 4-10) в соответствии с концепцией везикулярного транспорта. По результатам этих опытов сделан вывод об «авезикулярном механизме» функционирования аппарата Гольджи микроспоридий. Отсутствие везикул в аналогичных экспериментах также позднее показано и для АГ спороплазм (*MIN*) *Anncaliia algerae* (Takvorian et al., 2013).



**Рисунок 4-10.** Ультраструктура тубулярных сетей (ТС) *P. locustae* после химической фиксации и рутинной ЭМ (а, д-е), или после фиксации замораживанием под высоким давлением с последующим криозамещением (б-г) и ЭМ томографией (б). а. ТС меронтов – «везикулярный кластер» (стрелка), состоящий из вытянутых и округлых мембранных профилей, соединенных с ЭР. б. Трёхмерная реконструкция ТС меронта (красная) и прилежащего ЭР (зеленый). Белой стрелкой указана «почка» (синяя) на ТС. в. Связь везикулярной сети с ядерной оболочкой (NE) указана стрелкой. б, г, д. Образцы заражённой жировой ткани перед фиксацией были обработаны NEM (N-ethylmaleimide – фактором, блокирующим SNARE-зависимое слияние везикул). В клетках паразита везикуляции не наблюдалось (в, г). д. После обработки NEM аппарат Гольджи клетки хозяин представлял собой скопление везикул разного диаметра (стрелка и звёздочка). е. Образцы обработаны флуоридом алюминия (AlF<sub>4</sub>), блокирующем «разделение» COP-1 везикул, необходимое для слияния. Везикулы в клетках микроспоридии не наблюдались и в этом случае. Стрелки указывают на ТС. Масштаб: а, б, 120 нм; в, 300 нм; г, е, 80 нм; д, 250 нм.

#### 4.5 Уроки геномных проектов

Анализ геномов *Encephalitozoon cuniculi*, *Paranosema (Antonosporea) locustae*, *Trachipleistophora hominis* и др. (Heinz et al., 2012; Katinka et al., 2001), *Antonosporea locustae* (Genome Project; <http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonosporea01>, Marine Biological

Laboratory at Woods Hole; см. также обзор: Williams et al., 2014) показали, что у микроспоридий сохранены основные кластеры генов, обеспечивающие системы ко-трансляционной транслокации полипептидов в просвет ЭР, внутриклеточный транспорт и экзоцитоз. При этом репертуар генов для каждой из систем беднее, чем у клеток дрожжей и млекопитающих. Например, в геноме *E. cuniculi* присутствует лишь ограниченное число генов, кодирующих белки, вовлечённые в процессы внутриклеточного транспорта (Katinka et al., 2001). Система транслокации белков в ЭР представлена основными компонентами транслокона Sec 61, включающего  $\alpha$ ,  $\gamma$  и другие менее консервативные субъединицы, а также сопутствующие белки Sec62, Sec63 и Hsp70 (Slamovits et al., 2006). Кроме того, имеются гены «сигнальных комплексов узнавания» (signal recognition particle, SRP54 и SRP19) и рецепторы к этим комплексам, который узнает белки, предназначенные для транслокации в ЭР. Обнаружена также Sec11-подобная сигнальная пептидаза, которая катализирует отщепление N-терминальной сигнальной последовательности транслоцируемых белков. Что касается модификации белков внутри ЭР, то в геноме *E. cuniculi* выявлен ген фермента дисульфид-изомеразы, которая катализирует формирование бисульфитных связей и таким образом участвует в свёртывании белков. Характерно, что у микроспоридий полностью потеряны компоненты N-гликозилирования, которое у других эукариот происходит в просвете ЭР (Katinka et al., 2001).

Из 6 белков SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), в изученных геномах микроспоридий присутствуют два R-SNAREs (SNC2 и синаптобrevин) и четыре Q-SNAREs (syntaxin 5, VAMP, Vos1 и Vti1). Следует отметить, что структурно SNARE-белки микроспоридий и дрожжей очень похожи, а сходство SNARE систем дрожжей и млекопитающих общеизвестно (Снигиревская и др., 2006). Однако, число этих белков у микроспоридий (всего 6) значительно меньше, чем у дрожжей (у *S. cerevisiae* – 26) (Burri, Lithgow, 2004; Sokolova, Mironov, 2008).

Механизм, ответственный за разборку SNARE комплексов, представлен только одним белком, Sec18 (гомолог NSF млекопитающих), а белки, гомологичные SNAP-ам, вовсе не обнаружены (Katinka et al., 2001). Это означает, что, вероятнее всего, система SNARE у микроспоридий работает, но медленнее, чем у дрожжей и млекопитающих. Минимальный набор белков семейства Rab (Ypt1, Rab1b, Rab5, Ytp6, Rab10) и Rab-GDP ингибитор диссоциации присутствуют в геноме *E. cuniculi*.

Вместо 7 субъединиц коаномерного комплекса COPI, типичных для клеток млекопитающих, растений и дрожжей, у микроспоридий присутствует только 6 субъединиц COPI. Эпсилон ( $\epsilon$ )-COP I отсутствует в геноме *E. cuniculi* и других

микроспоридий (Katinka et al., 2001; Williams et al., 2014). В клетках млекопитающих  $\epsilon$ -COPI опосредует генерирование пузырьков, окаймлённых COPI (Guo et al., 1994). Репертуар ARF белков у микроспоридий ограничен двумя белками; имеется один ARF-подобный белок, белок ARF-exchange factor, и один ARF-GAP белок. Однако у микроспоридий присутствуют все 4 известные субъединицы коатомерного комплекса COP II: Sec13, Sec23, Sec24 и Sec31 (Katinka et al., 2001). Есть белок Sar1p, необходимый для инициации сборки коатомерного комплекса COPII, но при этом отсутствует Sar1p (guanine nucleotide exchange factor). И, наконец, у всех изученных «высших» микроспоридий отсутствуют гены, кодирующие клатрин и сопутствующие белки-адаптины, что связано с полной утратой микроспоридиями лизосомной системы и система эндцитоза. Анализ методом RT-PCR продемонстрировал присутствие во внутриклеточных стадиях *Paranosema (Antonospora) locustae* mRNA транскриптов, кодирующих субъединицы коатомерного комплекса COPI, Sec13, Sec31, синаптобrevина и синтаксин-подобного белка семейства SNARE. Уровень экспрессии изучаемых генов был достаточно высоким, сравнимым с уровнем экспрессии альтернативной оксидазы, ключевого фермента метаболизма микроспоридий (Dolgikh et al., 2010). Поликлональные антитела против рекомбинантной субъединицы Sec13, экспрессированной в *E. coli*, показали ассоциацию этого белка с мембранами и его накопление в спорах и во внутриклеточных стадиях *P. locustae* (Beznoussenko et al., 2007).

Другая интересная особенность секреторного аппарата микроспоридий, о которой уже упоминалось, это ограниченное разнообразие карбогидратных надстроек в гликопротеинах и протеогликанах микроспоридий. Все они принадлежат к группе O-связанных маннозо-олигосахаридов. В геномах всех изученных микроспоридий выявлено только три гена, ответственных за O-манилизирование белков, и не выявлено ни одного компонента системы N-связанного гликозилирования (Corradi et al., 2009, 2010; Heinz et al., 2012; Katinka et al., 2001). Эти геномные данные подтверждаются и биохимическими исследованиями (Dolgikh et al., 2007; Taupin et al., 2007; Xu et al., 2004).

Из анализа геномных и протеомных данных следуют два основных вывода, подтверждающие исследования морфо-функциональной организации АГ микроспоридий. Во-первых, микроспоридии используют те же базовые механизмы секреторного транспорта эукариот, что характерны для клеток дрожжей и млекопитающих. При этом отличительной чертой секреторных механизмов клеток микроспоридий служит значительная редукция отдельных (несущественных?) элементов внутриклеточного транспорта. Во-вторых, анализ репертуара генов микроспоридий, вовлечённых во

внутриклеточный транспорт, свидетельствует о минимальной роли окаймлённых пузырьков.

#### **4.6 Микроспоридии как естественные экспериментальные системы для изучения секреторного транспорта**

Данные, кратко изложенные выше и более подробно в серии публикаций (Beznoussenko et al., 2007; Dolgikh et al., 2005; Sokolova et al., 2001; Sokolova, Mironov; 2008, Соколова et al., 2007; Соколова и др., 2001), получены в результате работы над проектом, поддержанным международным фондом INTAS под названием «Структурная организация Гольджи компартмента у микроспоридий: ещё один пример минимальной секреторной системы?» (Structural organization of Golgi compartment in microsporidians: one more example of a minimal secretory system?). Идея проекта возникла в 1999 году во время моей стажировки в лаборатории Профессора А.А. Миронова (Mario Negro Sud, Santa Maria Imbara, Abruzzo, Italy), известного специалиста по внутриклеточному транспорту. В лаборатории в это время тестировалась везикулярно-мутационная гипотеза секреторного транспорта и разрабатывались ее варианты. В связи с этим изучалась и дебатировалась роль антероградных и ретроградных везикул, окаймлённых коаномерными белками COPII и COPI, а также возможность транспортировки резидентных и карго белков по непрерывным тубулярным структурам (Hirschberg et al., 1998). Этим коллективом впервые было показано, что внутриклеточный транспорт крупных агрегатов проколлагена в фибробластах не требует участия антероградных (COPII) везикул (Bonfanti et al., 1998). Сама собой напрашивалась мысль, что микроспоридии с их мощным аппаратом экстррузии, формируемым внутри гипертрофированной транс-цистерны Гольджи, также представляют собой наглядный пример секреторного транспорта путём «созревания цистерн». Кроме того, простота идентификации основного «карго» – белка полярной трубки, мелкие размеры и редуцированный набор биохимических путей делают микроспоридий удобной моделью для изучения отдельных аспектов внутриклеточного транспорта, подобно некоторым другим протистам (Соколова и др., 2007). Для того, чтобы понять уникальность микроспоридий как модельной системы «минимального» секреторного пути, необходимо кратко рассмотреть существующие гипотезы внутриклеточного транспорта.

##### **4.6.1 Многообразие моделей структурно-функциональной организации АГ и паразитические протисты в качестве модельных объектов для изучения секреторного транспорта**

Более 50 лет дебатруется вопрос о том, как синтезированные в ЭР продукты (карго) перемещаются через АГ, и каким образом сохраняется локализация резидентных белков (ферментов) в отдельных компартментах АГ. Первая модель транспорта,

*матурационная гипотеза* или модель прогрессии и созревания цистерн, была предложена в конце 1950-х годов (Grasse, 1957). Гипотеза постулирует, что цис-цистерны АГ формируются *de novo*, а затем «созревают», перемещаясь к транс-поверхности. Эта модель не объясняла уникальность каждой цистерны, содержащей индивидуальный набор ферментов, и не учитывала роль везикул. *Везикулярная модель* была предложена Паладе (Palade, 1975) на основании изучения ультраструктуры АГ экзокринных клеток поджелудочной железы. Паладе открыл направленный транспорт секреторных продуктов, показал существование везикулярного транспорта и продемонстрировал роль АГ в концентрации и упаковке синтезированных белков в секреторные гранулы. Представления Паладе о везикулярном транспорте белков через АГ получили широкое распространение. Было продемонстрировано, что в антероградном транспорте через АГ участвуют пузырьки с окаймлением COPI (Orci et al., 1986). Убедительные доказательства в пользу везикулярной гипотезы получены Ротманом с со-авторами в опытах, доказавших быстрый перенос белков между двумя АГ в гетерокарионах, полученных в результате слияния двух клеток, и в бесклеточных системах. Клетки-доноры несли мутацию в гене глюкозаминоацетилтрансферазы и были инфицированы вирусом везикулярного стоматита (VSV), гликопротеиды (VSVG) которого синтезировались в донорских стаках Гольджи. Акцепторные стаки не содержали вирусного белка, но имели нормальную трансферазу. По включению в транспортируемый VSVG радиоактивного остатка трансферазы можно было судить о переходе карго из цис- в медиальную цистерну. При этом электронная микроскопия показала, что от краёв цистерны отшнуровываются окаймленные (не клатриновые) пузырьки, которые, по-видимому, переносили клеточные белки (Ostermann et al., 1993; Rothman, 1994; Rothman, Wieland, 1996). Апофеозом везикулярной гипотезы стало присуждение в 2013 год Нобелевской премии по физиологии и медицине Джэймсу Ротману, Рэнди Шекману и Томасу Сюдхоту «за открытия в области механизмов, регулирующих везикулярный транспорт, основную систему внутриклеточного транспорта наших клеток». Однако, несмотря на широкое признание везикулярной модели, существуют серьёзные проблемы в объяснении с её помощью некоторых процессов внутриклеточного транспорта. Во-первых, в результате мечения карго (VSVG) зелёным флуоресцентным белком (GFP), в COPI пузырьках не найдено секреторируемых белков, но выявлены резидентные белки, в частности KDEL рецептор (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997). Во-вторых, в мутантных штаммах дрожжей с заблокированным геном SNARE, необходимым для везикулярного транспорта, не происходило нарушения в антероградном транспорте (Pelham, 1995). В-третьих, транспорт крупномолекулярных

комплексов, таких как гликопротеиновые чешуйки на поверхности одноклеточных зелёных водорослей (scales), агрегаты про-коллагена в фибробластах, аполипопротеины в клетках печени и макромолекулярные комплексы желточных белков в клетках жирового тела насекомых не может быть осуществлён COPI пузырьками в связи с малыми размерами последних (Bonfanti et al., 1998; Hicks, 1966; Horstmann et al., 2002; Melkonian et al., 1991; Snigirevskaya et al., 1997). Цитохимически эти крупные комплексы выявляются только в цистернах АГ, но не в везикулярных переносчиках. Поскольку перечисленные факты не могли быть объяснены везикулярной гипотезой, интерес к матурационной гипотезе возродился снова. Была создана новая *синтетическая везикулярно-матурационная модель*, объединяющая везикулярную и матурационную гипотезы (Bonfanti et al., 1998; Mironov, et al., 1997; Polishchuk et al., 2000). Согласно этой модели, цис цистерны АГ образуются de novo из ЭР. Цистерны созревают и продвигаются к транс-Гольджи. Сформированные вновь транс цистерны превращаются в мембранные переносчики секретируемых продуктов. Однако, не привлекая везикулярный транспорт, трудно объяснить сохранение полярности АГ и постоянного ферментного состава определённых цистерн, находящихся в состоянии динамического равновесия (Farquhar, Palade, 1981; Glick, Malhotra, 1998). Согласно везикулярно-матурационной модели, белки, синтезированные в ER, упаковываются в везикулы, окаймленные COPII в сайтах tER (переходного компартмента между АГ и ERGIC (ER – Гольджи промежуточный компартмент)). Эти везикулы затем входят в везикулярно-тубулярные кластеры компартмента ERGIC. Считается, что ERGIC образуется посредством гомотипического слияния везикул, потерявших окаймление COPII. Элементы COPII транслоцируются вдоль микротрубочек к АГ динеин-опосредованным образом. При созревании цистерн их ферменты возвращаются в предыдущие цистерны в составе COPI-окаймленных пузырьков (ретроградный транспорт) (Bannykh, Balch, 1997; Malhotra et al., 1989; Mironov et al., 1997; Pelham, Rothman, 2000). Существуют варианты этой гипотезы, такие как *модель латеральной диффузии* (Beznoussenko, Mironov, 2002; Mironov et al., 2005; Trucco et al., 2004), *модель созревания мембранных переносчиков* и другие (Beznoussenko, Mironov, 2002; Mironov et al., 2005). Однако наиболее непротиворечивый вариант этой гипотезы, который допускает возможность транспорта без участия везикул и поэтому больше других подходит для интерпретации механизма секреторного транспорта микроспоридий, это *модель быстрой компартиментализации (rapid partitioning model)*. Эта модель разработана в лаборатории Липинкот-Шварц (Lippincott-Schwartz) на модельных клетках млекопитающих, инфицированных VSV, и подтверждена работами на дрожжах (Jackson, 2009; Patterson et al., 2008). Она

постулирует, что определяющую роль в транспорте играет сортировка липидов в мембранах цистерн АГ всех уровней: обогащённые глицерофосфолипидами (ГФЛ) домены содержат ферменты АГ, а обогащённые сфинголипидами (СЛ) – карго-белки. Такая компартиментализация происходит благодаря специфическим белково-липидным ассоциациям. Согласно этой модели, транспорт резидентных белков и карго может идти в обе стороны (как это было предсказано ранее, см. Pelham, Rothman, 2000), а комплекс Гольджи представлен мембранным континуумом. При этом важная роль отводится тубулярным связям. Модель быстрой компартиментализации хорошо объясняет экспериментальные данные, в частности, почти моментальное перемещение карго по всем компартаментам Гольджи после выхода из ЭР, что не объясняет ни один из предыдущих вариантов мутационной гипотезы. Гипотеза объясняет также давно известное существование липидного градиента в мембранах цистерн АГ: мембраны ERGIC и цис-цистерны насыщены глицерофосфолипидами (ГФЛ), которые синтезируются в ЭР, в то время как медиальная цистерна и транс-зона более богаты сфинголипидами (СЛ), которые образуются исключительно в АГ. Резидентные белки связаны с ГФЛ доменами, в то время как белки карго – с СЛ доменами. Липидные взаимодействия также определяют конформационные изменения мембран, ведущие к формированию рафтов, пузырьков, тубул и тубулярных сетей (Patterson et al., 2008). Эта гипотеза согласуется и с данными, демонстрирующими, что АГ – ПМ транспорт секреторных продуктов может осуществляться из любой зоны АГ, включая цис-цистерны с помощью тубулярных переносчиков (везикуло-тубулярных сетей). Показано, что каждая цистерна стака связана с тубуло-везикулярной «некомпактной зоной», в которой выявлены элементы окаймления COPI и клатрин, вовлеченные в сортировку карго (Polishchuk et al., 2003). Механизмы транспорта через тубулярные сети ранее детально описаны в клетках дрожжей (Rambourg et al., 2001). Важным моментом для понимания специфической организации секреторного транспорта у микроспоридий стала также демонстрация (в опытах с транспортом VSVG) разделения транспорта карго к ПМ и эндосо-лизосомного пути. Экспериментами с ингибированием брэфельдином (грибной токсин, вызывающий разборку АГ и возвращения резидентных белков в ЭР) показано, что транспорт VSVG-содержащих карьеров не чувствителен к действию брэфельдина и минует транс-Гольджи сеть (TGN) (Patterson et al., 2008). Результаты этих экспериментов согласуются с наблюдениями, опубликованными ранее, что TGN представляет собой специализированный компартимент для транспорта компонентов эндосомально-лизосомальной системы, и что этот компартимент отличен от районов

транс-Гольджи, поставляющих АГ- ПМ карьеры (Ladinsky et al., 1999; Mogelsvang et al., 2004).

Суммируя огромный объем литературы по внутриклеточному транспорту эукариотической клетки, можно констатировать, что достигнуты значительные успехи в идентификации структурных компонентов, белков, липидов и генов, принимающих участия в транспорте; хорошо изучены реакции, происходящие в отдельных компартаментах Гольджи, описаны их структурные компоненты, созданы наглядные экспериментальные системы, позволяющие синхронизировать секрецию и манипулировать процессами сборки и разборки органеллы. Однако единой более или менее непротиворечивой концепции внутриклеточного транспорта пока не существует. В рамках 3-4 основных моделей транспорта существует как минимум 20 вариаций (Jackson, 2009; Mironov et al., 2005; Patterson et al., 2008; Снигиревская и др., 2006). Все существующие гипотезы ограничены, т.е. описывают группы фактов, чаще всего полученные в данной научной группе и данными методами. В чем же причина такого обилия гипотез, описывающих организации транспорта? Во-первых, возможно, единого механизма транспорта и не существует: в клетках реализуется два и более механизмов anterograde и retrograde транспорта. Во-вторых, основная модель, используемая для исследования морфофункциональных особенностей транспорта – это культуры недифференцированных (чаще всего раковых) клеток млекопитающих. Клетки распластываются по поверхности и создают равномерный слой, удобный для физиологических экспериментов и микроскопического анализа. Однако функционально это неполноценные клетки, с обеднённым (секреция нацелена, главным образом, на воспроизводство мембран для пролиферации) и ненаправленным (отсутствует полярность, свойственная секреторным клеткам) типом секреторного транспорта. Работы с культурами поляризованных эпителиальных клеток уже выявили различия в организации апикального и базо-латерального транспорта. И совсем не удивительно, что результаты, полученные на функционально активных секреторирующих клетках или выделенных из них мембранах (оригинальные опыты Палладе), и на клетках HELA часто не вполне согласуются друг с другом. К сожалению, трудно найти выход из создавшегося тупика: не существует системы для изучения внутриклеточного транспорта альтернативной культуре клеток млекопитающих. Изучение внутриклеточного транспорта в эпителиях при физиологических нагрузках – один из возможных и недостаточно пока используемых подходов к анализу функциональных возможностей аппарата Гольджи (Снигиревская и др., 2006). Другим подходом может быть использование одноклеточных организмов (протистов) – готовых экспериментальных

систем, предоставляемых нам природой (Cooke et al., 2004; Joiner, Roos, 2002; Lujan, Touz, 2003; Overath, Engstler, 2004; Plattner, 1993; Sokolova et al., 2001). Практически каждая группа протистов обладает особым типом секрета и характерной организацией секреторного транспорта, в процессе эволюции идеально подогнанным под функциональные задачи – будь то секреция оболочки цисты лямблии, элементов клеточной стенки дрожжей, «чешуек» одноклеточных зелёных водорослей, экструсом инфузорий или поверхностных гликопротеидов трипаносом (Табл. П4-1). Роль паразитических протистов как экспериментальных систем для изучения секреторного транспорта подробно рассмотрена в обзорах (Соколова и др., 2007; Sokolova, Mironov, 2008), задача которых была продемонстрировать, как паразитический образ жизни определяет структурные и функциональные особенности систем секреторного транспорта в таких неродственных группах простейших как Parabasalia (*Trichomonas*), Diplomonada (*Giardia*), Entamoebidae (*Entamoeba*), паразитических Alveolata типа Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*), а также Kinetoplastida (*Trypanosoma*, *Leishmania*) по сравнению с секреторным транспортом в модельных системах – культивируемых клетках млекопитающих и дрожжей. Облигатные паразитические простейшие относительно хорошо изучены с помощью современных генетических, молекулярных и структурных методов по двум причинам. 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 по серийным срезам. Публикациями последних лет убедительно продемонстрировано, что изучение секреторного транспорта у паразитических простейших существенно дополняет и уточняет представления о структуре и функции аппарата Гольджи, сложившиеся на основании анализа клеток «высших» эукариот – млекопитающих и дрожжей (Sokolova, Mironov, 2008; Соколова и др., 2007). Как показали исследования, микроспоридии вполне могли бы занять достойное место среди модельных объектов для изучения внутриклеточных механизмов секреции.

#### 4.5.2 Уникальные и универсальные черты «минимальной» секреторной системы микроспоридий (вместо заключения)

Наиболее яркая отличительная черта секреторного компартмента микроспоридий – это полная элиминация эндосомально-лизосомального пути, связанная, вероятно, с потерей способности к фагоцитозу. У «высших» микроспоридий не сохранилось ни генов, ни структур, участвующих в эндоцитозе и в фаго-лизосомной деградации (Vávra, Larsson, 1999). Возможность полной элиминации части секреторного пути в одной из ветвей эукариот косвенно подтверждает идею независимости собственно секреторного (обеспечивающего транспорт из АГ к ПМ и поддержание состав ПМ) и эндосомального путей (Ladinsky et al., 1999; Mogelsvang et al., 2004; Patterson et al., 2008). Возможно, эти два пути функционировали независимо на ранних этапах эволюции эукариотической клетки. В этой связи стоит отметить, что у трофозоитов *Giardia* наблюдается обратная ситуация: их секреторный компартмент представлен исключительно эндосомально-лизосомальными компонентами в виде периферических гранул (Hehl, Marti, 2004).

Автором диссертации показано, что (1) секреторный компартмент микроспоридий на всех стадиях жизненного цикла организован в виде тубулярных сетей, (2) внутриклеточный транспорт происходит путем созревания цистерн (с помощью «прогрессионного механизма»), и (3) он осуществляется при полном отсутствии везикул. Тубулярные сети – характерный компонент секреторной системы дрожжей, состоящей из континуумов тубуло-везикулярных кластеров (Mogelsvang et al., 2003; Rambourg et al., 2008). Морфологическое сходство секреторных систем микроспоридий и дрожжей соответствует функциональной гомологии, выраженной в высоком проценте идентичности сиквенсов, кодирующих белки внутриклеточного транспорта, и успешности гетерологической экспрессии клеток микроспоридий в дрожжевых системах (Dolgikh et al., 2009, 2010). Такое сходство вполне может отражать эволюционную близость микроспоридий к дрожжам. Механизм созревания карго в результате созревания цистерн без участия антероградных (СОPII) везикул, как показано выше, описан у некоторых типов клеток многоклеточных, а также у одноклеточных водорослей и протистов. Теоретическая возможность транспортировки секретируемых белков вообще без участия везикул предсказана моделью быстрой компартиментализации цистерн АГ. Однако во всех изученных до сих пор системах транспортные везикулы, одетые коаномерными комплексами СОPI и/или СОPI, все же наблюдались. У микроспоридий отсутствует ген, кодирующий  $\epsilon$ -СОPI, ответственный за формирования пузырьков, а морфологический анализ секреторного компартмента демонстрируют единственный среди эукариота пример полного отсутствия везикул как для

антероградного (СОPII), так и для ретроградного (СОPI) транспорта. Наличие элементов везикулярного транспорта, в частности, коатомеров СОPI и СОPII, при отсутствии везикул ставит вопрос об их дополнительных функциях в клетках эукариот. Предполагается, что функция коатомерных комплексов у микроспоридий так же, как в клетках млекопитающих и дрожжей, может быть связана с сортировкой и концентрацией секретируемых белков (Beznoussenko, Mironov, 2002; Polishchuk et al., 2003). Данные, полученные нами на микроспоридиях, хорошо согласуются с данными Полищука и соавторов, наблюдавшими ко-локализацию белков-коатомеров и тубулярных переносчиков VSVG. Можно предложить, что два типа секреторных доменов, предсказанных моделью быстрой компарментализации цистерн (Patterson et al., 2008), соответствуют у микроспоридий наблюдаемым нами варикозным и гладким участкам тубулярных сетей, и что варикозные зоны представляют собой зону тубулярных карьеров с коатомерным окаймлением. Дальнейшие опыты по локализации коатомерных белков позволят доказать или опровергнуть эту гипотезу.

Изучение структуры Гольджи на разных стадиях жизненного цикла микроспоридий говорит о наличии как минимум трёх секреторных путей и соответствующих им компарментов, разделённых в пространстве и/или во времени: (1) MIN спороплазмы, (2) везикулярные кластеры меронтов и споронтов, и (3) тубулярный кластер споронтов, созревающий в (4) транс-Гольджи компарменты (тубулярные сети и транс-цистерна с полярной трубкой) споробластов и спор. Следует отметить, что наличие нескольких специализированных секреторных путей в клетках паразитических протистов – скорее правило, чем исключение (Соколова и др., 2007). Одновременная реализация двух и более секреторных путей и механизмов секреции в клетках протистов говорит в пользу предположения, что вариабельность секреторных механизмов присуща клетке эукариот. Модельные клетки млекопитающих, вероятно, также могут реализовывать несколько вариантов внутриклеточного транспорта под действием естественных или экспериментальных факторов – секретируемого продукта, этапа клеточного цикла, температурных условий, инфекционной нагрузки и т.д., что как раз и выражается в обилии теорий клеточного транспорта. У микроспоридий в ходе жизненного цикла последовательно реализуется несколько секреторных путей. Секреторный компармент (*MIN*) спороплазм, описанный пока только у двух видов микроспоридий, доставляется в клетку хозяина полярной трубкой вместе со спороплазмой и служит, вероятно, для модификации мембраны полярнопласта, окружающей спороплазму, в плазматическую мембрану споронта. Эта структура исчезает почти сразу после попадания паразита в клетку. *На начальных этапах*

*внутриклеточного развития* белки, ответственные за паразито-хозяйинные отношения, по-видимому, экспортируются в клетку хозяина конститутивно, минуя АГ. Об этом говорит отсутствие у ранних меронтов «везикулярных кластеров» или иных мембранных структур, за исключением ЭР и ядерной мембраны. Кроме того, из блока генов внутриклеточного транспорта именно гены системы транслокации белков в ЭР представлены наиболее полно в геномах микроспоридий. В то же время, наличие экстрацеллюлярных выростов плазмалеммы, перераспределение органелл клетки хозяина, в частности, окружение паразита митохондриями и ЭР хозяина, наблюдаемые почти у всех изученных видов микроспоридий, свидетельствуют о поступлении в клетку хозяина факторов, синтезируемых паразитом. *На более поздней стадии мерогонии и у ранних споронтов* расширенное перинуклеарное пространство, связанные с ним цистерны ЭР и компактные комплексы вытянутых мембранных профилей («везикулярные кластеры») играют роль цис-компарментов Гольджи, на что указывает окраска этих комплексов осмиевой чернью. Связь кластеров с плазмалеммой, а также концентрация в них не только джиантина и GM130, но и белка экзоспоры, говорит об их секреторной функции и подтверждает возможность формирования секреторных продуктов на уровне цис-цистерн, в соответствии с теорией быстрой компарментализации (Patterson et al., 2008; Polishchuk et al., 2003). По-видимому, у микроспоридий расширенное перинуклеарное пространство функционирует как цис-цистерна Гольджи. Мы наблюдали связь этого компартамента непосредственно с ПМ. Возможно, микроспоридии используют и такой кратчайший путь доставки синтезированных на рибосомах ядерной оболочки продуктов в клетку хозяина. Характерно, что ядерная оболочка функционирует как часть секреторного пути также и в клетках других внутриклеточных паразитов. Например, в клетках лямблий и в поляризованных зоитах кокцидий эта органелла выполняет роль промежуточного компартамента между ЭР и АГ (ERGIC). Формирование аппарата Гольджи-подобных структур на эритроцитарной стадии *Plasmodium* spp. также связано с перинуклеарным пространством и весьма напоминает процесс возникновения везикулярных кластеров у микроспоридий. Некоторое сходство с плазмодием прослеживается и в тенденции экспорта собственного секреторного компартамента в клетку хозяина. У некоторых видов микроспоридий клетка хозяина бывает заполнена мембранными структурами паразита – обычно в виде выростов и тубулярных структур, связанных с плазмалеммой. Очень вероятно, что эти структуры несут секреторную функцию. *На промежуточной стадии между меро- и спорогонией* формируются «тубулярный кластер» – АГ микроспоридий, связанный с секрецией основных карго-белков микроспоридий – белков ПТ и оболочки

споры. Изначально тубулярный кластер обладает цитохимическими свойствами цис-Гольджи, а затем в споробластах и спорах трансформируется в транс-компаратмент. Тубулярный кластер в изученной нами системе скорее всего возникает *de novo*, возможно, на основе мембранных профилей, обычно наблюдаемых вблизи центриольных пластинок. Появление тубулярных кластеров совпадает по времени с расхождением ядер диплокарона и их последующим делением. Присутствие 4-х тубулярных кластеров на 4х-ядерной промежуточной стадии и по одному кластеру в каждом из дочерних споронтов говорит об ассоциации АГ с ядром и аппаратом деления клетки. Подобная ассоциация наблюдалась у представителей таких неродственных групп протистов, как Parabasalida, Apicomplexa, и Kinetoplastida, что, вероятно, свидетельствует в пользу древности связи секреторной системы и ядерного аппарата. *В поздних споробластах и спорах* присутствует только транс-компаратмент АГ. Он представлен тубулярными сетями и цистерной, содержащей полярную трубку. Цистерна, содержащая полярную трубку, представляет собой гигантский транспортный «перевозчик», который становится основной органеллой споры – инструментом, предназначенным для доставки ядерного материала в клетку хозяина.

Анализ результатов изучения системы секреторного транспорта микроспоридий пока ставит больше вопросов, чем даёт ответов. При том, что у микроспоридий присутствуют типичные для эукариот основные компоненты этой системы, тенденция к минимизации – основная эволюционная стратегия микроспоридий (Keeling, Fast, 2002), хорошо прослеживается и на организации внутриклеточного транспорта. Так, микроспоридии успешно обходятся без эндосомальной части секреторного пути, без везикулярного транспорта, без механизма O-гликозилирования и с минимальным набором компонентов N-гликозилирования.

## ГЛАВА 5. МОДУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА КАК МЕХАНИЗМ ПАТОГЕНЕЗА МИКРОСПОРИДИЙ

Апоптоз, служит универсальным механизмом неспецифического иммунитета, и сигнальные пути, которые его регулируют, хорошо известны как мишени для многих внутриклеточных паразитов, как про- так и эукариот (Faherty, Maurelli, 2008; Най, Kannourakis, 2002; James, Green, 2004; Luder et al., 2001).

Микроспоридии, облигатные внутриклеточные паразиты с минимизированными геномами и протеомами, настроенными на высокую степень зависимости от биохимии клетки хозяина, также выработали совершенные механизмы манипулирования клеткой хозяина (Williams et al., 2014). Показано, что микроспоридии переключают клеточные функции хозяина в своих интересах путем секреции специфических факторов (Cuomo et al., 2012; Desjardins et al., 2015; Panek et al., 2014; Senderskiy et al., 2014; Timofeev et al., 2017). Гипертрофия и удлинение срока жизни заражённых микроспоридиями клеток, отмечаемые многими авторами (Williams et al., 2014), позволяют предположить, что микроспоридии, подобно другим паразитам, способны модулировать клеточный цикл хозяина и подавлять апоптоз. Например, характерной особенностью паразитизма микроспоридий в насекомых и рыбах является образование гигантских клеток, которые обеспечивают защищённые ниши для развития паразитов. У рыб – это так называемые «ксеномы» (Lom, Dykova, 2005), у насекомых – «цисты» и гигантские эноциты (Sokolova et al., 2005). Интересно, что эноциты чешуекрылых, заполненные стадиями микроспоридий, могут переживать метаморфоз и переносить инфекцию с личиночной на имагинальную фазу (Исси, 1986), в то время как окружающие неинфицированные клетки подвергаются аутофагии и/или запрограммированной гибели по апоптозному пути (Romanelli et al., 2016). Регуляция клеточного цикла и ингибирование апоптоза несколькими видами микроспоридий были продемонстрированы в прямых экспериментах *in vitro* и *in vivo*. *Anncaliia algerae* ингибировала индуцированный апоптоз в фибробластах легких человека (Scanlon et al., 1999). Заражение клеток Vero видами рода *Encephalitozoon* вызывало нарушения клеточного цикла (Scanlon et al., 2000). *Vittaforma corneae* индуцировала образование многоядерных ксеномо-подобных структур в культуре клеток почек обезьяны (Leitch et al., 2005). Заражение *E. cuniculi* подавляло индуцированный апоптоз в клетках Vero и модулировало цикл клеток-хозяев посредством ингибирования p53 (del Aguila et al., 2006). Было также показано, что *Nosema bombi* подавляла апоптоз в культуре клеток овариол *Bombix mori* (He et al., 2015). *N. ceranae* и *N. apis* модулировали клеточный цикл и подавляли апоптоз в клетках вентрикулярного эпителия *Apis mellifera* (Higes et al., 2013; Huang et al., 2016; Kurze et al.,

2016; Kurze et al., 2015; Martin-Hernandez et al., 2017). Наша работа – это первое экспериментальное исследование влияния микроспоридий на индукцию апоптоза в фагоцитирующих клетках, а также первая попытка сравнительного изучения модуляции апоптоза двумя видами микроспоридий с различной биологией. Кроме того, никогда ранее не изучалось влияние микроспоридий на экспрессию комплекса генов, связанных с регуляцией апоптоза.

### **5.1 Роль макрофагов в клеточном и гуморальном иммунитете; взаимоотношение микроспоридий с макрофагами; выбор изучаемых видов и задачи работы**

Макрофаги играют ключевую роль в иммунной системе позвоночных и беспозвоночных. Они являются первичными медиаторами врождённого неспецифического иммунитета, первой линией защиты от внутренних паразитов, а также координаторами гуморального иммунного ответа высших позвоночных. Апоптоз инфицированных макрофагов приводит к высвобождению паразитарных антигенов и является универсальным механизмом, помогающим как устранить инфекцию, так и вызвать гуморальный ответ на чужеродные антигены после смерти макрофага с помощью систем репрезентации антигенов (Mills, 2012). Для большинства микроспоридий – паразитов высших позвоночных, способность заражения макрофагов и размножения в них – ключевой фактор в диссеминации инфекции и развитии микроспоридий.

Как уже упоминалось выше (раздел 3-4), большинство микроспоридий паразитируют в беспозвоночных и рыбах, и только два рода из примерно 200 описанных в настоящее время, *Enterocytozoon*<sup>12</sup> and *Encephalitozoon* (Becnel, Andreadis, 2014; Stentiford et al., 2016) можно считать естественными патогенами теплокровных животных (Sokolova et al., 2015). Все представители рода *Encephalitozoon* паразитируют в высших позвоночных (Reptilia, Aves, Mammalia) и родственны микроспоридиям насекомых (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). *Encephalitozoon* spp. заражает фагоцитирующие клетки позвоночных, в первую очередь, макрофаги (энтероциты в случае *E. intestinalis*).

---

<sup>12</sup> Мы не рассматриваем здесь *Entecytozoon bieneusi* – единственного представителя монотипического рода *Entecytozoon*, паразитирующего в эпителиальных клетках кишечника млекопитающих и птиц. Snowden K. F. Microsporidia in higher vertebrates // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition / Weiss L., Becnel J. J., 2014. – С. 469-491. *E. bieneusi* представлен множеством хозяино-специфичных изолятов и филогенетически тесно связан с кладой микроспоридий-паразитов морских рыб и ракообразных. Этот род, видимо, сравнительно недавно перешел к паразитированию в теплокровных через пищевые цепи. (Stentiford et al., 2016), и его патогенез непосредственно не связан с макрофагами.

Представители рода *Encephalitozoon* способны размножаются в оседлых и мигрирующих макрофагах. Характерный признак патогенеза *Encephalitozoon* spp. у рептилий, млекопитающих и птиц – образование опухолевидных гранулематозных поражений в мозге, сердце, печени, яичниках и других органах. Эти гранулёмы состоят из заполненных паразитами макрофагов и окружающих их мононуклеоцитов и эозинофилов, которые привлекаются секретлируемыми макрофагами цитокинами (Richter et al., 2013; Snowden, Shadduck, 1999; Sokolova et al., 2016). Следующие черты указывают на уникальность *Encephalitozoon* spp. и, вероятно, отражают эволюционные адаптации к паразитизму в «высших позвоночных»: (1) самый маленький среди микроспоридий геном – 2,3-2,9 Мб против 4,1-51,3 Мб у других видов (Desjardins et al., 2015; Keeling, 2014), (2) развитие внутри паразитофорной вакуоли, формирующейся из плазматической мембраны клетки-хозяина, и (3) способ проникновения в клетку хозяина с помощью индуцированного фагоцитозом спор и спороплазм (Bohne et al., 2011), а не через полярную трубку, как у большинства микроспоридий. Повышенная температура тела и развитие гуморального иммунитета являются основными лимитирующими факторами, препятствующими переходу большинства групп микроспоридий к паразитизму в теплокровных хозяев. Мы полагаем, что способность манипулировать секреторной активностью и биохимическими путями фагоцитарных клеток, включая подавление апоптоза в макрофагах, сыграла решающую роль в эволюции *Encephalitozoon* spp. как паразитов позвоночных.

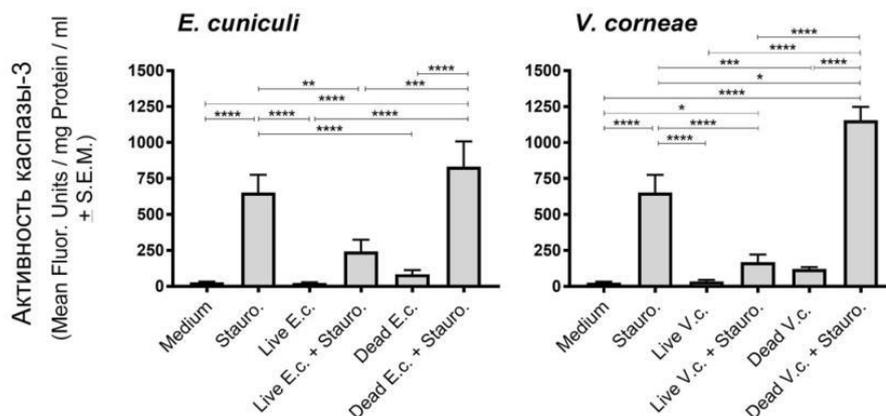
*E. cuniculi* – наиболее распространённый и хорошо изученный представитель рода *Encephalitozoon* – паразит человека, диких, домашних и сельскохозяйственных животных (Snowden, 2014; Weiss, 2014). Этот вид легко культивируется в различных клеточных линиях млекопитающих (Visvesvara et al., 1999), и именно он стал основным объектом наших исследований по ингибированию индуцированного апоптоза микроспоридиями.

Второй вид, *Vittaforma corneae*, также родственен микроспоридиям насекомых (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Его нельзя назвать типичным паразитом млекопитающих, т.к. ни в каких других организмах кроме человека его не находили. У людей его выявляли всего два или три раза (Weiss, 2014) в эпителии роговицы глаза, известной «иммунно-привилегированный» нише, типичной для развития оппортунистических инфекций, в том числе микроспоридиальных (Didier, Khan, 2014). Микроспоридия *V. corneae* хорошо культивируется в различных клеточных линиях млекопитающих и используется как лабораторный объект. В отличие от *E. cuniculi*, *V. corneae* развивается в непосредственном контакте с цитоплазмой клеток-хозяев без паразитофорной вакуоли.

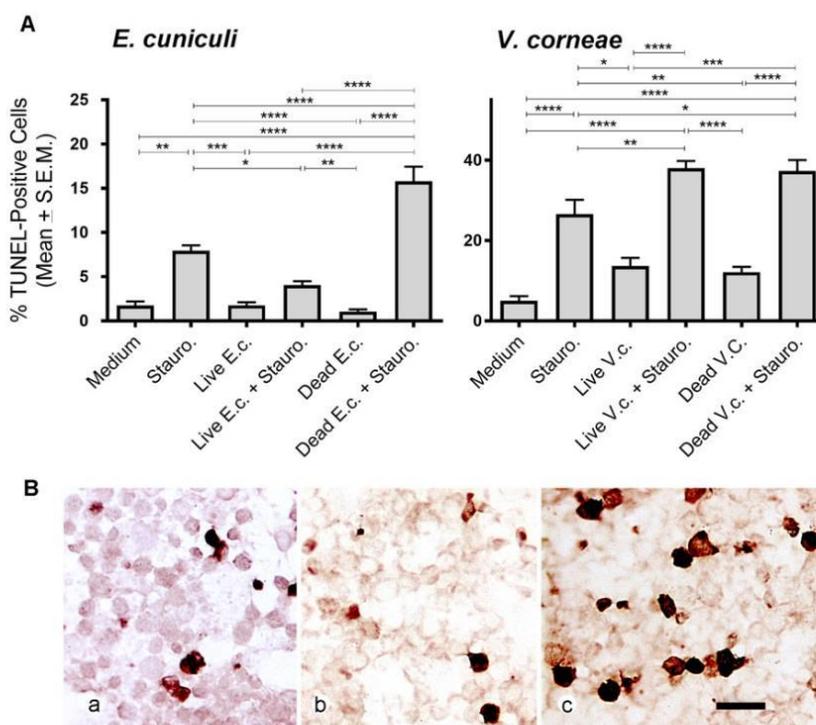
Автором исследовано влияние *E. cuniculi* и *V. corneae* на апоптоз, индуцированный стауроспорином, в линии клеток ТНР-1, биохимически наиболее близких к нативным макрофагам млекопитающих, естественной мишени *E. cuniculi*. Рабочую гипотезу, которую мы тестировали, можно сформулировать следующим образом: заражение микроспоридиями защищает клетки от индуцированного апоптоза с помощью регуляции биохимических путей, ответственных за про- и анти-апоптозные механизмы. Механизмы этой регуляции варьируют у двух филогенетически и биологически различных видов. Наши задачи заключались в следующем: (1) выяснить, как инфекции с *E. cuniculi* и *V. corneae* влияют на уровень апоптоза, индуцированного стауроспорином в культуре ТНР-1 клеток, (2) показать ингибирование апоптоза в индивидуальных клетках, (3) сравнить эффект живых и мертвых спор *E. cuniculi* и *V. corneae* на экспрессию генов, связанных с апоптозом, и по возможности выявить метаболические пути, участвующие в модуляции апоптозного каскада этими микроспоридиями.

## **5.2 Заражение микроспоридиями подавляет активность каспазы-3 (К-3) и ведет к уменьшению количества апоптозных ядер, окрашенных по методу TUNEL**

Заражение клеток ТНР-1 живыми спорами *E. cuniculi* и *Vittaforma corneae* приводило к снижению индуцированной активности К-3, измеренной спектрофотометрически (см. Главу 2) через 4 дня после внесения спор. Внесение мёртвых спор, напротив, приводило к повышению активности фермента (Рис. 5-1). В другой серии экспериментов зараженные и незараженные макрофаги окрашивали методом TUNEL для выявления апоптозных ядер (см. Главу 2). Инфекция живыми спорами *E. cuniculi* (но не *V. corneae*!) достоверно уменьшала долю TUNEL-положительных клеток в популяциях клеток ТНР-1 (Рис. 5-2А). В колориметрическом TUNEL апоптозные ядра окрашивались в темно-коричневый цвет (Рис. 5-2В). В культурах, индуцированных стауроспорином, внесение живых спор *E. cuniculi* приводило к уменьшению количества TUNEL-положительных клеток на 30-60%. Внесение мёртвых спор, напротив, существенно увеличивало долю апоптозных ядер. В неиндуцированных культурах количество TUNEL-положительных клеток не изменялось. Внесение спор *V. corneae* существенно не влияло на количество TUNEL-положительных макрофагов после индукции апоптоза (Рис. 5-2).



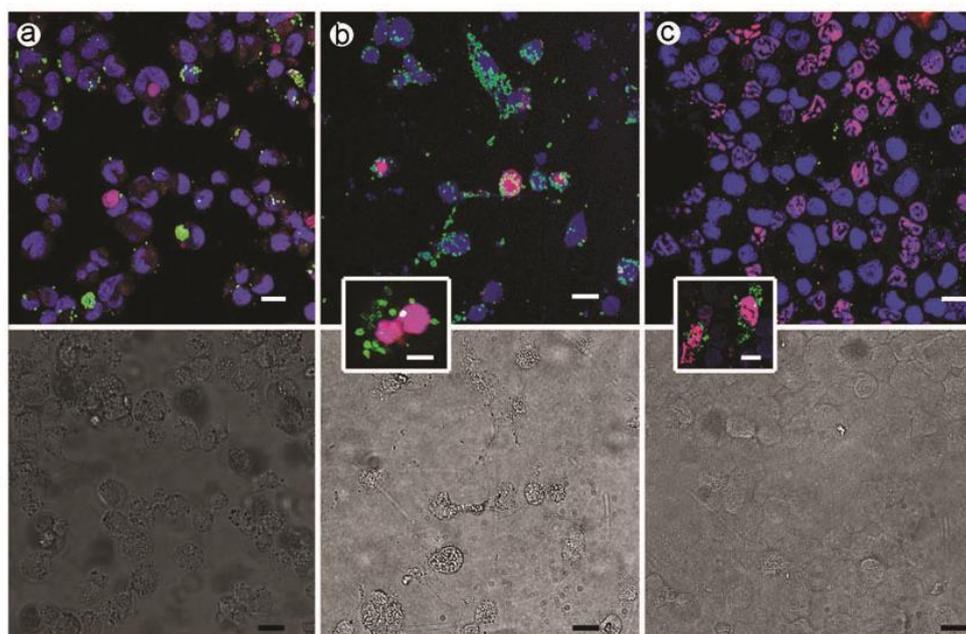
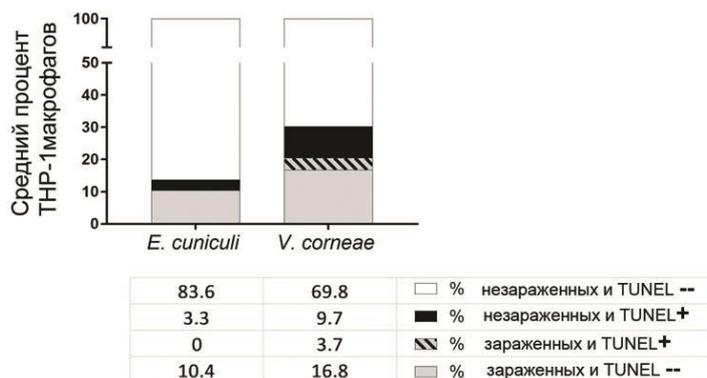
**Рисунок 5-1.** Активность каспазы-3 в ТНР-1 после культивирования с живыми и мёртвыми спорами *Encephalitozoon cuniculi* (Ec) и *Vittaforma corneae* (Vc). Через 4 дня после добавления спор клетки были индуцированы стауроспорином (Stauro). Активность фермента измерялась спектрофотометром через 4 часа после индукции апоптоза. Колонки: среднее  $\pm$  стандартная ошибка 3-х экспериментов в 3-х повторностях. Дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением методом Туки (Tukey's post hoc test for pairwise comparisons): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .



**Рисунок 5-2.** А. Статистическая обработка результатов экспериментов с окрашиванием ТНР-1 макрофагов методом TUNEL (DeadEnd colorimetric system, Promega) через 4 дня после внесения живых или мёртвых спор. Апоптоз индуцировали стауроспорином за 4 часа до фиксации. А. TUNEL-положительные клетки подсчитывались под микроскопом в светлом поле при увеличении 400X. Колонки представляют средние значения по 5 полям зрения с каждого из 10 стекол для одной экспериментальной группы  $\pm$  SEM. Дисперсионный анализ с последующим по-парным сравнением методом Туки (Tukey's post hoc test for pairwise comparisons): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . В. Пример окраски методом TUNEL. ТНР-1 клетки окрашивались через 4 дня после инкубации в культуральной среде без спор (а), с живыми спорами (b) и мертвыми спорами (c) *E. cuniculi*. Апоптозные ядра окрашены в коричневый цвет.

Для получения ответа на вопрос, затрагивает ли блокировка апоптоза только зараженные клетки или распространяется и на соседние незараженные клетки, мы применили флуоресцентный вариант метода TUNEL, позволяющий визуализировать апоптозные ядра в флуоресцентный микроскоп. Окраску TUNEL мы комбинировали с окрашиванием антителами против поверхностных антигенов микроспоридий, и с окраской ядер флуоресцентным красителем TO-PRO-3 (Рис. 5-3).

Рис. 5-3 А.



**Рисунок 5-3. А.** Доля TUNEL-положительных макрофагов при заражении культуры двумя видами микроспоридий. Сектор столбика «*V. corneae*», заполненный косыми линиями, соответствует доли TUNEL+клеток, содержащих споры. **Б.** THP-1 макрофаги через 4 дня после инкубации с живыми спорами *Encephalitozoon cuniculi* (А) и *Vittaforma corneae* (В), и убитыми спорами *E. cuniculi* (С), окрашенные по методу TUNEL, конфокальная микроскопия. Верхний ряд снимков получен в результате наложения 3-х каналов: длинноволнового красного (far red) для ядерного красителя TO-PRO 3 (представлен синим цветом), красного – для TMR-red (красит TUNEL-положительные ядра) и зеленого - ALEXA-488 (красит микроспоридии). Нижний ряд снимков, DIC. Вставка на рис. В демонстрирует типичную клетку, заражённую *V. corneae*, с двумя апоптозными ядрами. Вставка на рис. С демонстрирует TUNEL-положительные клетки, заполненные фагоцитированными мёртвыми спорами *E. cuniculi*. Масштаб: рисунки а-с, вставка с, 20 мкм; вставка b, 10 мкм.

Анализ конфокальных изображений демонстрирует, что в случае заражения культуры клеток живыми спорами *E. cuniculi* лишь незначительная доля ядер (3,3%) окрашивались TUNEL. При этом в клетках с развивающимися простейшими апоптозные ядра наблюдались крайне редко. Из 66 клеток с паразитофорными вакуолями *E. cuniculi* только две (3%) содержали апоптозные (TUNEL-положительные) ядра. Заражение спорами *V. corneae*, во-первых, в меньшей степени ингибировало индуцированный апоптоз (9.7% апоптозных клеток против 3.3% в случае *E. cuniculi*) и, во-вторых, почти в 22% клеток, содержащих споры и стадии *V. corneae*, наблюдался апоптоз, что не позволяет сделать однозначный вывод относительно ингибирования индуцированного апоптоза этим видом микроспоридий (Рис. 5-3А).

Как и в предыдущих экспериментах с флуорометрическим TUNEL-тестом, инкубация с мертвыми спорами обоих видов увеличивала количество апоптозных клеток. К 4-му дню после заражения мертвыми спорами большинство спор были переварены. В тех макрофагах, которые все еще были загружены остатками мертвых спор, регулярно наблюдались TUNEL-положительные ядра (Рис. 5-3Б).

### 5.3 Анализ экспрессии генов, связанных с апоптозом

Количественный ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) демонстрирует, что изученные виды микроспоридий по-разному воздействуют на экспрессию генов, связанных с апоптозом.

Чтобы понять механизм подавления апоптоза микроспоридиями, продемонстрированный с помощью измерения каспазной активности и окраски апоптозных ядер методом TUNEL, а также сравнить активность генов, связанных с апоптозом, при заражении разными микроспоридиями, мы выделили РНК из макрофагов, инкубированных с живыми и мертвыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae*, и сравнили уровни экспрессии 84 генов с помощью количественного ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией на микрочипах (см. Материал и методы). Активность генов сравнивалась между 4-мя экспериментальными группами макрофагов: инкубация с мертвыми спорами *E. cuniculi*, (ii) живыми спорами *E. cuniculi*, (iii) мертвыми спорами *V. corneae* и (iv) живыми спорами *V. corneae*. Показатели активности генов рассчитывались относительно активности генов в неинфицированных клетках, обработанных индуктором апоптоза, стауроспорином. Инкубация с мертвыми спорами *E. cuniculi* привела к увеличению доли апрегулированных (upregulated) про-апоптозных генов (93.5%) и уменьшению доли апрегулированных анти-апоптозных генов (36.1%). Напротив, заражение живыми спорами *E. cuniculi* сопровождалось снижением доли апрегулированных про-апоптозных генов (27.5%) и увеличением доли анти-апоптозных

генов с повышенным уровнем регуляции (69.4%). В случае *Vittaforma corneae*, процент про- и анти-апоптозных генов с повышенной экспрессией при внесении мёртвых и живых спор, существенно не различался и составил около 50% для каждой группы генов: 48.5% про-апоптозных и 50.0% анти-апоптозных генов продемонстрировали повышение уровня экспрессии при внесении живых спор, 47.4% и 55.2% - мёртвых спор (Табл. 5-1).

Уровни экспрессии генов отображались в виде тепловых карт (heat maps), которые наглядно демонстрировали ап-регуляцию кластеров анти-апоптозных генов и даун-регуляцию про-апоптозных генов при заражении макрофагов живыми спорами, и обратное соотношение при инкубации с мёртвыми спорами. В случае *E. cuniculi* эта картина была выражена значительно ярче (Рис. 5-4).

Список генов, уровень экспрессии которых существенно изменялся при внесении спор микроспоридий, включал 42 гена, 23 из которых считаются про-апоптозными, 9 – анти-апоптозными и 10 – регуляторными (Табл. 5-2). Внесение спор микроспоридий значительно влияло на три группы генов, кодирующие (i) белки семейства BCL2 (11 генов), (ii) каспазы и их регуляторы (8 генов) и (iii) белки суперсемейств TNF и TNFR (11 генов).

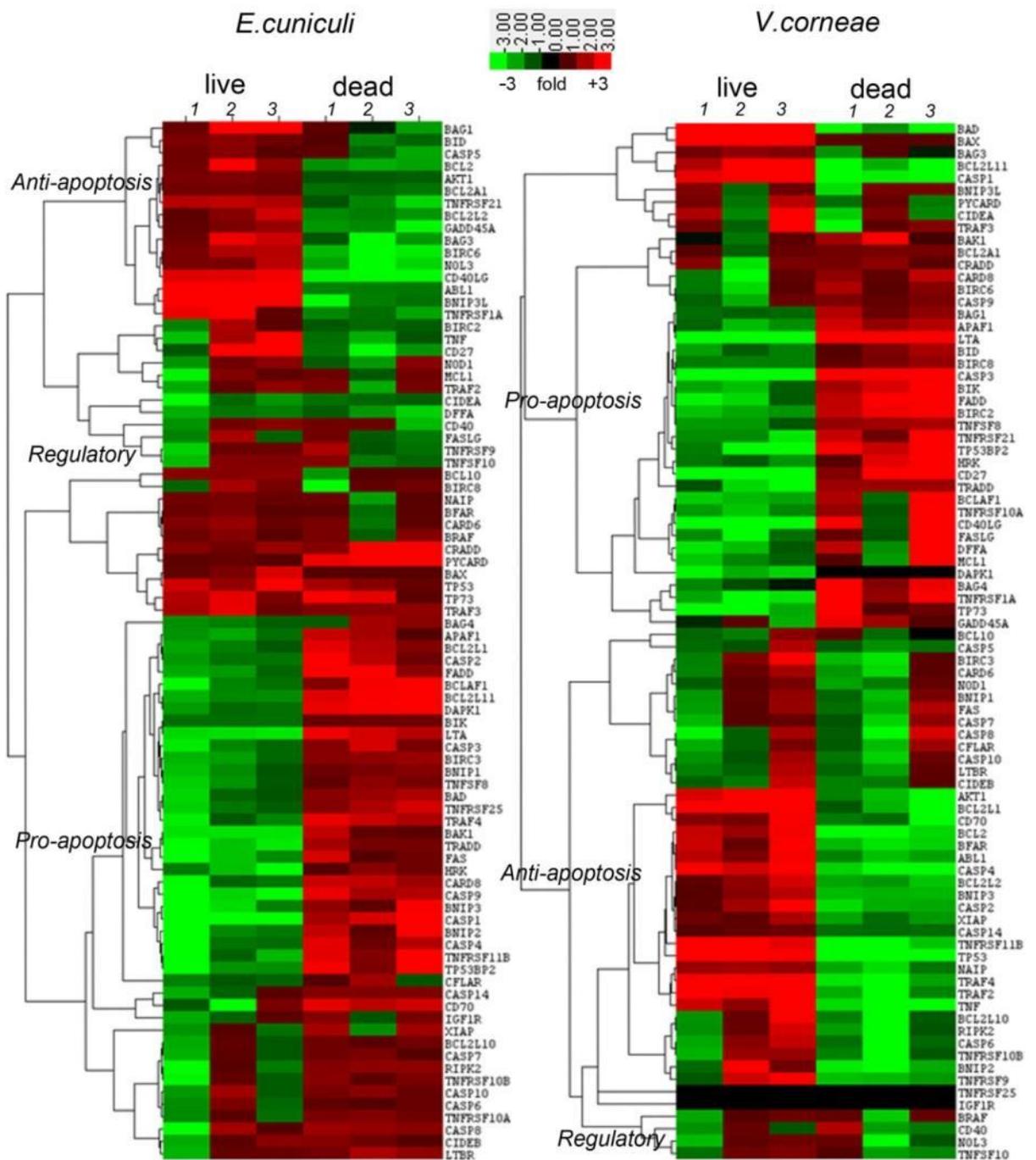
Споры обоих видов влияли на экспрессию анти-апоптозного гена BCL2 одинаково: живые споры усиливали экспрессию, а мёртвые споры ослабляли. Интересно, что экспрессия гена про-апоптозного белка BAX, известного как антагонист BCL2, также незначительно усиливалась при заражении живыми (+1.75) и мёртвыми спорами *E. cuniculi* (+1.04), а также мёртвыми спорами *V. corneae* (+1.10). В случае же заражения живыми спорами *V. corneae* экспрессия BAX увеличивалась почти в 8 (7.67) раз. Ген BAX оказался четвертым по росту уровня экспрессии, связанного с внесением живых спор *V. corneae*, после (i) опухолевого белка TP53 (+ 100), (ii) BAD (+10.72) – еще одного члена семейства про-апоптозных BCL 2, и (iii) каспазы 1 (+8.17). В случае внесения живых спор *E. cuniculi*, гены BAD и CASP1 были даун-регулированы. В целом, в случае *E. cuniculi*, большинство про-апоптозных членов семейства BCL2 характеризовались пониженной экспрессией при заражении живыми спорами и повышенной – мертвыми (Таблица 5-2, Рис. 5-4). Гены всех 4-х каспаз (CASP1, CASP3, CASP4 и CASP9), попадающих в «Топ-10 список» (значения, выделенные курсивом в Табл. 5-3), показывали снижение экспрессии при внесении живых спор *E. cuniculi*. Споры *V. corneae*, напротив, вызвали значительное повышение активности генов CASP1 и CASP4, кодирующих «воспалительные каспазы» и участвующие в активации инфламасом (Sollberger et al., 2012). Интересно, что мёртвые споры *V. corneae*, в отличие от мёртвых спор *E. cuniculi*, подавляли экспрессию этих генов. Ген CASP9 был наиболее даун-

регулируемым геном в случае внесения живых спор *E. cuniculi* (-5.33) (Табл. 3). При заражении живыми спорами *V. corneae* этот ген был даун-регулирован лишь незначительно (-0.66). Заражение живыми спорами обоих видов даун-регулировали CASP3, хотя и в разной степени: *V. corneae* – в (-) 3.83 раза, *E. cuniculi* – в (-) 1.88 раза.

**Таблица 5-1. Доля про- и анти-апоптозных генов, характеризующихся повышенной или пониженной экспрессией\* после обработки макрофагов (МФ) спорами микроспоридий**

| виды**       | про-апо гены,<br>up |             | про-апо гены,<br>down |             | анти-апо гены,<br>up |             | анти-апо гены,<br>down |             |
|--------------|---------------------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|-------------|------------------------|-------------|
|              | N                   | %           | N                     | %           | N                    | %           | N                      | %           |
| <i>Ecd_1</i> | 42                  | 93.3        | 3                     | 6.7         | 4                    | 21.1        | 15                     | 78.9        |
| <i>Ecd_2</i> | 44                  | 93.6        | 3                     | 6.4         | 9                    | 42.9        | 12                     | 57.1        |
| <i>Ecd_3</i> | 44                  | 93.6        | 3                     | 6.4         | 9                    | 42.9        | 12                     | 57.1        |
| среднее      | 43.3                | <b>93.5</b> | 3.0                   | <b>6.5</b>  | 7                    | <b>36.1</b> | 13                     | <b>63.9</b> |
| <i>Ecl_1</i> | 7                   | 14.9        | 40                    | 85.1        | 11                   | 52.4        | 10                     | 47.6        |
| <i>Ecl_2</i> | 19                  | 39.6        | 29                    | 60.4        | 17                   | 81.0        | 4                      | 19.0        |
| <i>Ecl_3</i> | 13                  | 27.7        | 34                    | 72.3        | 15                   | 75.0        | 5                      | 25.0        |
| среднее      | 13                  | <b>27.5</b> | 34                    | <b>72.5</b> | 14                   | <b>69.4</b> | 6                      | <b>30.6</b> |
| <i>Vcd_1</i> | 16                  | 37.2        | 27                    | 62.8        | 8                    | 40.0        | 12                     | 60.0        |
| <i>Vcd_2</i> | 23                  | 47.9        | 25                    | 52.1        | 10                   | 50.0        | 10                     | 50.0        |
| <i>Vcd_3</i> | 26                  | 60.5        | 17                    | 39.5        | 10                   | 62.5        | 6                      | 37.5        |
| среднее      | 22                  | <b>48.5</b> | 23                    | <b>51.5</b> | 9                    | <b>50.0</b> | 9                      | <b>50.0</b> |
| <i>Vcl_1</i> | 14                  | 31.1        | 31                    | 68.9        | 8                    | 40.0        | 12                     | 60.0        |
| <i>Vcl_2</i> | 20                  | 43.5        | 26                    | 56.5        | 10                   | 52.6        | 9                      | 47.4        |
| <i>Vcl_3</i> | 31                  | 67.4        | 15                    | 32.6        | 14                   | 73.7        | 5                      | 26.3        |
| среднее      | 22                  | <b>47.4</b> | 24                    | <b>52.6</b> | 11                   | <b>55.2</b> | 9                      | <b>44.8</b> |

\* уровень экспрессии (E) генов считался изменённым при  $-2 \geq \Delta E \geq +2$  ( $\Delta E = E$  обработанных спорами МФ: E необработанных МФ). \*\**Ecd*, *Encephalitozoon cuniculi* мёртвые; *Ecl*, *E. cuniculi* живые; *Vcd*, *Vittaforma corneae*, мёртвые; *Vcl*, *V. corneae*, живые; 1, 2, 3, повторности опыта.



**Рисунок 5-4.** Дифференциальная экспрессия 84 генов в THP-1 макрофагах (МФ), инкубированных с живыми и мертвыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae*. Цифры курсивом сверху обозначают 3 повторности. Цвета указывают на уровень экспрессии относительно МФ, не обработанных спорами. Тепловые карты и иерархические деревья кластеров генов, связанных с апоптозом (Cluster Software и Java Treeview (de Hoon et al., 2004; Eisen et al., 1998)).

**Таблица 5-2.** Список из 42 генов, связанных с апоптозом, демонстрирующих изменение уровня экспрессии хотя бы в одной из экспериментальных групп макрофагов, обработанных спорами микроспоридий.

| Название гена    | Описание (функция)   | Экспериментальные группы* |                      |                      |                      |
|------------------|--|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                  |  | Ec <sup>1</sup> live      | Ec <sup>1</sup> dead | Vc <sup>2</sup> live | Vc <sup>2</sup> dead |
| <b>ABL1</b>      | C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase                 | <b>+4.65</b>              | -1.48                | +2.20                | -1.92                |
| <b>AKT1</b>      | V-akt murine thymoma viral oncogene hom.1, Ser/Thr kinase  | +1.43                     | -1.07                | <b>+4.38</b>         | <b>-7.90</b>         |
| <b>BAD</b>       | BCL2-associated agonist of cell death                      | -1.58                     | +1.83                | <b>+10.72</b>        | <b>-3.36</b>         |
| <b>BAG1</b>      | BCL2-associated athanogene                                 | <b>+2.60</b>              | -0.38                | +1.7                 | -1.24                |
| <b>BAG3</b>      | BCL2-associated athanogene 3                               | <b>+2.17</b>              | <b>-2.51</b>         | +1.52                | -0.35                |
| <b>BAG4</b>      | BCL2-associated athanogene 4                               | -1.45                     | +0.83                | -0.94                | <b>+2.79</b>         |
| <b>BAK1</b>      | BCL2-antagonist/killer 1                                   | <b>-2.70</b>              | +1.52                | -0.17                | +1.91                |
| <b>BAX</b>       | BCL2-associated X protein                                  | +1.75                     | +1.04                | <b>+7.67</b>         | +1.1                 |
| <b>BCL2</b>      | B-cell CLL/lymphoma 2                                      | +2.04                     | <b>-1.91</b>         | +2.36                | -3.13                |
| <b>BCL2L1</b>    | BCL2-like 1  | -1.52                     | +2.14                | <b>+4.41</b>         | <b>-3.20</b>         |
| <b>BCL2L11</b>   | BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)                       | -1.80                     | <b>+2.96</b>         | <b>+4.13</b>         | <b>-5.08</b>         |
| <b>BCLAF1</b>    | BCL2-associated transcription factor 1                     | -1.96                     | <b>+2.93</b>         | <b>-2.20</b>         | +1.70                |
| <b>BIRC2</b>     | Baculoviral IAP repeat-containing 2                        | +0.52                     | -1.13                | -2.04                | <b>+2.89</b>         |
| <b>BIRC6</b>     | Baculoviral IAP repeat-containing 6                        | +1.89                     | <b>-2.79</b>         | +1.56                | -0.98                |
| <b>BNIP3</b>     | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3            | <b>-2.62</b>              | +1.92                | +1.60                | -2.18                |
| <b>BNIP3L</b>    | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like       | <b>+4.48</b>              | <b>-2.30</b>         | +0.52                | +0.07                |
| <b>CARD8</b>     | Caspase recruitment domain family, member 8                | <b>-2.94</b>              | +2.18                | -1.9                 | +1.7                 |
| <b>CASP1</b>     | Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase            | <b>-4.78</b>              | <b>+2.82</b>         | <b>+8.17</b>         | <b>-12.44</b>        |
| <b>CASP3</b>     | Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase            | -1.88                     | +1.84                | <b>-3.83</b>         | <b>+3.68</b>         |
| <b>CASP4</b>     | Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase            | -2.24                     | +2.03                | <b>+3.32</b>         | <b>-3.21</b>         |
| <b>CASP9</b>     | Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase            | <b>-5.33</b>              | +2.29                | -0.66                | +1.37                |
| <b>CIDEA</b>     | Cell death-inducing DFFA-like effector a                   | <b>-3.91</b>              | -1.22                | +2.46                | -0.84                |
| <b>CRADD</b>     | CASP2 and RIPK1 domain with death domain adaptor           | +1.58                     | <b>+3.64</b>         | +0.11                | +1.40                |
| <b>DARK1</b>     | Death-associated protein kinase 1                          | -1.48                     | <b>+2.97</b>         | <b>-2.49</b>         | n/d <sup>3</sup>     |
| <b>DFFA</b>      | DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide         | -1.67                     | <b>-1.80</b>         | -2.02                | +1.26                |
| <b>FADD</b>      | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain                  | -1.69                     | <b>+3.14</b>         | -2.19                | <b>+3.09</b>         |
| <b>GADD45A</b>   | Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha              | +1.47                     | <b>-2.12</b>         | -0.48                | +1.99                |
| <b>LTA</b>       | Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)              | <b>-2.66</b>              | +2.51                | <b>-5.85</b>         | <b>+7.72</b>         |
| <b>NOL3</b>      | Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) | +1.69                     | <b>-2.55</b>         | +0.08                | -0.91                |
| <b>PYCARD</b>    | PYD and CARD domain containing                             | +1.10                     | <b>+3.15</b>         | +0.73                | -0.53                |
| <b>CD27</b>      | TNFR family, CD27 molecule                                 | +1.76                     | <b>-2.36</b>         | <b>-3.99</b>         | <b>+5.24</b>         |
| <b>CD40LG</b>    | TNFR family, CD40 ligand                                   | <b>+2.74</b>              | <b>-5.56</b>         | <b>-4.33</b>         | <b>+4.94</b>         |
| <b>FAS</b>       | Fas (TNF receptor superfamily, member 6)                   | <b>-2.32</b>              | +1.64                | 0.32                 | -1.88                |
| <b>TNFRSF11B</b> | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b     | <b>-3.05</b>              | <b>+2.61</b>         | <b>+3.94</b>         | <b>-3.87</b>         |
| <b>TNFRSF1A</b>  | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A      | <b>+2.81</b>              | -1.63                | <b>-3.01</b>         | <b>+4.25</b>         |
| <b>TNFRSF21</b>  | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21      | <b>+2.16</b>              | <b>-1.72</b>         | -2.02                | +2.32                |
| <b>TP53</b>      | Tumor protein p53  | <b>+2.46</b>              | +1.59                | <b>+100.6</b>        | <b>-46.4</b>         |
| <b>TP53BP2</b>   | Tumor protein p53 binding protein, 2                       | <b>-2.87</b>              | <b>+2.65</b>         | <b>-2.98</b>         | <b>+3.91</b>         |
| <b>TP73</b>      | Tumor protein p73  | <b>+2.11</b>              | <b>+2.75</b>         | <b>-3.15</b>         | <b>+10.16</b>        |
| <b>TRADD</b>     | TNFRSF1A-associated via death domain                       | <b>-2.78</b>              | +1.57                | <b>-2.56</b>         | +1.86                |
| <b>TRAF2</b>     | TNF receptor-associated factor 2                           | +0.29                     | -2.04                | +3.25                | <b>-3.58</b>         |
| <b>TRAF4</b>     | TNF receptor-associated factor 4                           | -1.82                     | +2.40                | <b>+3.58</b>         | <b>-3.38</b>         |

\*Цифры показывают, во сколько раз изменился уровень экспрессии по сравнению с необработанными спорами; каждое значение - среднее из 3-х повторностей. В рядах без выделения – анти-апоптозные гены; темно-серым выделены ряды с про-апоптозными генами; светло-серым – с регуляторными. <sup>1</sup> Ec, *Encephalitozoon cuniculi*; <sup>2</sup> Vc, *Vittaforma corneae*; <sup>3</sup> данные отсутствуют; значения для 10 максимально ап- или даун-регулируемых генов в каждой экспериментальной группе выделены жирным шрифтом.

Инфицирование живыми спорами обоих видов заметно уменьшало экспрессию LTA, гена, кодирующего фактор некроза опухоли-β или Limphotoxin-α (*E. cuniculi*: -2.66; *V. corneae*: -5.85). Мертвые споры, наоборот, индуцировали экспрессию LTA (*E. cuniculi*: +2.29, *V. corneae*: +5.85). Про-апоптозные гены FAS, FADD, TNFRSF11B, TRADD, кодирующие рецепторы цитокинов надсемейства TNFR и связанных с ними белков, были даун-регулированы живыми и ап-регулированы мёртвыми спорами *E. cuniculi*. Однако живые споры *V. corneae*, напротив, существенно ап-регулировали TNFRSF11B (+3,94) и незначительно – FAS (+0.30), тогда как мёртвые *V. corneae* споры даун-регулировали оба этих гена. Гены анти-апоптозных и регуляторных членов семейства TNFR, CD40LG и CD27 демонстрировали повышенную экспрессию при заражении живым спорами *E. cuniculi*, пониженную – при заражении мёртвыми спорами *E. cuniculi*, и обратную зависимость в случае заражения живыми и мёртвыми спорами *V. corneae* (Табл. 5-2). Этот факт свидетельствует о том, что оба вида, *E. cuniculi* и *V. corneae*, по-разному влияют на секрецию цитокинов макрофагами.

Наиболее впечатляющим был факт 100-кратной ап-регуляции гена опухолевого роста TP53 живыми спорами *V. corneae* при 46-кратной даун-регуляции мертвыми спорами. Такая сверхмощная экспрессия указывает на исключительную роль этого транскрипционного фактора во взаимодействии именно *V. corneae* с клеткой-хозяином. Для сравнения, живые и мертвые споры *E. cuniculi* умеренно увеличивали экспрессию TP53 (живые в 2,5 раза, мертвые в 1,59 раза).

#### **5.4 Обсуждение результатов: сравнительный анализ модуляции индуцированного апоптоза микроспоридиям**

Подавление активности цистеиновой аспарагиновой протеазы 3 (каспаза К3) живыми (но не мёртвыми!) спорами *E. cuniculi* и *V. corneae* свидетельствует о блокировке заключительного этапа апоптозного каскада развивающимися в клетке паразитами. Наши данные согласуются с предшествующими работами (del Aguila et al., 2006), в которых показано с помощью вестерн гибридизации, что заражение *E. cuniculi* препятствовало расщеплению К3 в клетках Vero. В другой работе с помощью цитохимии было продемонстрировано снижение активности К3 в кишечном эпителии медоносных пчел при заражении *Nosema ceranae* (Higes et al., 2013). Следует отметить, что *Toxoplasma gondii* и другие внутриклеточные паразиты также блокируют активацию К3 в зараженных клетках (Payne et al., 2003). В ходе апоптоза, каспазы К8, К9 и К10 активируют К3, что запускает процессы аутофагии и протеосомного расщепления, приводящие к деградации ядер и других органелл. Все три сигнальных пути апоптоза митохондриальный (intrinsic), рецепторный (extrinsic death-receptor) и перфориновый

(perforin/granzyme pathways) переключаются на уровне К3, расщепление которой запускает финальную фазу апоптоза (Bruchhaus et al., 2007). Окрашивание методом TUNNEL позволяет визуализировать разрывы молекул ДНК, характерные для разрушающихся ядер. Значительное сокращение числа TUNNEL-положительных ядер было ранее показано в кишечных эпителиальных клетках медоносных пчел в ответ на инфекцию *N. apis* и *N. ceranae* (Huang et al., 2016; Kurze et al., 2015; Martin-Hernandez et al., 2017). Таким образом, результаты окрашивания, представленные здесь, подтверждают предыдущие исследования и подтверждают, что блокада заключительных стадий апоптоза является общей чертой патогенеза микроспоридий.

Интересно, что в случае *V. corneae* мы не смогли продемонстрировать значительного уменьшения числа TUNNEL-положительных клеток. Кроме того, флуоресцентный TUNNEL в сочетании с иммуноокрашиванием спор показал, что > 20% макрофагов со спорами *V. corneae* подвергались апоптозу. Существование различных схем контроля сигнальных путей, ведущих к гибели клетки хозяина, отражает различную биологию паразитов. *E. cuniculi* развивается в паразитофорной вакуоли (ПВ) и может инфицировать соседние клетки путём выстреливания спор, расположенных внутри ПВ. Кроме того, в случае естественного заражения, макрофаги, нагруженные стадиями и спорами, заключёнными в ПВ-мембрану, служат для транспортировки паразита от первичного очага инфекции к другим тканям организма. Таким образом, эволюция биохимических механизмов, обеспечивающих защиту клетки хозяина от преждевременной запрограммированной гибели клеток, могла способствовать биологическому успеху *E. cuniculi*. *V. corneae*, в отличие от *E. cuniculi*, развивается без ПВ, и споры в конечном итоге заполняют всю цитоплазму клетки хозяина. Споры *V. corneae* должны покинуть клетку-хозяина и под действием внешнего стимула запустить выброс полярной трубки для инфицирования соседних клеток. Смерть и разрушение клетки-хозяина после созревания спор *V. corneae* – единственный способ доставить споры во внешнюю среду, и защита от апоптоза после созревания спор не имеет биологического смысла. Другой отличительный признак *V. corneae* – образование двух- и многоядерных клеток. Ранее подобный эффект наблюдался при заражении *V. corneae* клеток Vero (Leitch et al., 2005). Исходя из наших данных, можно заключить, что инфекция *V. corneae* в меньшей степени подавляет апоптоз. Эффект этого вида на клетку хозяина, по-видимому, заключается в торможении цитокинеза заражённых клеток. Следует отметить, что *Nosema ceranae* и *N. apis* также модулировали клеточный цикл энтероцитов пчел с помощью ускорения перехода заражённых клеток из фазы G1 в фазу синтеза S. При этом каждый вид использовал специфические биохимические механизмы

(Martin-Hernandez et al., 2017). Варьирование способов модуляции клеточного цикла и апоптоза клеток-хозяев различными видами предполагает, что в ходе эволюции имела место тонкая настройка этих процессов в соответствии с видоспецифическими физиологическими адаптациями паразита.

Анализ экспрессии апоптозных генов, обусловленной внесением спор микроспоридий, также выявил глубокие различия между двумя видами. Инфекция *E. cuniculi* и *V. corneae* часто вызывала повышение экспрессии различных групп генов. Двенадцать из 42-х генов, на которых заражение микроспоридиями повлияло наиболее значительно (Табл. 3), разнонаправлено регулировались *E. cuniculi* и *V. corneae*. В случае *E. cuniculi*, про-апоптозные гены, такие как Bad (-1,6), Bcl-2L1 (-1,5) и BclL-2L11 (-1,8), были подавлены, а анти-апоптозные гены, такие как Birc2 (+0,52) и CD40LG (+2,74) - активизированы. В случае *V. corneae*, вышеназванные про-апоптозные гены были, в основном, ап-регулированы (Bad (+10,72), Bcl-2L1 (+4,4) и Bcl-2L11 (+4,1)), анти-апоптозные – наоборот (Birc2 (-2,4) и CD40LG (-4,33)) (Рис. 6А). Спектр ап- и даун-регулируемых генов указывает на то, что инфекция *E. cuniculi* защищала макрофаги от апоптоза в анализируемой временной период – через 4 дня после заражения, т.е. тогда, когда формировалось первое поколение спор. *V. corneae*, напротив, вызывала повышение активности ряда про-апоптозных генов, что указывает скорее на положительную, чем отрицательную регуляцию апоптоза (Табл. 5-2, Рис. 5-5).

Экспрессия нескольких генов, однако, изменялась одинаково после внесения живых спор обоих видов: анти-апоптозный ген Bcl-2 ап-регулировался, тогда как про-апоптозные гены LTA, CARD8 TP53BP2, DARC1 и BCLAAF 1 были даун-регулированы. Учитывая, что мёртвые споры *E. cuniculi* и *V. corneae* модулировали экспрессию этих генов в обратном направлении (Рис. 7а), мы предполагаем, что оба вида микроспоридий в ходе внутриклеточного развития продуцируют анти-апоптозные стимулы. В случае *V. corneae*, заметная (+10,7) положительная регуляция Bad, члена группы белков ВНЗ, ключевых регуляторов митохондриального сигнального пути, вместе с повышенной экспрессией протеинкиназы Akt1 (+4.38), может указывать на то, что микроспоридиоз вызывает фосфорилирование Bad. Увеличение доли фосфорилированного Bad коррелировало с ингибированием апоптоза, при заражении клеток *Trypanosoma cruzi* и *Leishmania* spp. В этих же экспериментах было показано, что фосфорилирование, опосредованное Akt / PKB, отрицательно регулировало активность про-апоптозного Bad (Aoki et al., 2006; Ruhland et al., 2007).

Существенное влияние заражения микроспоридиями на экспрессию белков семейства Bcl-2 было ожидаемым. Это семейство включает про- и анти-апоптозные

модуляторы апоптозного пути, которые регулируют высвобождение цитохрома С и других про-апоптозных факторов из межмембранного пространства митохондрий (Luo et al., 1998). Белки Bcl-2 отрицательно регулировались многими внутриклеточными паразитами (Faherty, Maurelli, 2008; Graumann et al., 2009). Инфекции *Toxoplasma gondii* (Channon et al., 2002; Goebel et al., 2001; Molestina et al., 2003; Orlofsky et al., 2002), *Trypanosoma cruzi* (Aoki et al., 2006; Chuenkova, Pereira, 2000), *Theileria parva* (Dessaige et al., 2005), *Cryptosporidium parvum* (Liu et al., 2009) индуцировали экспрессию анти-апоптозных белков семейства Bcl-2. И, наконец, в клетках кишечного эпителия пчел, инфицированных микроспоридиями *N. ceranae* и *N. bombicis*, была также зарегистрирована ап-регуляция белка, гомологичного анти-апоптозному Bcl-2 (“*Drosophila* buffy protein”) (Martin-Hernandez et al., 2017).

Каспаза К9, экспрессия которой заметно снижалась (-5.53) после заражения *E. cuniculi*, запускает расщепление про-каспазы 3 и последующие реакции, приводящие к дезинтеграции и смерти клеток (Bratton, Salvesen, 2010). Подавление К3 и К9, наряду с активацией анти-апоптозного Bcl-2, показывает, что *E. cuniculi* (Рис. 8) и, вероятно, *V. corneae* контролируют митохондриальный сигнальный путь. Было показано, что именно этот путь наиболее часто отрицательно регулируется многими внутриклеточными паразитами (Graumann et al., 2009), включая несколько видов микроспоридий, *Anncaliia algerae* (Scanlon et al., 1999), *Nosema ceranae*, *N. apis* (Huang et al., 2016; Martin-Hernandez et al., 2017) и *N. bombicis* (He et al., 2015).

Помимо модулирования апоптоза, белки семейства Bcl-2 могут функционировать в качестве важнейших регуляторов воспалительного ответа, связанного с инфекциями различных паразитов, как про- так и эукариот (Faherty, Maurelli, 2008; Hay, Kannourakis, 2002; James, Green, 2004; Luder et al., 2001; Orlofsky et al., 2002). В наших опытах повышенная экспрессия про-апоптозных Bcl-2L1 и Bcl-2L11 после заражения *V. corneae* (но не *E. cuniculi*), может свидетельствовать о том, что *V. corneae* вызывает сильный воспалительный ответ через сигнальный путь, включающий белки семейства Bcl-2. Заражение *E. cuniculi*, возможно, подавляет этот сигнальный путь. Известно, что противодействие воспалительной ответной реакции организма обеспечивает выживание и репликацию паразита и является его ключевой целью. Показано, что многие виды микроспоридий успешно используют воспалительные сигнальные пути хозяина в своих интересах. Например, многие паразиты рыб развиваются в индуцируемых ими опухлях-ксеномах, в которых воспалительные и эпителиальные клетки защищают и питают паразитов и даже секретируют факторы роста, стимулирующие ангиогенез, как в типичных опухлях (Kent et al., 2014; Lom, Dykova, 2005). Другой пример – виды рода

*Encephalitozoon*, вызывающие образование мультиорганных гранул. В то же время, микроспоридии родов *Enterocytozoon*, *Tracheplista*, *Anncaliia* и *Vittaforma*, также иногда паразитирующих в млекопитающих, не проявляют эту патологию (Snowden, 2014; Weiss, 2014), что еще раз говорит о различных способах модуляции воспалительного ответа различными видами микроспоридий.

Идея о том, что *V. corneae* и *E. cuniculi* активируют различные воспалительные пути, согласуется с данными о том, что каспазы K1 и K4 негативно регулировались живыми спорами *E. cuniculi* (-4.78 и - 2.24 соответственно), и положительно – живыми спорами *V. corneae* (+8.17 и +3.32). Эти две функционально взаимосвязанные каспазы (K1 действуют, как субстрат для K4) играют роль в воспалении и врожденном неспецифическом иммунитете. Они участвуют в формировании иммунных комплексов, инфламсом, и активируют секрецию цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 макрофагами млекопитающих (Sollberger et al., 2012). Можно предположить, что в процессе адаптивной эволюции у *E. cuniculi* – специализированного паразита макрофагов млекопитающих, сформировались механизмы подавления «воспалительных каспаз». С другой стороны, инфекция *E. cuniculi* характеризовалась избыточной экспрессией генов CD 27, CD 40LG, TNFRSF1A и TNFRSF21, которые, напротив, были отрицательно регулированы *V. corneae*. Все эти члены надсемейства TNFR (рецепторы фактор некроза опухоли) являются про-воспалительными модуляторами и/или мощными цитокинами (Hehlgans, Pfeffer, 2005; Locksley et al., 2001). Положительная регуляция этих генов *E. cuniculi*, вероятно, помогает паразиту рекрутировать иммунно-компетентные клетки - макрофаги, лейкоциты, мононуклециты и эозинофилы, индуцировать клеточную пролиферацию и формировать множественные гранулематозные поражения различных органов. Именно эта патология характеризует микроспоридиозы, вызываемые *Encephalitozoon* spp. в различных позвоночных хозяевах (Snowden, Shadduck, 1999; Sokolova et al., 2016; Weiss, 2014).

Наконец, необычайно резкое (>100 раз!) повышение экспрессии гена p53 после внесения живых спор *V. corneae*, показанное в нашем исследовании, указывает на участие сигнального пути p53 в паразито-хозяинных взаимоотношениях. Ранее было показано, что заражение *Encephalitozoon* spp. ингибировало фосфорилирование и транслокацию p53 в ядра клеток Vero, и тем самым блокировало транскрипционные функции этого белка. Авторы пришли к выводу, что паразит контролировал цикл клеток-хозяев, ингибируя активацию p53, но не апоптоз, поскольку они не наблюдали увеличения экспрессии гена Bax - одной из транскрипционных мишеней p53 (del Aguila et al., 2006). В нашем исследовании заражение живыми и мертвыми спорами *E. cuniculi*

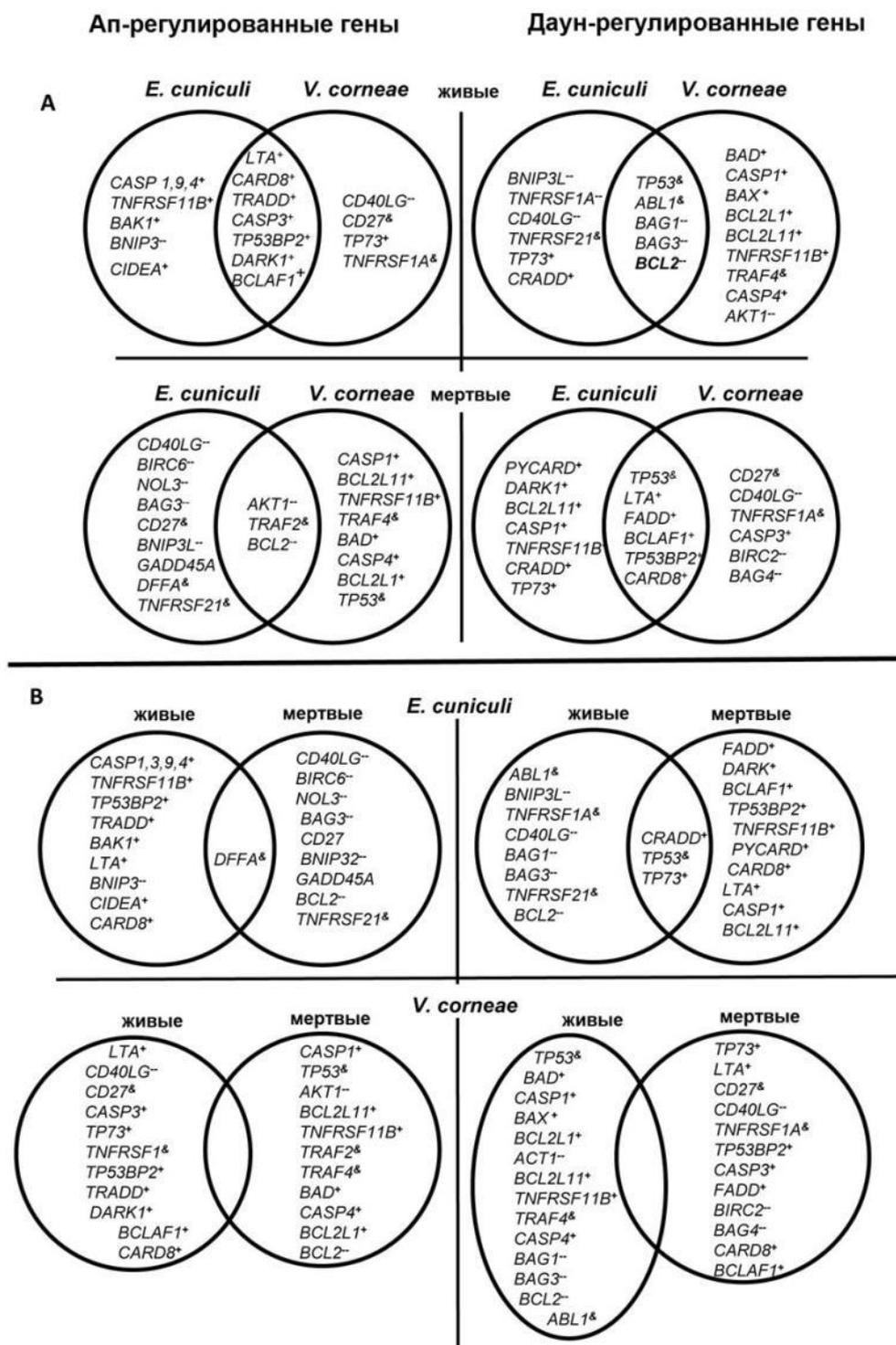
также вызывало умеренное повышение экспрессии белков семейства p53 (p53 и p73), что указывает на участие сигнального пути p53 в реакции на инфекцию. Считается, что путь p53, наряду с путём NF- $\kappa$ B – ключевой сигнальный маршрут, обеспечивающий стабильность генома, ингибирование неопластических процессов и сохранения клеточного гомеостаза (Cooks et al., 2014; Fridman, Lowe, 2003).

Одна из ролей P53 – это защита клетки и организма от воспалительного стресса, связанного с вирусными и бактериальными инфекциями, и предотвращение преобразования хронического воспаления в рак. Некоторые онкогенные вирусы и бактерии, такие как *Helicobacter pylori*, выработали механизмы, позволяющие инактивировать или модулировать ингибирующее действие p53 (Cooks et al., 2014). Функция p53 (как и NF- $\kappa$ B) в качестве транскрипционного фактора и модулятора иммунного ответа восходит к ранним беспозвоночным и связана с врождённым иммунитетом (innate immunity). В частности, было показано, что p53 активирует гены TLR в Т-лимфоцитах и альвеолярных макрофагах (Menendez et al., 2011). Повышенная экспрессия p53 может указывать на острый ответ макрофага на стресс, вызванный *V. corneae*. Примечательно, что экспрессия еще двух генов, Вах, транскрипционной мишени p53 в сигнальной регуляции апоптоза, и Atk, киназы, которая предположительно фосфорилирует p53, также значительно повышалась. Сверхвысокая экспрессия p53 и активация сигнального пути p53 могут быть исключительной особенностью *V. corneae*, учитывая, что этот вид микроспоридий влияет на клеточный цикл хозяина, вызывая арест клеточного цикла и многоядерность (Leitch et al., 2005; наши исследования). Гипотеза об активации противоракового сигнального пути p53 согласуется с данными о подавлении опухолевого роста микроспоридиями (Petri, 1976) и требует тщательной экспериментальной проверки.

### **5.5 Заключение по главе 5 и перспективы исследований модуляции клеточных циклов клеток хозяина микроспоридиями**

Заражение живыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae* ингибировало митохондриальный сигнальный путь апоптоза, индуцированного стауроспорином (снижение активности каспазы 3, снижение экспрессии генов *Casp 3* и *9* и *Bcl2* и др.); в то же время, внесение убитых спор, напротив, стимулировало апоптоз. Эффект ингибирования был ярче выражен в случае заражения *E. cuniculi*. Заражение *E. cuniculi* защищало как инфицированные, так и соседние макрофаги от апоптоза. В то же время, заражение живыми спорами *V. corneae* вызывало более сильную экспрессию генов, связанных с воспалительным процессом (*Bcl2*, *Casp 1* и *4*). Различный эффект

микроспоридий двух видов на гены, ассоциированные с апоптозом, отражает, по-видимому, различия в биологии между двумя видами.



**Рисунок 5-5.** Сравнение влияния живых и мертвых спор *E. cuniculi* and *V. corneae* на экспрессию апоптозных генов в ТНР-1 макрофагах. На диаграммах показаны гены, которые были ап- или даун-регулированы как минимум в 1.5 раза. **7 А.** *E. cuniculi* vs. *V. corneae*. **7 В.** Живые vs. Мертвые споры. <sup>+</sup> про-апоптозные гены; <sup>-</sup> анти- апоптозные гены; <sup>&</sup> регуляторные гены.

Данное исследование – лишь начальный этап в изучении взаимодействия микроспоридий с метаболическими путями клетки хозяина, связанными с апоптозом. Оно позволяет наметить наиболее перспективные направления для будущих исследований, такие как: (i) изучение влияния микроспоридий на сигнальный путь фактора NF- $\kappa$ B (антагониста p53), (ii) анализ роли белков теплового шока в защите от апоптоза при микроспориозе, (iii) изучение пост-трансляционных модификаций и транслокации белка p53 в ядро и митохондрии клетки хозяина, (iv) изучение кинетики экспрессии генов, а также (v) сравнение действия различных видов микроспоридий на элементы апоптозного каскада клеток разных хозяев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертации обобщены исследования по клеточной биологии, таксономии, происхождению и эволюции микроспоридий, выполненные автором с 1995 по 2017 г. Изучена ультраструктура более 20 видов микроспоридий, включая двух представителей базальной группы *Metchnikovellidae*. На основании молекулярного филогенетического и ультраструктурного анализов описано 12 новых для науки видов микроспоридий и выделено 6 новых родов, а в целом уточнено или определено положение в системе 30 видов микроспоридий, паразитирующих в грегаринах, ракообразных, насекомых и позвоночных. Среди этих видов большинство – паразиты хозяйственно важных организмов, таких как промысловые десятиногие раки, шмели-опылители, огненные муравьи, стадные и нестадные саранчовые, чешуекрылые – вредители леса. Изученные виды М принадлежат ко всем пяти известным филогенетическим группам (суперкладам) типа *Microsporidia*, что позволило оценить размах вариабельности клеточной организации микроспоридий, выявить различные направления приспособительной эволюции и морфологические корреляты диверсификации внутри отдельных групп микроспоридий, а также разрешить некоторые проблемы таксономии микроспоридий изученных групп. В частности, изучена ультраструктура и установлены филогенетические связи для (а) *Agmasoma penaei* и *Perezia nelsoni*, паразитов хозяйственно важных морских Decapoda; (б) *Alfvenia sibirica* и *Agglomerata cladocera* – микроспоридий, паразитирующих в наиболее массовых пресноводных ракообразных отрядах Cladocera и Cyclopoidea; (в) представителей рода *Paranosema* – паразитов жирового тела прямокрылых (сверчков и стадных саранчовых) и жуков; (г) видов рода *Liebermannia*, адаптированных к паразитированию в эпителиях кишечного тракта и его придатков саранчовых Нового Света; (д) типичного представителя рода *Nosema*, *N. disstriae*, паразитирующего в карантинном вредителе леса, *Malacasoma disstria* (Lepidoptera); (е) микроспоридии *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (Hymenoptera), демонстрирующей сложный жизненный цикл, адаптированный к паразитированию в колонии социальных насекомых. На основании изучения таксономии и эволюции рода *Encephalitozoon*, к которому принадлежат наиболее социально значимые виды микроспоридий – паразиты сельскохозяйственных животных и человека, выделен и охарактеризован новый вид *E. rogonae*, специализированный паразит рептилий. Распространённость микроспоридий у рептилий и изучение филогенетических связей этого вида с другими представителями рода показало древние корни паразитирования энцефалитозоонид у позвоночных животных.

Анализ литературных и собственных данных позволил сделать выводы о природе микроспорициальных инфекций человека. Несмотря на то, что подавляющее большинство микроспорицидий – паразиты беспозвоночных и рыб, и только 4 вида, принадлежащие к двум родам, из описанных примерно 200 родов и 1400 видов, можно считать паразитами человека, тем не менее, оппортунистические инфекции людей с пониженным иммунитетом несвойственными видами микроспорицидий достаточно широко распространены. Потенциальные источники таких инфекций – представители филогенетических клад микроспорицидий, включающие виды-«генералисты», такие как *Anncaliia-Tubulinosema*, *Trachipleistaphora-Vavraia*, *Endoreticulatus-Vittaforma*. Для выявления случаев возможной смены хозяев в процессе эволюции и оценки рисков заражения людей следует обращать особое внимание также на паразитов и гиперпаразитов, заражающих насекомых отрядов Psocoptera и Phthiraptera, паразитов блох, клещей, кровососущих двукрылых и чешуекрылых-гематофагов, ассоциированных с человеком и пре-адаптированных к развитию при высоких температурах.

Впервые с помощью специфического окрашивания мазков стула и ПЦР-диагностики выявлено заражение микроспорицидиями ВИЧ-инфицированных пациентов российского госпиталя. Пробы стула 19% обследованных пациентов содержали споры и ДНК микроспорицидий следующих видов: *Encephalitozoon intestinalis* (13%); *E. cuniculi* (2%); *E. hellem* (1%); *Enterocytozoon bieneusi* (1%); и два не описанных ранее генотипа. Эти данные, а также результаты клинических анализов свидетельствуют о важной роли микроспорицидоза в синдроме иммунодефицитов и подтверждают необходимость диагностики и лечения микроспорицидозов, которые в России не проводятся.

На основании изучения биоразнообразия и клеточной биологии различных групп микроспорицидий выделены две принципиальных причины успешности микроспорицидий как паразитов животных. Это, во-первых, усовершенствование способа заражения клетки с помощью аппарата экстрезии, в котором центральную роль играет полярная трубка – одновременно и продукт, и часть секреторного пути споры микроспорицидий. Во-вторых, с точки зрения паразито-хозяинных отношений, успешность микроспорицидий связана со способностью модулировать клеточный цикл хозяина, в частности, противодействуя естественным процессам гибели клетки-хозяина. Проведённое автором изучение морфофункциональных особенностей секреторного компартмента микроспорицидий, подтвержденное результатами других исследователей, указывает на то, что на всех стадиях развития секреторный компартмент микроспорицидий организован в виде непрерывных тубулярных сетей, формирующихся *de novo* на последовательных

стадиях жизненного цикла. МІN-компаратмент спороплазм, везикулярный кластер меронтов, тубулярный кластер споронтов, тубулярная сеть споробластов и даже сама полярная трубка зрелых спор представляют собой системы связанных между собой мембранных трубковидных структур. Транспорт секретлируемых белков, по-видимому, на всех стадиях происходит с помощью механизма прогрессивного созревания цистерн и слияния гомотипичных компартментов без участия везикулярного транспорта. Организация АГ микроспоридий, особенно на ранних стадиях жизненного цикла, напоминает тубуло-везикулярные кластеры диких штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* (Rambourg et al., 2001, 2008), что согласуется с концепцией родства микроспоридий и грибов. Можно предположить, что на базе тубулярного АГ в процессе адаптивной эволюции к внутриклеточному паразитизму у микроспоридий сформировался комплекс органелл, который обеспечил возникновение уникального способа диссеминации. Трансформацию транс компартмента Гольджи в комплекс органелл аппарата экструзии можно считать основным ароморфозом, связанным с возникновением типа Microsporidia, обеспечившим распространение и успех микроспоридий как внутриклеточных паразитов животных. Специализация этого комплекса органелл к нуждам паразитирования в конкретных хозяевах в значительной степени определила морфологическую диверсификацию внутри типа. Уникальной особенностью организации секреторного транспорта микроспоридий является отсутствие на всех стадиях жизненного цикла везикул размером 50-60 нм, которые в соответствии с основными теориями секреторного транспорта обеспечивают антероградный и ретроградный транспорт карго и резидентных белков АГ. Микроспоридии представляют собой уникальную модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, функционирующей без эндосомальной части секреторного пути, без везикулярного транспорта, без механизма О-гликозилирования, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. С помощью ультраструктурного анализа и цитохимических методов также продемонстрирована структурная гомология органелл, представляющих собой модификации аппарата Гольджи: инвазионной трубки *Paramicrosporidium*, манубриума мечниковеллид и совершенного экструзивного аппарата высших микроспоридий.

На специально разработанных экспериментальных моделях «микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae* – культуры макрофагов человека» с помощью цитохимических методов, измерения активности каспазы 3 и анализа экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл и апоптоз, впервые

продемонстрировано существенное снижение способности заражённых макрофагов к апоптозу по сравнению с незараженными, апрегуляция анти-апоптозных генов (BCL2, TP53 и др.) и даунрегуляция про-апоптозных генов (FADD, CASP3, CD40LG, LTA и генов семейства TNF). Эти результаты позволили подтвердить гипотезу об ингибировании апоптозного каскада клетки хозяина при микроспориidioзе, а также высказать предположение о подавлении апоптоза как универсальном механизме патогенеза микроспоридий.

Данная работа подтверждает важность включения паразитических протистов в число объектов клеточной биологии. Изучение цитологии, молекулярной биологии и разнообразия организации одноклеточных организмов, подобных микроспоридиям, позволяет лучше понять принципы функционирования и потенции эукариотической клетки, изучить возможности трансформации ее органелл для выполнения конкретных функций, а также связать морфофункциональную изменчивость с молекулярными (геномными) характеристиками.

В итоге работы (а) изучена ультраструктура 24 видов микроспоридий, что позволило реконструировать их жизненные циклы и в комбинации с данными по молекулярной филогении и хозяйинной специфичности продемонстрировать родственные связи и направления диверсификации внутри типа *Microsporidia*; (б) описана тонкая организация уникального аппарата Гольджи микроспоридий и показана его роль в формировании полярной трубки; (в) экспериментально продемонстрирован принципиальный механизм взаимодействия микроспоридий с клеткой хозяина, лежащий в основе патогенеза микроспориidioзов: подавление апоптоза. Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы.

## ВЫВОДЫ

1. На основании выполненного молекулярно-филогенетического и ультраструктурного анализов описано 12 новых для науки видов микроспоридий, выделено 6 новых родов, уточнено положение в системе 20 видов микроспоридий, паразитирующих в членистоногих (ракообразных и насекомых).

2. Микроспоридии с примитивными признаками могут сохраняться у хозяев, представленных наиболее древними видами в пределах систематической группы. Так, жизненный цикл и строение клетки *Agmasoma penaei* демонстрируют серию плезиоморфных признаков, что хорошо согласуется с древностью их хозяев, представителей сем. Penaeidae, базальной группы Decapoda.

3. Для паразитов всеветно распространенных морских Decapoda из сем. Penaeidae, таких как *A. penaei* и *P. nelsoni*, характерно формирование клинов постепенно изменяющихся видов со слабо выраженными морфологическими и генетическими различиями.

4. Анализ ультраструктуры, хозяйинной специфичности и молекулярной филогении *Apotasora heleios* указывает на существование клады близкородственных микроспоридий, объединяющей морфологически различные формы, паразитирующие в окуневых рыбах и креветках сем. Carideae, и на наличие сложных циклов с циркулированием паразита между этими группами хозяев.

5. Изучение паразито-хозяйинных отношений микроспоридий показало их высокие адаптивные возможности в приспособлении к жизни в клетках хозяев разного типа или в разных формах хозяев. Так, три изученные вида нового рода *Liebermannia* демонстрируют видоспецифичные клеточные адаптации к паразитированию в различных эпителиях кишечного тракта (Мальпигиевых сосудах, слюнных железах и средней кишке); в частности, обитание в быстро обновляющихся энтероцитах ведет к укорачиванию жизненного цикла, упрощению строения спор и выходу спороплазм из молодых спор с неразвитой полярной трубкой. *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (Hymenoptera) демонстрирует сложный полиморфный жизненный цикл с формированием 4-х видов спор, адаптированный к паразитированию в колонии социальных насекомых, представленной как минимум 7 жизненными формами (яйца, личинки, куколки, 2 касты рабочих, королевы, самцы).

6. Изучение *Nosema disstriae* – типичного представителя рода *Nosema* из клады *N. bombycis*, состоящей из близкородственных паразитов чешуекрылых с инвертированной структурой комплекса генов РНК, указывает на необходимость использования дополнительного генетического маркера – гена RPB1 для установления филогенетических связей между видами этой группы. Так мультигенный филогенетический с включением гена RPB1 и наличие октоспоровой спорогонии в ветви *N. disstriae-V. antheraeae* показали, что выпадение сексуальной фазы происходило неоднократно (как минимум дважды) в процессе диверсификации NbК.

7. *Encephalitozoon* – единственный род микроспоридий, диверсифицированный среди высших позвоночных, что указывает на древность паразитизма энцефалитозоонид у позвоночных хозяев. Это подтверждается анализом распространенности микроспоридий рода *Encephalitozoon* у рептилий, возможностью описания нового вида *E. rogonae* и изучением филогенетических связей этого вида.

8. Впервые в России исследовано распространение и видовое разнообразие микроспоридий, встречающихся у людей с ВИЧ-инфекцией; разработаны и предложены клинические методы тестирования на микроспоридиоз, показанные для ВИЧ-инфицированных больных с симптомами «диарей неясной этиологии» и с пониженным титром т-лимфоцитов (число CD4 клеток <100).

9. Сравнительный анализ ультраструктуры двух видов мечниковеллид, *Paramicrosporidium* (Rozellomycota) и «высших» микроспоридий продемонстрировал структурную гомологию инвазионной трубки парамикроспоридий, манубриума мечниковеллид и совершенного аппарата экстрезии «высших» микроспоридий.

10. Микроспоридии представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. Изучение секреторного транспорта во внутриклеточных стадиях и функциональной морфологии аппарата Гольджи на разных этапах жизненного цикла микроспоридий выявило следующие особенности.

- На всех этапах жизненного цикла АГ организован в виде тубулярных сетей (ТС). Полярная трубка, формирующаяся на стадии споробласта, представляет собой гипертрофированную транс цистерну АГ.
- Секреторный транспорт осуществляется при полном отсутствии везикул с помощью мутационного механизма в соответствии с гипотезой «быстрой компартиментализации цистерн».
- Микроспоридии демонстрируют минимизацию секреторного пути, выраженную в элиминации эндосомального пути, O-гликозилирования и везикулярного транспорта.

11. На экспериментальных клеточных моделях продемонстрировано существенное снижение способности макрофагов к индуцированному апоптозу при заражении микроспоридиями *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae*.

- Заражение микроспоридиями ведет к положительной регуляции анти-апоптозных генов (BLC2, TP53 и др.) и отрицательной регуляции про-апоптозных генов (FADD, CASP3, CD40LG, LTA и генов семейства TNF).
- Подавление активности и экспрессии каспаз 3 и 9, наряду с активацией анти-апоптозного гена Bcl-2 обоими изученными видами микроспоридий, показывает, что эти паразиты контролируют митохондриальный сигнальный путь апоптоза.
- Различные виды микроспоридий по-разному модулируют воспалительный ответ клетки-хозяина, например, у *E. cuniculi*, специализированного паразита макрофагов

млекопитающих (но не у *V. corneae*, паразита эпителия сетчатки глаза), сформировались механизмы подавления «воспалительных» каспаз К1 и К4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видтманн, С.С., Соколова Ю.Я. Описание нового рода *Larssonia* на основании изучения ультраструктуры *Microsporidium (Pleistophora) obtusa* из *Daphnia pulex* (Cladocera) / С.С. Видтманн, Ю.Я. Соколова // Паразитология. – 1994. – Т. 28, № 3. – С. 202-213.
2. Долгих, В.В., Семенов П.П. Белки оболочки спор и полярной трубки микроспоридии *Nosema grylli*: основной белок оболочки спор высвобождается перед экструзией / В.В. Долгих, П.П. Семенов // Цитология. – 2003. – Т. 45, № 3. – С. 324-329.
3. Ефименко, Т.М. О передаче микроспоридии *Vairimorpha antheraeae* половым путем у совок (Noctuidae) / Т.М. Ефименко, Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. – 1990. – Т. 24, № 1. – С. 63 - 70.
4. Исси, И.В. Микроспоридии как тип паразитических простейших / И.В. Исси // Протозоология. – 1986. – Вып 10 «Микроспоридии». – С. 6-137.
5. Князев, А.Н. Цикл развития сверчка *Gryllus bimaculatus*, 1973 Deg. (Orthoptera, Gryllidae) в условиях лабораторного содержания / А.Н. Князев // Энтومол. обозр. – 1985. – Т. 64., Вып. 1. – С. 58-73.
6. Логинов, Е.В., Соколова Ю.Я. С., Громов А.Я. Ускоренный метод окраски полутонких срезов, залитых в аралдит / Е.В. Логинов, Ю.Я. Соколова, А.Я. Громов // Цитология. – 1987. – Т. 29, № 11. – С. 1314-1317.
7. Овчврэнко, Н.А. Новый вид микроспоридий, *Gurleya pontica* sp. n., (Microsporidia, Thelohaniidae) из *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda) / Н.А. Овчврэнко // Паразитология. – 1984. – Т. 18, № 5. – С. 405-408.
8. Селезнев, К.В. Очистка различных стадий жизненного цикла микроспоридии *Nosema grylli* sp. n. из сверчков *Gryllus bimaculatus* центрифугированием в градиенте плотности Перколла / К.В. Селезнев, И.В. Исси, В.В. Долгих, Ю.Я. Соколова, Г.Б. Белостоцкая, О.А. Антонова // Паразитология. – 1994. – Т. 28, № 4. – С. 298-302.
9. Снигиревская, Е.С. Структурно-функциональная организация аппарата Гольджи / Е.С. Снигиревская, Ю.Я. Соколова, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 1. – С. 57-81.

10. Соколова, О.И. Опыт использования технологии ФТА® для сбора, архивирования и молекулярного анализа ДНК микроспоридий из клинических образцов / О.И. Соколова, А.В. Демьянов, Е.С. Дидье, Ю.Я. Соколова // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 11. – С. 911-914.
11. Соколова, Ю.Я., Исси И.В. О роде *Nosema* (Microsporidia) в связи с новыми данными по жизненному циклу микроспоридии *N. mesnili* / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. – 1997. – Т. 31, № 4. – С. 307-313.
12. Соколова, Ю.Я., Исси И.В. Энтомопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Патогены насекомых: структура и функция, – Москва: Круглый год, 2001. – С. 76-188.
13. Соколова, Ю.Я. Ультраструктура ядерного аппарата и электрофоретический кариотип микроспоридии *Nosema grylli*, внутриулеточного паразита сверчка *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, Е.С. Насонова, Н.В. Сомова, С.О. Скарлато // Цитология. – 1998. – Т. 40. – С. 407-415.
14. Соколова, Ю.Я., Селезнев К.В., Долгих В.В., Исси И.В. Микроспоридия *Nosema grylli* n.sp. из сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, К.В. Селезнев, В.В. Долгих., И.В. Исси // Паразитология. – 1994. – Т. 6. – С. 488-493.
15. Соколова, Ю.Я., Сундуков О.В. Подавление активности эстераз как особенность микроспоридиоза сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, О.В. Сундуков // Паразитология. – 1999. – Т. 33, № 6. – С. 527-535.
16. Соколова, Ю.Я. Морфогенез и ультраструктура стадий жизненного цикла *Nosema mesnili* Paillot (Microspora, Nosematidae) / Ю.Я. Соколова, С.А. Тимошенко, И. В. Исси // Цитология. – 1988. – Т. 30. – С. 26-33.
17. Соколова, Ю.Я. Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) в норме и при остром микроспоридиозе, вызываемом *Nosema grylli* / Ю.Я. Соколова, Ю.С. Токарев, Я.Л. Лозинская, В.В. Глупов // Паразитология. – 2000. – Т. 34, № 5. – С. 408-419.
18. Соколова, Ю.Я.. Аппарат Гольджи паразитических простейших (обзор литературы) / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снигиревская, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2007. – Т. 49, №3. – С. 161-181
19. Соколова, Ю.Я. Необычная организация аппарата Гольджи на пролиферативных стадиях жизненного цикла микроспоридий / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снигиревская, С.О. Скарлато, Я.Ю. Комиссарчик, А.А. Миронов // Доклады Академии Наук, Биология. – 2001. – Т. 378. – С. 403-406.

20. Adl, S.M. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists / S.M. Adl, A.G.B. Simpson, M.A. Farmer, R.A. Andersen, O.R. Anderson, et al. // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2005. – V. 52, № 5. – P. 399-451
21. Adl, S.M. The revised classification of eukaryotes / S.M. Adl, A.G.B. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, et al. // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2012. – V. 59, № 5. – P. 429-493.
22. Akiyoshi, D.E. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi* / D.E. Akiyoshi, H.G. Morrison, S. Lei, X. Feng, Q. Zhang, N. Corradi et al. / D.E. Akiyoshi // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5, № 1.– doi: 10.1371/journal.ppat.1000261.
23. Amiri, H. Deep origin of plastid/parasite ATP/ADP translocases / H. Amiri, O. Karlberg, S.G.E. Andersson // *J. Mol. Evol.* – 2003. – V. 56, № 2. – P. 137-150.
24. Anderson, R.G. Caveolae - where incoming and outgoing messengers meet/ R.G. Anderson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1993. – V. 90, № 23. – P. 10909-10913.
25. Andreadis, T.G. Life cycle and epizootiology of *Amblyospora* sp. (Microspora, Amblyosporidae) in the mosquito, *Aedes cantator* / T.G. Andreadis // *J. Protozool.* – 1983.– V. 30, № 3. – P. 509-518.
26. Anonymus. Microsporidia: Pathogens of Opportunity / Weiss L., Becnel J. – Oxford: Wiley Blackwell, 2014. – 709 p.
27. Aoki, M.D. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein / M.D. Aoki, R.C. Cano, A.V. Pellegrini, T. Tanos, N. L. Guinazu, et al. // *Microbes and Infection.* – 2006. – V. 8, № 7. – P. 1723-1731.
28. The connection between transcription and genomic instability / A. Aguilera // *EMBO Journal.* – 2002. – V. 21, № 3. – P. 195-201.
29. Arhonditsis, G.B., Brett M.T. Eutrophication model for Lake Washington (USA): Part I. Model description and sensitivity analysis / G.B. Arhonditsis, M.T. Brett // *Ecological Modelling.* – 2005. – V. 187, № 2-3. – P. 140-178.
30. Arisue, N. Root of the eukaryota tree as inferred from combined maximum likelihood analyses of multiple molecular sequence data / N. Arisue, M. Hasegawa, T. Hashimoto // *Molecular Biology and Evolution.* – 2005. – V. 22, № 3. – P. 409-420.
31. Arisue, N. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians / N. Arisue, L.B. Saez, L. M Weiss., M. Muller, T. Hashimoto // *Parasitology International.* – 2002. – V. 51, № 1. – P. 9-16.

32. Baker, M.D. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microsporida) based on ribosomal RNA sequence data / M.D. Baker, C.R. Vossbrinck, J. V. Maddox, A. H. Undeen // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 1994. – V. 64, № 2. – P. 100-106.
33. Banks, W.A. Techniques for collecting, rearing, and handling imported fire ants / W.A. Banks, C.S. Lofgren, D.P. Jouvenaz, C.E. Stringer, P.M. Bishop, D.F. Williams, D.P. Wojcik, B.M. Glancey // *US Department of Agriculture, SEA, Advances in Agricultural Technology, AAT-S-21/ April 1981. – 1981. – V. A106.24. – P. 5-21.*
34. Bannykh, S.I., Balch W.E. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-golgi interface / S.I. Bannykh, W.E. Balch // *J. Cell Biology*. – 1997. – V. 138, № 1. – P. 1-4.
35. Bass, D. Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota / D. Bass, L. Czech, B.A.P. Williams, C. Berney, M. Dunthorn, F. Mahé, G. Torruella., G.D. Stentiford, T.A. Williams // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2018.– V. 65, №6. – P. 773-782.
36. Becker, B., Melkonian M. The secretory pathway of protists: Spatial and functional organization and evolution / B. Becker, M. Melkonian // *Microbiological Reviews*. – 1996. – Vol. 60, № 4. – P. 697-721.
37. Becnel, J.J., Andreadis T.G. Microsporidia in Insects / J.J. Becnel, T.G. Andreadis // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition, 2014. – P. 521-570.*
38. Becnel, J.J., Andreadis T. S. Microsporidia in insects / J.J. Becnel, T.G. Andreadis // *The Microsporidia and Microsporidiosis – Washington D.C.: ASM. – 1999. – P. 447-501.*
39. Becnel, J.J. Life cycle of *Culicospira magna* (Kudo, 1920) (Microsporida, Culicosporidae) in *Culex restuans* Theobald with special reference to sexuality / J.J. Becnel, E.I. Hazard, T. Fukuda., V. Sprague // *J. Protozool.* – 1987. – Vol. 34, № 3. – P. 313-322.
40. Becnel, J.J., Sprague V., Fukuda T., Hazard E. I. Development of *Edhazardia aedis* (Kudo, 1930) n.g., n.comb. (Microsporida, Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes aegypti* (L) (Diptera, Culicidae) / J.J. Becnel, V. Sprague, T. Fukuda, E. I. Hazard // *J. Protozool.* – 1989. – Vol. 36, № 2. – P. 119-130.
41. Bernander, R., Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle / R. Bernander, J.E. Palm, S.G. Svard // *Cellular Microbiology*. – 2001. – V. 3, № 1. – P. 55-62.
42. Bertilsson, J. Occurrence of limnic micro-crustaceans in relation to temperature and oxygen / J. Bertilsson., B. Berzinš, B. Pejler // *Hydrobiologia*. – 1995. – V. 299, № 2. – P. 163-167.

43. Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function / G.V. Beznoussenko, V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D. Di Giandomenico, P. Auinger, I.V. Senderskiy, S.O. Skarlato, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, Y.Y. Sokolova, and A.A. Mironov // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – P. 1288-1298.
44. Beznoussenko, G.V., Mironov A.A. Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex / G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov // *Anat Res.* – 2002. – V. 268, № 3. – P. 226-238.
45. Beznoussenko, G.V. Three-dimensional and immune electron microscopic analysis of the secretory pathway in *Saccharomyces cerevisiae* / G.V. Beznoussenko, A. Ragnini-Wilson, C. Wilson, A.A. Mironov // *Histochem. Cell Biol.* – 2016. – V. 146, № 5. – P. 515-527.
46. Biderre, C. Molecular karyotype diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / C. Biderre, A. Mathis, P. Deplazes, R. Weber, G. Metenier, C.P. Vivares // *Parasitology.* – 1999. – V. 118. – P. 439-445.
47. Biderre, C. A small spliceosomal-type intron occurs in a ribosomal protein gene of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / C. Biderre, G. Metenier, C.P. Vivares // *Molecular and Biochemical Parasitology.* – 1998. – V. 94, № 2. – P. 283-286.
48. Biderre, C. On small genomes in eukaryotic organisms: molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrates / C. Biderre, M. Pages, G. Metenier, D. David, J. Bata, G. Prensier, C.P. Vivares // *C R Acad Sci III.* – 1994. – V. 317, № 5. – P. 399-404.
49. Bigliardi, E. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore / E. Bigliardi, M.G. Selmi., P. Lupetti, S. Corona, S. Gatti, M. Scaglia, L. Sacchi // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 1996. – V. 43, № 3. – P. 181-186.
50. Billingsley, P.F., Lehane M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut / P.F. Billingsley, M.J. Lehane // *Biology of the Insect Midgut* . – 1996. – London: Chapman and Hall . – 120 p.
51. Biondi, R.M., Nebreda A.R. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions / R.M. Biondi, A.R. Nebreda // *Biochemical Journal.* – 2003. – V. 372. – P. 1-13.
52. Bohne, W. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface / W. Bohne, K. Bottcher, U. Gross // *Intern. J. Med. Microbiol.* – 2011. – V. 301, № 5. – P. 395-399.

53. Bohne, W. Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi* / W. Bohne, D.J.P. Ferguson, K. Kohler, U. Gross // *Infection and Immunity*. – 2000. – V. 68, № 4. – P. 2268-2275.
54. Bonfanti, L. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: Evidence for cisternal maturation / L. Bonfanti, A. Mironov Jr, J.A. Martínez-Menárguez, O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, H. Geuze, A. Mironov, A. Luini // *Cell*. – 1998. – V. 95, № 7. – P. 993-1003.
55. Bouzahzah, B. Interactions of *Encephalitozoon cuniculi* polar tube proteins / B. Bouzahzah, F. Nagajyothi, K. Ghosh, P. Takvorian, A.Cali, H. Tanowitz, L.M. Weiss // *Infection and Immunity*. – 2010. – V. 78, № 6. – P. 2745-2753.
56. Bratton S.B., Salvesen G.S. Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome / S.B. Bratton, G.S. Salvesen // *J.Cell Sci*. – 2010. – V. 123, № 19. – P. 3209-3214.
57. Brown, J. R., Doolittle W. F. Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-transfer-RNA synthetase gene duplications / J.R. Brown, W.F. Doolittle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – V. 92, № 7. – P. 2441-2445.
58. Brown, M.W. Phylogeny of the "forgotten" cellular slime mold, *Fonticula alba*, reveals a key evolutionary branch within Opisthokonta / M.W. Brown, F.W. Spiegel, J. D. Silberman // *Mol. Biol. Evol.* – 2009. – V. 26, № 12. – P. 2699-2709.
59. Bruchhaus, I. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. / I. Bruchhaus, T. Roeder, A. Rennenberg, V.T. Heussler // *Trends Parasitol.* – 2007. – V. 23, № 8. – P. 376-383.
60. Bruns, T. Evolutionary biology - A kingdom revised / T. Bruns // *Nature*. – 2006. – V. 443, № 7113. – P. 758-761.
61. Burri, L., Lithgow T. A complete set of SNAREs in yeast / L. Burri, T. Lithgow // *Traffic*. – 2004. – V. 5, № 1. – P. 45-52.
62. Burri, L. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system / L. Burri, B. Williams, D. Bursac, T. Lithgow, P. Keeling // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – V. 103, № 43. – P. 15916-20.
63. Cali, A., Takvorian P. Microsporidian developmental morphology and life cycles / A. Cali, P. Takvorian // *The Microsporidia and Microsporidiosis*. – 1999.– Washington, D. C.: ASM Press. – P. 85-128.
64. Cali, A. *Brachiola algerae* spore membrane systems, their activity during extrusion, and a new structural entity, the multilayered interlaced network, associated with the polar tube

- and the sporoplasm / A. Cali, L.M. Weiss, P.M. Takvorian // J. Eukaryot. Microbiol. – 2002. – V. 49, № 2. – P. 164-174.
65. Canning, E.U. A new microsporidian, *Nosema locustae* n. sp., from the fat body of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* R. & F. / E.U. Canning // Parasitology. – 1953. – V. 43. – P. 287-290.
  66. *Encephalitozoon lacerate* n.sp., a microsporidian parasite of the lizard *Podacris muralis* / E.U. Canning, // “Parasitological Topics”, Society of Protozoology Special Publications No 1, 1981. – P. 57-64.
  67. Canning, E.U. Nuclear division and chromospome cycle in microsporidia / E.U. Canning, // Biosystems. – 1988. – V. 21, № 3-4. – P. 333-340.
  68. Canning, E.U., Curry A. Further observations on the ultrastructure of *Cystosporogenes operophtherae* (Canning, 1960) (phylum Microsporidia) parasitic in *Operophtera brumata* L. (Lepidoptera, Geometridae) / E.U. Canning, A. Curry // Journal of Invertebrate Pathology. – 2004. – V. 87, № 1. – P. 1-7.
  69. Canning, E.U. *Nosema tyriae* n.sp. and *Nosema* sp., microsporidian parasites of Cinnabar Moth *Tyria jacobaeae* / E.U. Canning, A. Curry, S.A. Cheney, N.J. Lafranchi-Tristem, Y. Kawakami, Y. Hatakeyama, H. Iwano, R. Ishihara // J. Inverteb. Pathol. – 1999b. – V. 74, № 1. – P. 29-38.
  70. Canning, E.U. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) / E.U. Canning, A. Curry, S. Cheney, N.J. Lafranchi-Tristem, M.A. Haque // Parasitology. – 1999a. – V. 119, № 3. – P. 273-286.
  71. Canning, E.U. Ultrastructure of *Tuzetia weidneri* sp n. (Microsporidia : Tuzetiidae) in skeletal muscle of *Litopenaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus* (Crustacea : Decapoda) and new data on *Perezia nelsoni* (Microsporidia : Pereziidae) in *L-setiferus* / E.U. Canning, A. Curry, R.M. Overstreet // Acta Protozool. – 2002. – V. 41, № 1. – P. 63-77.
  72. Canning, E.U. *Plistophora myotrophica* spec. nov., causing high mortality in the common toad *Bufo bufo* L.m with notes on the maintenance of *Bufo* and *Xenopus* in the laboratory / E.U. Canning, E. Elkan, P.I. Trigg // J. Protozool. – 1964. – V. 11. – P. 157-166.
  73. Canning, E.U., Vavra J.. Microsporidia / E.U. Canning, J. Vavra // The illustrated guide to the Protozoa. – 2000. –Lawrence Kansas: Society of Protozoologists. – P. 39-126.
  74. Cao, Z.J. Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection / Z.J. Cao, J.

- Wanagat, S. H. McKiernan, J.M. Aiken // *Nucleic Acids Research*. – 2001. – V. 29, № 21. – P. 4502-4508.
75. Capella-Gutierrez, S. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi / S. Capella-Gutierrez, M. Marcet-Houben, T. Gabaldon // *Bmc Biology*. – 2012. – V. 10. – doi: 10.1186/1741-7007-10-47
  76. Casal, G. A new microsporidian parasite, *Potasporea morhaphis* n. gen., n. sp (Microsporidia) infecting the Teleostean fish, *Potamorhaphis guianensis* from the River Amazon. Morphological, ultrastructural and molecular characterization / G. Casal, E. Matos, M.L. Teles-Grilo, C. Azevedo // *Parasitology*. – 2008. – V. 135, № 9. – P. 1053-1064.
  77. Caullery, M., Mesnil F. Metchnikovellidae et autre Protistes des Grégariens d'Annélides / M. Caullery, F. Mesnil // *Annales de l'Institut Pasteur*. – 1919. – V. 33. – P. 209-240.
  78. Caullery, M., Mesnil F. Sur les Metchnikovellidae et autre Protistes des Grégariens d'Annélides / M. Caullery, F. Mesnil // *C. R. Soc. Biol.* – 1914. – V. 77. – P. 527-532.
  79. Cavalier-Smith, T. A 6-kingdom classification and a united phylogeny / T. Cavalier-Smith // *Endocytobiology II*. – 1983. – Berlin: de Gruyter. – P. 265-279.
  80. Cavalier-Smith, T. Cell evolution / T. Cavalier-Smith // *Evolution of life*. – 1991. – Tokyo: Springer-Verlag. – P. 271-304.
  81. Cavalier-Smith, T. Economy, speed and size matter: Evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion / T. Cavalier-Smith // *Annals of Botany*. – 2005. – V. 95, № 1. – P. 147-175.
  82. Cavalier-Smith, T. Kingdom Protozoa and its 18 phyla / T. Cavalier-Smith // *Microbiol Rev*. – 1993. – V. 57, № 4. – P. 953-994.
  83. Cavalier-Smith, T. What are fungi? / T. Cavalier-Smith // *The Mycota* . , 2001. – New York: Springer. – P. 3-37.
  84. Channon, J.Y. *Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis / J.Y. Channon, K.A. Miselis, L.A. Minns, H. Dutta, C. L Kasper // *Infection and Immunity*. – 2002. – V. 70, № 11. – P. 6048-6057.
  85. Chapman, P.F. The alpha-CA2+/calmodulin kinase II - a bidirectional modulator of presynaptic plasticity / P. F Chapman, B.G. Frenguelli, A. Smith, C.M. Chen, A.J. Silva // *Neuron*. – 1995. – V. 14, № 3. – P. 591-597.
  86. Chen, W.J., Barr A.R. Chromosomal evidence on the sporogony of *Amblyospora californica* (Microspora, Amblyosporidae) in *Culex tarsalis* (Diptera, Culicidae) / W.J. Chen, A.R. Barr // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 1995. – V. 42, № 2. – P. 103-108.

87. Chen, J.S.C. Sources of spores for the possible horizontal transmission of *Thelohania solenopsae* (Microspora: Thelohaniidae) in the red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / J.S.C. Chen, K. Snowden, F. Mitchell, J. Sokolova, J. Fuxa, B. S. Vinson // J. Invertebr. Pathol. – 2004. – V. 85, № 3. – P. 139-145.
88. Cheney, S.A. Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1) / S.A. Cheney, N.J. Lafranchi-Tristem, D. Bourges, E.U. Canning // J. Eukaryot. Microbiol.. – 2001. – V. 48, № 1. – P. 111-117.
89. Cheney, S.A. Phylogenetic relationships of Pleistophora-like microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachipleistophora hominis* infections / S.A. Cheney, N.J. Lafranchi-Tristem, E.U. Canning // J. Eukaryot. Microbiol. – 2000. – V. 47, № 3. – P. 280-287.
90. Chuenkova, M.V., Pereira M.A. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells / M.V Chuenkova, M.A. Pereira // Molecular Biology of the Cell. – 2000. – V. 11, № 4. – P. 1487-1498.
91. Clotilde-Ba, F.L., Toguebaye B.S. Ultrastructure and development of *Agmasoma penaei* (Microspora, Thelohaniidae) found in *Penaeus notialis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) from Senegal / F.L. Clotilde-Ba, B.S. Toguebaye // Europ. Journal. Protistol. – 1994. – V. 30, № 3. – P. 347-353.
92. Cooke, B.M.. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells / B.M. Cooke, K. Lingelbach, L.H. Bannister, L. Tilley // Trends in Parasitology. – 2004. – V. 20, № 12. – P. 581-589.
93. Cooks, T. Caught in the cross fire: p53 in inflammation / T. Cooks, C.C. Harris, M. Oren // Carcinogenesis. – 2014. – V. 35, № 8. – P. 1680-1690.
94. Corliss, J.O. An interim utilitarian (user-friendly) hierarchical classification and characterization of the Protists / J.O. Corliss// Acta Protozool. – 1994. – V. 33, № 1. – P. 1-51.
95. Cornman, R.S. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees / R.S Cornman., Y.P. M.C. Chen, C. Schatz, Street, Y. Zhao, B. Desany, M. Egholm, S. Hutchison, J.S. Pettis, W.I. Lipkin, J.D. Evans // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5, № 6. – doi: 10.1371/journal.ppat.1000466.
96. Corradi, N. Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonospora locustae* and *Enterocytozoon bieneusi* / N.

- Corradi, D.E. Akiyoshi, H.G. Morrison, X. Feng, L.M. Weiss, S. Tzipori, P.J. Keeling // PLoS ONE. – 2007. – V. 2, № 12. – doi: 10.1371/journal.pone.0001277.
97. Corradi, N. Draft genome sequence of the *Daphnia* pathogen *Octospora bayeri*: Insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions / N. Corradi, K.L. Haag, J.F. Pombert., D. Ebert, P.J. Keeling // Genome Biology. – 2009. – V. 10, № 10. – doi: 10.1186/gb-2009-10-10-r106.
  98. Corradi, N. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* / N. Corradi, J. Pombert, L. Farinelli, E. Didier, P. Keeling // Nat Commun. – 2010. – V. 1. – P. 77-78.
  99. Corsaro, D. Molecular identification of *Nucleophaga terricolae* sp nov (Rozellomycota), and new insights on the origin of the Microsporidia / D. Corsaro, R. Michel, J. Walochnik, D. Venditti, K.D. Muller, B. Hauröder, C. Wylezich // Parasitol. Res. – 2016. – V. 115, № 8. – P. 3003-3011.
  100. Corsaro, D. Rediscovery of *Nucleophaga amoebae*, a novel member of the Rozellomycota / D. Corsaro, J. Walochnik, D. Venditti, K.D. Muller, B. Hauröder, R. Michel // Parasitol. Res. – 2014a. – V. 113, № 12. – P. 4491-4498.
  101. Corsaro, D. Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota / D. Corsaro, J. Walochnik, D. Venditti, J. Steinmann, K.D. Muller, R. Michel // Parasitol. Res.. – 2014b. – V. 113, № 5. – P. 1909-1918.
  102. Corsaro, D. Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia: Chytridiopsida) / C. Wylezich, D. Venditti, R. Michel, J. Walochnik, R. Wegensteiner// Parasitol. Res. – 2019. – V. 118, № 1. – P. 169-180.
  103. Crossland, N.A. Pneumonia in a captive central bearded dragon with concurrent detection of Helodermatid Adenovirus 2 and a novel *Mycoplasma* species /N.A.Crossland, P.M. DiGeronimo, Y. Sokolova, A.L. Childress, J.F. Wellehan, J. Nevarez, D.Paulsen // Vet. Pathol. – 2018. –V. 55, №6. – P. 900-904.
  104. Cuomo, C.A. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth / C.A. Cuomo, C.A. Desjardins, M.A. Bakowski, J. Goldberg, A.T. Ma, J.J. Becnel, E.S. Didier, L. Fan, D.I. Heiman, J.Z. Levin, S. Young, Q. Zeng, E.R.Troemel // Genome Research. – 2012. – V. 22, № 12. – P. 2478-2488.
  105. Dacks, J.B. Evidence for Golgi bodies in proposed 'Golgi-lacking' lineages/ J.B. Dacks, L.A. Davis, A.M. Sjogren, J.O. Andersson, A.J. Roger, W.F. Doolittle // Proc. Royal Soc. London Series B-Biological Sciences. – 2003. – V. 270. – P. S168-S171.

106. Dacks, J.B., Doolittle W.F. Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: How comparative genomics can help / J.B. Dacks, W.F. Doolittle // *Cell*. – 2001. – V. 107, № 4. – P. 419-425.
107. Dacks, J.B., Field M.C. Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode / J.B. Dacks, M.C. Field // *J. Cell. Sci.* – 2007. – V. 120, № 17. – P. 2977-85.
108. Dahl, R., Staehelin L.A. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice / R. Dahl, L.A. Staehelin // *J Electron Microscop Tech.* . – 1989. – V. 13, № 3. – P. 165-174.
109. de Hoon, M.J.L. Open source clustering software / M.J.L. de Hoon, S. Imoto, J. Nolan, S. Miyano // *Bioinformatics*. – 2004. – V. 20, № 9. – P. 1453-1454.
110. de Jong, J.C. Glycerol generates turgor in rice blast / J.C. de Jong, B.J. McCormack, N. Smirnoff, N.J. Talbot // *Nature*. – 1997. – V. 389, № 6648. – P. 244-245.
111. del Aguila, C. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells / C. del Aguila, F. Izquierdo, A.G. Granja, C. Hurtado, S. Fenoy, M. Fresno, Y. Revilla // *Intern. J. Parasitol.* – 2006. – V. 36, № 8. – P. 869-876.
112. Delbac, F., First complete amino acid sequence of a polar tube protein in a microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* / F. Delbac, D. David, G. Metenier, C. Vivares // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 1997. – V. 44, № 6. – P. 77S.
113. Delbac, F. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus / F. Delbac, F. Duffieux, D. David, G. Metenier, C.P. Vivares // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 1998a. – V. 45, № 2. – P. 224-231.
114. Delbac, F. Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three *Encephalitozoon species* / F. Delbac, I. Peuvel, G. Metenier, E. Peyretailade, C.P. Vivares // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69, № 2. – P. 1016-24.
115. Delbac, F. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi* / F. Delbac, P. Peyret, G. Metenier, D. David, A. Danchin, C.P. Vivares // *Mol. Microbiol.* – 1998b. – V. 29, № 3. – P. 825-34.
116. Dellibovi-Ragheb, T.A. Parasites FeS Up: Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in Eukaryotic Pathogens / T.A. Dellibovi-Ragheb, J.E. Gisselberg, S.T. Prigge // *PLoS Pathogens*. – 2013. – V. 9, № 4. – doi: 10.1371/journal.ppat.1003227.
117. Desjardins, C.A. Contrasting host-pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes / C.A. Desjardins, N.D.

- Sanscrainte, J.M. Goldberg, D. Heiman, S. Young, Q. Zeng, H.D. Madhani, J.J. Becnel, C.A. Cuomo // *Nature Communications*. – 2015. – V. 6. – doi: 10.1038/ncomms8121.
118. Desportes, I. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS / I. Desportes, Y. Le Charpentier, A. Galian, F. Bernard, B. Cochand-Priollet, A. Lavergne, P. Ravisse, R. Modigliani // *J. Protozool.* – 1985. – V. 32, № 2. – P. 250-254.
119. Desportes, I., Théodoridès, J. Étude ultrastructurale d'*Amphiamblus laubieri* n.sp. (Microsporidie, Metchnikovellidae) parasite d'un Grégarine (*Lecudina* sp.) d'un Echiurien abyssal / I. Desportes, J. Théodoridès // *Protistologica*. – 1979. – V. 15. – P. 435-457.
120. Dessauge, F.. Taking the Myc is bad for Theileria / F. Dessauge, R. Lizundia, M. Baumgartner, M. Chaussepied, G. Langsley // *Trends in Parasitology*. – 2005. – V. 21, № 8. – P. 377-385.
121. Didier, E.S., Khan I.A. The immunology of microsporidiosis in mammals / E.S. Didier, I.A. Khan // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. – 2014. – Oxford: Wiley Blackwell,. – P. 307-327.
122. Didier, E.S. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains / E.S. Didier, C.R. Vossbrinck, M.D. Baker, L.B. Rogers, D.C. Bertucci, J.A. Shaddock // *Parasitology*. – 1995. – V. 111, № 4. – P. 411-421.
123. Didier. E.S., Weiss L.M. Microsporidiosis: Current status / E.S. Didier, L.M. Weiss // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2006. – V. 19, № 5. – P. 485-492.
124. Ding, Z.F. A new microsporidium, *Potaspora macrobrachium* n.sp infecting the musculature of pond-reared oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Decapoda: Palaemonidae) / Z.F. Ding, M.L. Sun, H.Y. Liu, Y.H. Zhao, J.L. Pan, H. Xue // *J. Invertebr.Pathol.* – 2016. – V. 136. – P. 57-64.
125. Dolgikh, V.V. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonosporea) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells / V.V.Dolgikh, E.V. Seliverstova, A.M. Naumov, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, G.V. Beznoussenko // *FEMS Microbiology Letters*. – 2009. – V. 293, № 2. – P. 285-291.
126. Dolgikh, V.V. Peculiarities of glycosylation of proteins in spores of microsporidia *Paranosema (Antonosporea) grylli* / V.V. Dolgikh, P.B.Semenov, G.V. Beznusenko // *Cell and Tissue Biology*. – 2007. – V. 1, № 5. – P. 427-433.
127. Dolgikh. V.V. Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli* / V.V. Dolgikh., P.B.

- Semenov, A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli* // Protist. – 2005. – V. 156, № 1. – P. 77-87.
128. Dolgikh V. V., Semenov P. B., Mironov A. A., Beznoussenko G. V. Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli* // Protist. – 2005. – V. 156, № 1. – P. 77-87.
129. Dolgikh, V. V. Expression of vesicular transport genes in aviscular cells of microsporidia *Paranosema (Antonospora) locustae* / V.V. Dolgikh, I.V. Senderski, O.A. Pavlova, G.V. Beznoussenko // Cell and Tissue Biology. – 2010. – V. 4, № 2. – P. 136-142.
130. Dolgikh, V.V. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora (Paranosema) locustae* spores: Mitosomes retain their role in microsporidial energy metabolism / V.V. Dolgikh, I.V. Senderskiy, O.A. Pavlova, A.M. Naumov, G.V. Beznoussenko // Eukaryot. Cell. – 2011. – V. 10, № 4. – P. 588-593.
131. Dolgikh, V.V. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian, *Nosema grylli* / V.V. Dolgikh, J. J.Sokolova, I. V. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 1997. – V. 44, № 3. – P. 246-249.
132. Donoghue P.C.J., Benton M.J. Rocks and clocks: calibrating the Tree of Life using fossils and molecules / P.C.J. Donoghue, M.J. Benton // Trends in Ecology and Evolution. – 2007. – V. 22, № 8. – P. 424-431.
133. Duscher, G. Parasites on paper: the use of FTA Elute® for the detection of *Dirofilaria repens* microfilariae in canine blood / G. Duscher, R. Peschke, W. Wille-Piazzai, A. Joachim // Vet. Parasitol. – 2009. – V. 161, № 3-4. – P. 349-351.
134. Dykova, I. *Nuclearia pattersoni* sp n. (Filosea), a new species of amphizoic amoeba isolated from gills of roach (*Rutilus rutilus*), and its rickettsial endosymbiont / I. Dykova, M. Veverkova, I. Fiala, B. Machackova, H. Peckova / Folia Parasitol. – 2003. – V. 50, № 3. – P. 161-170.
135. Edlind, T.D. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa / T.D. Edlind, Li J., G.S. Visvesvara, M.H. Vodkin, G.L. McLaughlin, S.K. Katiyar // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 1996. – V. 5, № 2. – P. 359-367.
136. Edman, J.C. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carini* to be a member of the Fungi I / J.C. Edman, J.A. Kovacs, H. Masur, D.V. Santi, H.J. Elwood, M.L. Sogin // Nature. – 1988. – V. 334, № 6182. – P. 519-522.

137. Eisen, M.B. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns / M.B. Eisen, P.T. Spellman, P.O. Brown, D. Botstein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V. 95, № 25. – P. 14863-14868.
138. Eltoun, I.A. Microdissection of histologic sections: Past, present, and future / I.A. Eltoun, G.P. Siegal, A.R. Frost // Advances in Anatomic Pathology. – 2002. – V. 9, № 5. – P. 316-322.
139. Eugster, A., The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. / A. Eugster, G. Frigerio, M. Dale, R. Duden // Mol. Biol. Cell – 2004. – V. 15. – P. 1011-1123.
140. Faherty C.S., Maurelli A. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection / C.S. Faherty, A. Maurelli // Trends in Microbiol. – 2008. – V. 16, № 4. – P. 173-180.
141. Farquhar, M.G., Palade G. E. The Golgi apparatus (complex) (1954-1981) from artifact to center stage / M.G. Farquhar, G.E. Palade // J. Cell. Biol. – 1981. – V. 91, № 3. – P. 77s-103s.
142. Fast, N.M., Doolittle W.F. *Trichomonas vaginalis* possesses a gene encoding the essential spliceosomal component, PRP8 / N.M. Fast, W.F. Doolittle // Mol. Biochem. Parasitol. – 1999. – V. 99, № 2. – P. 275-278.
143. Fast, N.M. Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution / N.M. Fast, J.S. Law, B.A. Williams, P.J. Keeling // Eukaryot. Cell. – 2003. – V. 2, № 5. – P. 1069-75.
144. Fast, N.M. U2 and U6 snRNA genes in the microsporidian *Nosema locustae*: evidence for a functional spliceosome / Fast N.M., J.S. Law, B.A. Williams, P.J. Keeling // Nucl. Acids Res. – 1998. – V. 26, № 13. – P. 3202-3207.
145. Faulstich, D. Architecture of coatomer: Molecular characterization of delta-COP and protein interactions within the complex / D. Faulstich, S. Auerbach, L. Orci, M. Ravazzola, S. Wegehingel, F. Lottspeich, G. Stenbeck, C. Harter, F.T. Wieland, H. Tschochner // J. Cell Biol. – 1996. – V. 135, № 1. – P. 53-61.
146. Fedorov, A. What does the microsporidian *E. cuniculi* tell us about the origin of the eukaryotic cell? / A. Fedorov, H. Hartman // J. Mol. Evol. – 2004. – V. 59, № 5. – P. 695-702.
147. Felsenstein, J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading / J. Felsenstein // Systematic Zoology. – 1978. – V. 27, № 4. – P. 401-410.
148. Fend, F. Laser capture microdissection: methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection / F. Fend, M. Kremer, L. Quintanilla-Martinez // Pathobiology. – 2000. – V. 68, № 4-5. – P. 209-214.

149. Findley, A.M. Role of the posterior vacuole in *Spraguea lophii* (Microsporidia) spore hatching / A.M. Findley, E.H. Weidner, K.R. Carman, Z.M. Xu, J.S. Godbar // *Folia Parasitol.* – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 111-117.
150. Fischer, A.H. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections / A.H. Fischer, K.A. Jacobson, J. Rose, R. Zeller // *Cold Spring Harb Protocols* –2008. – doi: 10.1101/protocol 4986.
151. Fischer, W.M., Palmer J.D. Evidence from small-subunit ribosomal RNA sequences for a fungal origin of Microsporidia / W.M. Fischer, J.D. Palmer // *Mol. Phylog.Evol.* – 2005. – V. 36, № 3. – P. 606-622.
152. Flegel, T.W., Pasharawipas T. A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians / T.W. Flegel, T. Pasharawipas // *Canadian J. Microbiol.* – 1995. – V. 41, № 1. – P. 1-11.
153. Franzen, C. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data / C. Franzen, E.S. Nasonova, J. Schölmerich, I.V. Issi // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2006. – V. 53, № 1. – P. 26-35.
154. Freeman, M.A., Sommerville C. Original observations of *Desmozoon lepeophtherii*, a microsporidian hyperparasite infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*, and its subsequent detection by other researchers / M.A. Freeman, C. Sommerville // *Parasites and Vectors.* – 2011. – V. 4. – doi: 10.1186/1756-3305-4-231.
155. Fridman, J.S., Lowe S.W. Control of apoptosis by p53 / J.S. Fridman, S.W. Lowe // *Oncogene.* – 2003. – V. 22, № 56. – P. 9030-9040.
156. Fries, I. Microsporidia, honeybees, and Colony Collapse Disorder / Fries, I // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity.* – 2014. – Oxford: Wiley Blackwell. – P. 571-579.
157. Fries, I. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia : Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea) / I. Fries, A. de Ruijter, R.J. Paxton, A.J. da Silva, S.B. Slemenda, N.J. Pieniasek // *J. Apicult. Res.* – 2001. – V. 40, № 3-4. – P. 91-96.
158. Frixione, E. Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D2O, ethanol and Hg2+ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways / E. Frixione, L. Ruiz, J. Cerbon, A.H. Undeen // *J Eukaryot Microbiol.* – 1997. – V. 44, № 2. – P. 109-16.
159. Frixione, E. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores / E. Frixione, L. Ruiz, M. Santillan, L.V. de Vargas, J.M. Tejero, Undeen A. H. // *Cell Motil. Cytoskelet.* – 1992. – V. 22. – P. 38-50.

160. Fuxa, J.R. Interaction of an entomopathogen with an insect social form: an epizootic of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) in a population of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* / J.R. Fuxa, M.L. Milks, Y.Y. Sokolova, A.R. Richter // J. Invertebr. Pathol. – 2005a. – T. 88, № 1. – P. 79-82.
161. Fuxa, J.R. Prevalence, spread, and effects of the microsporidium *Thelohania solenopsae* released into populations with different social forms of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) / J.R. Fuxa, Y.Y. Sokolova, M.L. Milks, A.R. Richter, D.F. Williams, D.H. Oi // Environ. Entomol. – 2005. – V. 34, № 5. – P. 1139-1149.
162. Galindo L.J. Evolutionary genomics of *Metchnikovella incurvate* (Metchnikovellidae): an early branching microsporidium / G. Torruella, D. Moreira, H. Timpano, G. Paskerova, A. Smirnov, E. Nassonova, P. López-García // Genome Biol Evol. – 2018. – V.10, № 10. – P. 2736-2748.
163. Germot, A. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae* / A. Germot, H. Philippe, H. LeGuyader // Mol. Biochem.Parasitol. – 1997. – V. 87, № 2. – P. 159-168.
164. Ghosh, K. Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans / K. Ghosh, C.D. Cappiello, S.M. McBride, J.L. Occi, A. Cali, P.M. Takvorian, V.V. McDonald, L.M. Weiss // Intern. J. Parasitol. – 2006. – V. 36, № 1. – P. 57-62.
165. Ghosh, S. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane / S. Ghosh, J. Field, R. Rogers, M. Hickman, J. Samuelson // Infection and Immunity. – 2000. – V. 68, № 7. – P. 4319-4322.
166. Glancey, B.M. Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren / B.M. Glancey, R.K. Vandermeer, A. Glover, C.S. Lofgren, S.B. Vinson // Insectes Sociaux. – 1981. – V. 28, № 4. – P. 395-401.
167. Glick, B.S., Malhotra V. The curious status of the Golgi apparatus / B.S. Glick, Malhotra V. // Cell. – 1998. – V. 95, № 7. – P. 883-889.
168. Goebel, S. Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression / S. Goebel, U. Gross, C.G.K. Luder // J. Cell Sci. – 2001. – V. 114, № 19. – P. 3495-3505.
169. Goldberg, A.V. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins / A.V. Goldberg, S. Molik, A.D. Tsaousis, K. Neumann, G. Kuhnke,

- F. Delbac, C.P. Vivares, R.P. Hirt, R. Lill, T.M. Embley // Nature. – 2008. – V. 452, № 7187. – P. 624-628.
170. Grant, K., Jerome W.G. Laser capture microdissection as an aid to ultrastructural analysis / Grant K., Jerome W.G. // Microscopy and Microanalysis. – 2002. – T. 8, № 3. – P. 170-175.
171. Grasse, P.P. Ultrastructure, polarite et reproduction de l'appareil de Golgi / P.P. Grasse // C. R. Acad. Sci. – 1957. – V. 245, № 16. – P. 1278-1281.
172. Graumann, K. Mammalian apoptotic signalling pathways: multiple targets of protozoan parasites to activate or deactivate host cell death / K. Graumann, D. Hippe, U. Gross, C.G.K. Luder // Microbes and Infection. – 2009. – V. 11, № 13. – P. 1079-87.
173. Gromov, B.V., Mamkaeva K.A. *Amoebophilidium protococcarum* sp. nov. and *Amoebophilidium chlorellavorum* sp. nov. — endoparasites of protococous algae / B.V. Gromov., K.A. Mamkaeva // Acta Protozool. – 1968. – V. 6. – P. 220-224.
174. Guan, R. Phylogenetic characterization of a microsporidium (*Nosema* sp.) isolated from the mulberry pest, *Hemerophila atrilineata* / R. Guan, Z. Shen, F. Zhu, D. Chen, J. Zhang, J. Hou, S. Dong, X. Tang, L. Xu // Folia Parasitol. – 2012. – V. 59, № 2. – P. 87-92.
175. Guindon, S. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 / S. Guindon, J. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel // Syst Biol. – 2010. – V. 59. – P. 307 - 321.
176. Guo, Q. Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP / Q. Guo, E. Vasile, M. Krieger // J. Cell Biol. – 1994. – V. 125. – P. 1213-1224.
177. Haag, K.L. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites/ K.L. Haag, T.Y. James, J.F. Pombert, R. Larsson, T. Schaer, D. Refardt, D. Ebert // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – V. 111, № 43. – P. 15480-15485.
178. Hager, K.M. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* / K.M. Hager, B. Striepen, L.G. Tilney, D.S. Roos // J. Cell Sci. – 1999. – V. 112, № 16. – P. 2631-2638.
179. Hausmann, S. Characterization of the mRNA capping apparatus of the microsporidian parasite *Encephalitozoon cuniculi* / S. Hausmann, C.P. Vivares, S. Shuman // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277, № 1. – P. 96-103.
180. Hay, S. A time to kill: viral manipulation of the cell death program / S. Hay, G. Kannourakis // J. General Virol. – 2002. – V. 83. – P. 1547-1564.

181. Hayman, J.R. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* / J.R. Hayman, S.F. Hayes, J. Amon, T.E. Nash // *Infection and Immunity*. – 2001. – V. 69, № 11. – P. 7057-7066.
182. Hayman, J.R. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro / J.R. Hayman, T.R. Southern, T.E. Nash // *Infection and Immunity*. – 2005. – V. 73, № 2. – P. 841-848.
183. Hazard, E.I. Meiosis and its implications in the life cycles of *Amblyospora* and *Parathelohania* (Microspora) / E.I. Hazard, T.G. Andreadis, D.J. Joslyn, E.A. Ellis // *J. Parasitol.* – 1979. – V. 65, № 1. – P. 117-122.
184. Hazard, E.I. Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora / E. I. Hazard, T. Fukuda, J.J. Becnel // *J. Inverteb. Pathol.* – 1985. – V. 46, № 1. – P. 63-69.
185. Hazard, E. I., Oldacre S.W. Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*: with description of one new family, eight new genera, and thirteen new species. / E.I. Hazard, S.W. Oldacre // U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin No 1530, 1-104 –1976.
186. He, H. Improved technique that allows the performance of large-scale SNP genotyping on DNA immobilized by FTA® technology / H. He, L. Argiro, H. Dessenin, P. Chevillard // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2007. – V. 7, № 1. – P. 128-132.
187. He, X.. *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in BmN cells (*Bombyx mori*) / X. He, Z. Fu, M. Li, H. Liu, S. Cai, N. Man, X. Lu // *Acta Bioch. Biophys. Sinica*. – 2015. – V. 47, № 9. – P. 696-702.
188. Hehl, A.B., Marti M. Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis* / A.B. Hehl, M. Marti // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 53, № 1. – P. 19-28.
189. Hehlgans, T., Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games / T. Hehlgans, K. Pfeffer // *Immunology*. – 2005. – V. 115, № 1. – P. 1-20.
190. Heinz, E., Lithgow T. Back to basics: revealing secondary reduction of the mitochondrial protein import pathway in diverse intracellular parasites / E. Heinz, T. Lithgow // *Biochimica et Biophysica Acta – Mol. Cell Res.* – 2013. – V. 1833, № 2. – P. 295-303.
191. Heinz, E. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution / E. Heinz, B.A. Williams, S. Nakjang, C.J. Noël, D.C. Swan, A.V. Goldberg, S.R. Harris, T. Weinmaier, S. Markert, D. Becher, J. Bernhardt, T. Dagan, C. Hacker, J.M. Lucocq, T. Schweder, T. Rattei, N. Hall, R.P. Hirt, T.M. Embley // *PLoS Pathogens*. – 2012. – V. 8, № 10. – doi: 10.1371/journal.ppat.1002979.

192. Held, A.A. The zoospore of *Rozella allomycis*: ultrastructure / Held A.A. // Can. J.Bot. – 1975. – V. 53. – P. 2212-2232.
193. Henry, J.E. Control of insects by Protozoa / J.E. Henry // New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. – 1990. – NY: Alan Liss. – P. 161–176.
194. Henry, J.E. The path to registration of a microbial pesticide / J.E. Henry // Protistology. – 2017. – V. 11, № 3. – P. 175-182.
195. Hentze, M.W. Protein synthesis - believe it or not - translation in the nucleus / M.W. Hentze // Science. – 2001. – V. 293, № 5532. – P. 1058-1059.
196. Hibbett, D.S., A higher-level phylogenetic classification of the Fungi / D.S. Hibbett, M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon et al. // Mycological Research. – 2007. – V. 111. – P. 509-547.
197. Hicks, R.M. The function of the golgi complex in transitional epithelium. Synthesis of the thick cell membrane / R.M. Hicks, // J. C. Biology. – 1966. – V. 30, № 3. – P. 623-643.
198. Higes, M. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*) / M. Higes, A. Juarranz, J. Dias-Almeida, S. Lucena, C. Botias, A. Meana, P. Garcia-Palencia, R. Martin-Hernandez // Environ. Microbiol. Reports. – 2013. – V. 5, № 4. – P. 530-536.
199. Hirt, R.P. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: Molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria / R.P. Hirt, B. Healy, C.R.Vossbrinck, E.U. Canning, T.M.Embley // Current Biology. – 1997. – V. 7, № 12. – P. 995-998.
200. Hirt, R.P. Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins / R.P. Hirt, J.M. Logsdon, B. Healy, M.W. Dorey, W.F. Doolittle, T.M. Embley // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96, № 2. – P. 580-585.
201. Hölldobler, B., Wilson E. O The Ants. / B. Hölldobler, E.O. Wilson // Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 1990. – 732 p.
202. Hopper, J.V. Pathogenicity, morphology, and characterization of a *Nosema fumiferanae* isolate (Microsporidia: Nosematidae) from the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) in California / J.V. Hopper, W.F. Huang, L.F. Solter, N.J. Mills // J. Invertebr. Pathol. – 2016. – V. 134. – P. 38-47.

203. Horstmann, H. Ultrastructural characterization of endoplasmic reticulum - Golgi transport containers (EGTC) / H. Horstmann, C.P. Ng, B.L. Tang, W. Hong // J. Cell Sci. – 2002. – V. 115, № 22. – P. 4263-4273.
204. Huang, Q. Host-parasite interactions and purifying selection in a microsporidian parasite of honey bees / Q. Huang, Y.P. Chen, R.W. Wang, S. Cheng, J.D. Evans // PLoS ONE. – 2016. – V. 11, № 2. – doi: 10.1371/journal.pone.0147549.
205. Iborra, F.J. Molecular cross-talk between the transcription, translation, and nonsense-mediated decay machineries / Iborra F. J., Escargueil A. E., Kwek K. Y., Akoulitchev A., Cook P. R // J. Cell Sci. – 2004a. – V. 117, № 6. – P. 899-906.
206. Iborra, F.J. The case for nuclear translation / F.J. Iborra, D.A. Jackson, P.R. Cook. // J. Cell Sci. – 2004b. – V. 117, № 24. – P. 5713-5720.
207. Ingold, C.T. Mechanisms of liberation of spores and pollen / C.T. Ingold // Hautarzt. – 1972. – V. 23, № 1. – P. 40-47.
208. Ironside J.E. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia / J.E. Ironside // BMC Evol. Biol. – 2007. – V. 7, №48. – doi:10.1186/1471-2148-7-48.
209. Iwano, H., Ishihara R. Dimorphic development of *Nosema bombycis* spores in gut epithelium of larvae of the silkworm, *Bombyx mori* / H. Iwano, R. Ishihara // J. Sericult. Sci. Japan. – 1991. – V. 60, № 4. – P. 249-266
210. Iwano, H., Kurtti T. J. Identification and isolation of dimorphic spores from *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae)/ H. Iwano, T.J. Kurtti // J. Invertebr. Pathol. – 1995. – V. 65, № 3. – P. 230-236.
211. Jackson, C.L. Mechanisms of transport through the Golgi complex / C.L. Jackson // J. Cell Sci. – 2009. – V. 122, № 4. – P. 443-452.
212. Jacobson, E.R. Systemic microsporidiosis in inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) / E.R. Jacobson, D.E. Green, A.H. Undeen, M. Cranfield, K.L. Vaughn // Journal of Zoo and Wildlife Medicine. – 1998. – V. 29, № 3. – P. 315-323.
213. James, E.R., Green D. R. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction / E.R. James, D.R. Green // Trends in Parasitology. – 2004. – V. 20, № 6. – P. 280-287.
214. James, T.Y. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny / T.Y. James, F. Kauff, C.L.Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter et al. // Nature. – 2006. – V. 443, № 7113. – P. 818-822.
215. James, T.Y. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and Microsporidia / T.Y. James, A. Pelin, L. Bonen, S. Ahrendt, D. Sain, N. Corradi, J. Stajich // Current Biology. – 2013. – V. 23, № 16. – P. 1548-1553.

216. Jaravata, C.V. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine manure using Whatman FTA card technology and lightcycler real-time PCR / C.V. Jaravata, W.L. Smith, G.J. Rensen, J.M. Ruzante, J.S. Cullor // *Foodborne Pathogens and Disease*. – 2006. – V. 3, № 2. – P. 212-215.
217. Jezernik, K., Pipan N. The relationship between synthesis of secretory products and reducing capacity in pancreas and parotid acinar cells / K. Jezernik, N. Pipan // *Histochemical Journal*. – 1991. – V. 23, № 4. – P. 155-159.
218. Joiner, K.A., Roos D.S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more / K.A. Joiner, D.S. Roos // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 157, № 4. – P. 557-563.
219. Jones, M.D.M. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life / M.D.M. Jones, I. Forn, C. Gadelha, M.J. Egan, D. Bass, R. Massana, T.A. Richards // *Nature*. – 2011. – V. 474, № 7350. – P. 200-234.
220. Jouvenaz, D.P. Transmission and infectivity of spores of *Burenella dimorpha* (Microsporida, Burenellidae) / D.P. Jouvenaz, C.S. Lofgren, G.E. Allen // *J. Invertebr. Pathol.* – 1981. – V. 37, № 3. – P. 265-268.
221. Kamaishi, T. Complete nucleotide sequences of the genes encoding translation elongation factors 1 alpha and 2 from a microsporidian parasite, *Glugea plecoglossi*: Implications for the deepest branching of eukaryotes / T. Kamaishi, T. Hashimoto, Y. Nakamura, Y. Masuda, F. Nakamura, K. Okamoto, M. Shimizu, M. Hasegawa // *J. Biochem.* – 1996a. – V. 120, № 6. – P. 1095-1103.
222. Kamaishi, T. Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 alpha suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes / T. Kamaishi, T. Hashimoto, Y. Nakamura, F. Nakamura, S. Murata, N. Okada, K. Okamoto, M. Shimizu, M. Hasegawa // *J. Mol. Evol.* – 1996b. – V. 42, № 2. – P. 257-263.
223. Karpov, S.A. Obligately phagotrophic aphelids turned out to branch with the earliest-diverging fungi / S.A. Karpov, K.V. Mikhailov, G.S. Mirzaeva, I.M. Mirabdullaev, K.A. Mamkaeva, N.N. Titova, V.V. Aleoshin // *Protist*. – 2013. – V. 164, № 2. – P. 195-205.
224. Karpov, S.A. Morphology, phylogeny and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia / S.A. Karpov, M.A. Mamkaeva, V. Aleoshin, E. Nassonova, O. Lilje, F.H. Gleason // *Front. Microbiol.* – 2014. – V. 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00112
225. Katinka, M.D., Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi* / M.D. Katinka, S. Duprat, E. Cornillot, G. Metenier, F. Thomarat, et al. // *Nature*. – 2001. – V. 414, № 6862. – P. 450-453.

226. Katzwinkel-Wladarsch, S. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens / S. Katzwinkel-Wladarsch, M. Lieb, W. Heise, T. Loscher, H. Rinder // *Tropical Medicine and International Health*. – 1996. – V. 1, № 3. – P. 373-378.
227. Keeling, P.J. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia / P.J. Keeling, // *Fungal Genetics and Biology*. – 2003. – V. 38, № 3. – P. 298-309.
228. Keeling, P.J. Parasites go the full monty / P.J. Keeling // *Nature*. – 2001. – V. 414, № 6862. – P. 401-402.
229. Keeling, P.J. Phylogenetic place of Microsporidia in the Tree of Eukaryotes / P.J. Keeling // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. – 2014. – Oxford: Wiley Blackwell,. – P. 195-202.
230. Keeling, P.J., Doolittle W.F. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family / P.J. Keeling, Doolittle W.F. // *Mol. Biol. Evol.* – 1996. – V. 13, № 10. – P. 1297-1305.
231. Keeling, P.J., Fast N.M. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites / P.J. Keeling, N.M. Fast // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2002. – V. 56. – P. 93-116.
232. Keeling, P.J., Comparative genomics of microsporidia/ P.J. Keeling, N.M. Fast, J.S. Law, B.A. Williams, C.H. Slamovits // *Folia Parasitol.* – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 8-14.
233. Keeling, P.J., McFadden G.I. Origins of microsporidia/ P.J. Keeling, G.I. McFadden // *Trends Microbiol.* – 1998. – V. 6, № 1. – P. 19-23.
234. Keeling, P.J., Slamovits C.H. Simplicity and complexity of microsporidian genomes / P.J. Keeling, C.H. Slamovits // *Eukaryot. Cell.* – 2004. – V. 3, № 6. – P. 1363-1369.
235. Kelly, J.F. Tissue specificities of *Thelohania duorara*, *Agmasoma penaei*, and *Pleistophora* sp., microsporidian parasites of pink shrimp, *Penaeus duorarum* / J.F. Kelly // *J. Invertebr. Pathol.* – 1979. – V. 33, № 3. – P. 331-339.
236. Kent, M.L. Microsporidia in fish / M.L. Kent, R.W. Shaw, J.L. Sanders // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. – 2014. – P. 521-571.
237. Keohane, E.M., Weiss L.M. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review / E.M. Keohane, L.M. Weiss // *Folia Parasitol.* – 1998 –V. 45. – P. 117-127.
238. Keohane, E., Weiss L. M. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube / Keohane E., Weiss L. M. // *The Microsporidia and Microsporidiosis*. – 1999. – Washington, D. C: A.S.M. Press. – P.96 – 224

239. Kimura. M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences / M. Kimura // *J.Mol. Evol.* – 1980. – V. 16, № 2. – P. 111-120.
240. Knell, J.D., Allen G.E., Hazard E.I. Light and electron-microscope study of *Thelohania solenopsae* n.sp. (Microsporida: Protozoa) in red imported fire ant, *Solenopsis invicta* / J.D. Knell, G.E. Allen, E.I. Hazard // *J. Invertebr. Pathol.* – 1977. – V. 29, № 2. – P. 192-200.
241. Koonin, E.V. A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes / E.V. Koonin, N.D. Fedorova, J.D. Jackson, A.R. Jacobs, D. M. Krylov et al. // *Genome Biol.* – 2004. – V. 5, № 2. – doi: 10.1186/gb-2004-5-2-r7
242. Kotler, D.P. HIV incidence and factors associated with HIV acquisition among injection drug users in St Petersburg, Russia / A.P. Kozlov, A.V. Shaboltas, O.V. Toussova, S.V. Verevochkin, B.R. Masse // *AIDS.* – 2006. – V. 20, № 6. – P. 901-906.
243. Kudo, R. A biological and taxonomic study of the microsporidia / R. Kudo // *Illinois Biol. Monograph.* – 1924. – V9, № 3. – 269 p.
244. Kudo, R. Protozoology, Fifth Edition / R. Kudo // Springfield, Illinois. – 1966. – 385 p
245. Kurtti, T.J. In vitro developmental biology and spore production in *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae) / T. J. Kurtti, S.E. Ross, Y. Liu., U. G. Munderloh // *J.Invertebr, Pathol.* – 1994. – V. 63. – P. 188-196.
246. Kurtti. T. J.. The spread of infection by the microsporidian, *Nosema disstriae* in insect cell lines / T.J. Kurtti., Tsang K. R., Brooks M. A. // *J. Protozool.* – 1983. – V. 30. – P. 652-657.
247. Kurze, C. Differential proteomics reveals novel insights into *Nosema*-honey bee interactions / C. Kurze, R. Dosselli., J. Grassl, Y. Le Conte, P. Kryger, B. R.F.A. Baer Moritz // *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* – 2016. – V. 79. – P. 42-49.  
Kurze C. *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis / C. Kurze, Y. Le Conte, C. Dussaubat, S. Erler, P. Kryger, O. Lewkowski, T. Muller, M.Widder, R.F. Moritz // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10, № 10. – doi: 10.1371/journal.pone.0140174.
248. Kweon, H.S. Golgi enzymes are enriched in perforated zones of Golgi cisternae but are depleted in COPI vesicles / H.S. Kweon, G.V. Beznoussenko, M. Micaroni, R. Polishchuk, A. Trucco, O. Martella, D. Di Giandomenico, P. Marra, A. Fusella, A. Di Pentima, E.G.Berger, W.J. Geerts, A.J. Koster, K. Burger, A. Luini, A.A. Mironov // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – V. 15, № 10. – P. 4710-4724.

249. Kyei-Poku, G. Complete rRNA sequence, arrangement of tandem repeated units and phylogeny of *Nosema fumiferanae* from spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clemens) / G. Kyei-Poku, D. Gauthier, K. Van Frankenhuyzen // J. Eukaryot. Microbiol. – 2012. – V. 59, № 1. – P. 93-96.
250. Kyei-Poku, G. Molecular data and phylogeny of *Nosema* infecting lepidopteran forest defoliators in the genera *Choristoneura* and *Malacosoma* / G. Kyei-Poku, D. Gauthier, K. Van Frankenhuyzen // J. Eukaryot. Microbiol.. – 2008. – V. 55, № 1. – P. 51-58.
251. Kyei-Poku, G., Sokolova Y.Y. The microsporidium *Nosema disstriae* (Thomson 1959): Fine structure and phylogenetic position within the *N. bombycis* clade / G. Kyei-Poku, Y.Y. Sokolova // J. Invertebr. Pathol. – 2017. – V. 143. – P. 90-103.
252. Labbe, A. Sporozoa. "Das Tierreich" / A Labbe // 1899. – Berlin: Friedlander u Sohn. – 180 p.
253. Ladinsky, M.S. Golgi structure in three dimensions: Functional insights from the normal rat kidney cell / M.S. Ladinsky, D.N. Mastrorarde, J.R. McIntosh, K.E. Howell, L.A. Staehelin // J. Cell Biol. – 1999. – V. 144, № 6. – P. 1135-1149.
254. Laisutisan, K. Ultrastructure of the microsporidian *Thelohania (Agmasoma) penaei* in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) / K. Laisutisan, S. Prasertsri, N. Chuchird, P. Limsuwan // Kasetsart J. Nat. Sci. – 2009. – V. 33, № 2. – P. 41-48.
255. Lampel, K.A. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens / K.A. Lampel, P.A. Orlandi, L. Kornegay // Applied and Environ. Microbiol, – 2000. – V. 66, № 10. – P. 4539-4542.
256. Lange, C.E. A new species of *Perezia* (Microsporida, Perezieiidae) from the Argentine grasshopper *Dichroplus elongatus* (Orthoptera, Acrididae) / C.E. Lange // J. Protozool. – 1987. – V. 34, № 1. – P. 34-39.
257. Lange, C.E. Long-term patterns of occurrence of *Nosema locustae* and *Perezia dichroplusae* (Microsporidia) in grasshoppers (Orthoptera : Acrididae) of the Pampas, Argentina / C.E. Lange // Acta Protozool. – 2003. – V. 42, № 4. – P. 309-315.
258. Lange C.E. *Heterovesicula cowani* N.G., N.Sp (Heterovesiculidae N.Fam), a microsporidian parasite of mormon crickets, *Anabrus simplex* Haldeman, 1952 (Orthoptera, Tettigonidae) / C.M. Macvean, J.E. Henry, D.A. Streett // J. Eukaryot. Microbiol. – 1995. – V. 42, № 5. – P. 552-558.
259. Lange, C.E., Sokolova Y.Y. The development of the microsporidium *Paranosema (Nosema) locustae* for grasshopper control: John Henry's innovation with worldwide lasting impacts / C.E. Lange, Y.Y. Sokolova // Protistology. – 2017. – V. 11, № 3. – P. 170-174.

260. Larsson, J.I.R. Molecular versus morphological approach to microsporidian classification / J.I.R. Larsson // *Folia Parasitol.* – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 143-144.
261. Larsson J I.R. On the taxonomy of the genus *Systemostrema* Hazard and Oldacre, 1975 (Microspora, Thelohaniidae), with description of two new specis. / J I.R. Larsson // *System. Parasitol.* – 1988. – V. 11, № 1. – P. 3-17.
262. Larsson J.I.R. The hyperparasitic microsporidium *Amphiacantha longa* Caullery et Mesnil, 1914 (Microspora: Metchnikovellidae).Description of the cytology, redescription of the species, emended diagnosis of the genus *Amphiacantha* and establishment of the new family *Amphiacanthidae* / J.I.R. Larsson // *Folia Parasitol.* – 2000. – V. 47, № 4. – P. 241-256.
263. Larsson J. I. R. The Primitive Microsporidia / J. I. R. Larsson // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition.* – 2014. – Oxford: Wiley Blackwell . P. 605-634.
264. Larsson J.I.R. Ultrastructural study of *Glugea cladocera* Pfeiffer, 1895, and transfer to the genus *Agglomerata* (Microspora, Duboscqiidae) / Larsson J.I.R., Ebert D., Vavra J.// Larsson J.I.R., Ebert D., Vavra J.. *Europ. J. Protistol.* – 1996. – V. 32, № 4. – P. 412-422.
265. Larsson, R., Kjøie M. The ultrastructure and reproduction of *Amphiamblys capitellides* (Microspora, Metchnikovellidae), a parasite of the gregarine *Ancora sagittata* (Apicomplexa, Lecudinidae), with redescription of the species and comments on the taxonomy / R. Larsson, M. Kjøie M. // *Europ. J. Protistol.* – 2006. – V. 42, № 4. – P. 233-248.
266. Le Donne, V. *Nannizziopsis guarroi* infection in two Inland Bearded Dragons (*Pogona vitticeps*): clinical, cytologic, histologic, and ultrastructural aspects / V. Le Donne, N. Crossland, J. Brandao, Y. Sokolova, N. Fowlkes, J.G. Nevarez // *Vet. Clinic. Pathology.* – 2016. – V. 45, № 2. – P. 368-375.
267. Lee, S.C. Sex and the Microsporidia / S.C. Lee, J. Heitman , J.E. Ironside // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition.* – 2014. – Oxford: Wiley Blackwell. – P. 231-245.
268. Lee, S. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi / S. Lee, N. Corradi, E. Byrnes, S. Torres-Martinez, F. Dietrich, P. Keeling, J. Heitman // *Curr Biol.* – 2008. – V. 18. – P. 1675 - 1679.
269. Lehmann, U. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction / U. Lehmann, S. Glockner, W. Kleeberger, H. Feist, H. von Wasielewski R., Kreipe // *American J. Pathol.* – 2000. – V. 156, № 6. – P. 1855-1864.

270. Leitch. G.J., Shaw A. P., Colden-Stanfield M., Scanlon M., Visvesvara G. S. Multinucleate host cells induced by *Vittaforma corneae* (Microsporidia) / G.J. Leitch, A.P. Shaw, M. Colden-Stanfield, M. Scanlon, G.S. Visvesvara // *Folia Parasitol.* – 2005. – V. 52. – P. 103-110.
271. Letcher, P.M. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Rozella multimorpha*, a new species in Cryptomycota / P.M. Letcher, J.E. Longcore, T.Y. James, D.S. Leite, D.R. Simmons, M.J. Powell // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2018. – V. 65, № 2. – P. 180-190.
272. Letcher, P.M. Morphological, molecular, and ultrastructural characterization of *Rozella rhizoclosmatii*, a new species in Cryptomycota / P.M. Letcher, J.E. Longcore, C.A. Quandt, D.D. Leite, T.Y. James, M.J. Powell // *Fungal Biology.* – 2017. – V. 121, № 1. – P. 1-10.
273. Letcher, P.M. Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an algal parasite new to the Cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel / P.M. Letcher, S. Lopez, R.S. Schmieder, P.A. Lee, C. Behnke, M.J. Powell, R.C. McBride // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, № 2. – doi: 10.1371/journal.pone.0056232
274. Levine, N.D. A newly revised classification of the Protozoa / N.D. Levine, J.O. Corliss, F.E.G. Cox, G. Deroux, J. Grain. et al. // *J. Protozool.* – 1980. – V. 27, № 1. – P. 37-58.
275. Lin, L. The protein import pore Tom40 in the microsporidian *Nosema bombycis* / L. Lin, G. Pan, T. Li., X. Dang, Y. Deng, C. Ma, J. Chen, J. Luo, Z. Zhou // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2012. – V. 59, № 3. – P. 251-257.
276. Liu, H. Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis* / H. Liu, G. Pan, S. Song, J. Xu, T. Li, Y. Deng, Z. Zhou // *J. Invertebr. Pathol.* – 2008. – V. 99, № 2. – P. 235-238.
277. Liu, J. Biphasic modulation of apoptotic pathways in *Cryptosporidium parvum*-infected human intestinal epithelial cells / J. Liu, M.Q. Deng, C.A. Lancto, M.S. Abrahamsen, M.S. Rutherford, S. Enomoto // *Infection and Immunity.* – 2009. – V. 77, № 2. – P. 837-849.
278. Liu, Y.J.J. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes / Y.J.J. Liu, M.C. Hodson, B.D. Hall // *Bmc Evol. Biol.* – 2006. – V. 6. – doi: 10.1186/1471-2148-6-74.
279. Liu Y. Phylogenomic analyses predict sistergroup relationship of nucleariids and Fungi and paraphyly of zygomycetes with significant support / Y. Liu, E.T. Steenkamp, H.

- Brinkmann, L. Forget, H. Philippe, B.F. Lang // *Bmc Evol. Biol.* – 2009. – V. 9. – doi: 10.1186/1471-2148-9-272.
280. Locksley, R.M. The TNF and TNF receptor superfamilies/ R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo // *Cell.* – 2001. – V. 104, № 4. – P. 487-501.
281. Lom, J., Dykova I. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective // *Folia Parasitol (Praha).* – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 69-81.
282. Lom, J., Vávra J. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spore / J. Lom, I. Dykova // *Acta Protozool.* – 1963. – V. 1, № 81-92.
283. Luder, C.G.K., Gross U., Lopes M. F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions / C.G.K. Luder, U. Gross, M. Lopes // *Trends in Parasitology.* – 2001. – V. 17, № 10. – P. 480-486.
284. Lujan, H.D. Isoprenylation of proteins in the protozoan *Giardia lamblia* / H.D. Lujan, M.R. Mowatt, G.Z. Chen, T.E. Nash // *Mol. Biochem. Parasitol.* – 1995. – V. 72, № 1-2. – P. 121-127.
285. Lujan, H.D., Touz M.C. Protein trafficking in *Giardia lamblia* / H.D. Lujan, M.C. Touz // *Cellular Microbiol.* – 2003. – V. 5, № 7. – P. 427-434.
286. Luo, X. Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors / X. Luo, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, X.D. Wang // *Cell.* – 1998. – V. 94, № 4. – P. 481-490.
287. Maddox, J.V., Baker M. D., Jeffords M. R., Kuras M., Linde A., Solter L. F., McManus M. L., Vávra J., Vossbrinck C. R. *Nosema portugal*, n. sp., isolated from Gypsy Moths (*Lymantria dispar* L.) collected in Portugal / J.V. Maddox, M.D. Baker, M.R. Jeffords, M. Kuras, A. Linde, L.F. Solter, M.L. McManus, J. Vávra, C.R. Vossbrinck // *J. Invertebr. Pathol.* – 1999. – V. 73, № 1. – P. 1-14.
288. Malhotra, V. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack / V. Malhotra, T. Serafini, L. Orci, J.C. Shepherd, J.E. Rothman // *Cell.* – 1989. – V. 58, № 2. – P. 329-336.
289. Mangiarotti, G. Coupling of transcription and translation in *Dictyostelium discoideum* nuclei / G. Mangiarotti // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38, № 13. – P. 3996-4000.
290. Manier, J.F., Ormières R. Ultrastructure de quelques stades de *Chytridopsis socius* Schn parasites de *Blaps lethifera* Marsch (Coleoptera, Tenebrionidae) / J.F. Manier, R. Ormières // *Protistologica.* – 1968. – V. 4. – P. 181-185.
291. Manning-Cela, R., Marquez C., Franco E., Talamas-Rohana P., Meza I. BFA-sensitive and insensitive exocytic pathways in *Entamoeba histolytica* trophozoites: their

- relationship to pathogenesis / R. Manning-Cela, C. Marquez, E. Franco, P. Talamas-Rohana, I. Meza // *Cellular Microbiol.* – 2003. – V. 5, № 12. – P. 921-932.
292. Marra, P. The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment / P. Marra, T. Maffucci, T. Daniele, G. Di Tullio, Y. Ikehara, E.K.L. Chan, A. Luini, G. Beznoussenko, A. Mironov, M.A. De Matteis // *Nature Cell Biol.* – 2001. – V. 3, № 12. – P. 1101-1113.
293. Marti M. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite *Giardia intestinalis* / M. Marti, A. Regos, Y.J. Li, E.M. Schraner, P. Wild, N. Muller, L.G. Knopf, A.B. Hehl // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 27. – P. 24837-24848.
- Martin-Hernandez, R.. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis / R. Martin-Hernandez, M. Higes, S. Sagastume, A. Juarranz, J. Dias-Almeida, G.E. Budge, A. Meana, N. Boonham // *PLoS ONE.* – 2017. – V. 12, № 2. – doi: 10.1371/journal.pone.0170183
294. McIntosh, J.R. Electron microscopy of cells: a new beginning for a new century / J.R. McIntosh // *J. Cell Biol.* . – 2001. – V. 153. – P. F25-F32.
295. Melkonian, M. Scale formation in algae / M. Melkonian, B. Becker, D. Becker // *J. Electron Microscopy Technique.* – 1991. – V. 17, № 2. – P. 165-178.
- Menendez, D. The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks / D. Menendez, M. Shatz, K. Azzam, S. Garantziotis, M.B. Fessler, M.A. Resnick // *Plos Genetics.* – 2011. – V. 7, № 3.– doi: 10.1371/journal.pgen.1001360
- Mikhailov, K.V. Genomic survey of a hyperparasitic microsporidian *Amphiamblys* sp (Metchnikovellidae) / K.V. Mikhailov, T.G. Simdyanov, V.V. Aleoshin // *Genome Biol. Evol.* – 2017. – V. 9, № 3. – P. 454-467. – doi: 10.1093/gbe/evw235.
296. Milks, M.L., Comparative effectiveness of light-microscopic techniques and PCR in detecting *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) infections in red imported fire ants (*Solenopsis invicta*) / M.L. Milks, Y.Y. Sokolova, I.A. Isakova, J.R. Fuxa, F. Mitchell, K.F. Snowden, S.B. Vinson // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2004. – V. 51, № 2. – P. 187-191.
297. Mills, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease / C. Mills // *Critic. Rev. Immunol.* – 2012. – V. 32, № 6. – P. 463-488.
298. Milner, R.J. *Nosema whitei*, a microsporidian pathogen of some species of *Triboleaum* / R.J. Milner // *J. Invertebr. Pathol.* – 1972. – V. 19, № 2. – P. 231-248.
299. Miranda-Saavedra, D. The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and

- Schizosaccharomyces pombe* / D. Miranda-Saavedra, M.J. Stark, J.C. Packer, C.P. Vivares, C. Doerig, G.J. Barton // BMC Genomics. – 2007. – V. 8. – P. 309. – doi:10.1186/1471-2164-8-309.
300. Mironov, A.A. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae / A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko, P. Nicoziani, O. Martella, A. Trucco, H.S. Kweon, D.D. Giandomenico, R.S. Polishchuk et al. // J. Cell Biol. – 2001. – V. 155, № 7. – P. 1225-1238.
301. Mironov, A.A. Intra-Golgi transport: A way to a new paradigm? / A.A. Mironov, G.V. Beznoussenko, R.S. Polishchuk, A. Trucco // Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research. – 2005. – V. 1744. – P. 340-350.
302. Mironov A.A. Variations on the intracellular transport theme: Maturing cisternae and trafficking tubules / A.A. Mironov, P. Weidman, A. Luini // J. Cell Biol. – 1997. – V. 138, № 3. – P. 481-484.
303. Mogelsvang, S. Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris* / S. Mogelsvang, N. Gomez-Ospina, J.S. Oderholm, B.S. Glick, L.A. Staehelin // Mol. Biol. Cell. – 2003. – V. 14, № 6. – P. 2277-2291.
304. Mogelsvang, S., Marsh B. J., Ladinsky M. S., Howell K. E. Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian golgi complex / S. Mogelsvang, B.J. Marsh, M.S. Ladinsky, K.E. Howell // Traffic. – 2004. – V. 5, № 5. – P. 338-345.
305. Molestina, R.E., Activation of NF-kappaB by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated IkappaB to the parasitophorous vacuole membrane / R.E. Molestina, T.M. Payne, I. Coppens, A.P. Sinai // J Cell Sci. . – 2003 – V. 116, № 21. – P. 4359-4371.
306. Morin-Ganet, M.N., Role of endoplasmic reticulum-derived vesicles in the formation of Golgi elements in sec23 and sec18 *Saccharomyces cerevisiae* mutants / M.N. Morin-Ganet, A. Rambourg, Y. Clermont, F. Képès // Anatomical Record. – 1998. – V. 251, № 2. – P. 256-264.
307. Moser B.A. Analysis of the ribosomal DNA sequences of the microsporidia *Thelohania* and *Vairimorpha* of fire ants / B.A. Moser, J.J. Becnel, J. Maruniak, R.S. Patterson // J. Invertebr. Pathol. – 1998. – V. 72, № 2. – P. 154-159.
308. Mowbrey, K., Dacks J.B. Evolution and diversity of the Golgi body / K. Mowbrey, J.B. Dacks // Febs Letters. – 2009. – V. 583, № 23. – P. 3738-3745.
309. Mullen, M.P. A note on the use of FTA technology for storage of blood samples for DNA analysis and removal of PCR inhibitors / M.P. Mullen, D.J. Howard, R. Powell, J. P.

- Hanrahan J. P. // Irish Journal of Agricultural and Food Research. – 2009. – V. 48, № 1. – P. 109-113.
310. Muncy, R.J. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Atlantic): white shrimp / R.J. Muncy // Book Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Atlantic): white shrimp. / Editor. – FWS/OBS-82/11.27. U.S. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4 1984. – P. 19 [http://www.sms.si.edu/irlspec/Penaau\\_setife](http://www.sms.si.edu/irlspec/Penaau_setife).
311. Nassonova, E.S., Smirnov A.V. Synaptonemal complexes as evidence for meiosis in the life cycle of the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli* / E.S. Nassonova, A.V. Smirnov // Europ. J. Protistol. – 2005. – V. 41, № 3. – P. 175-181.
312. Nassonova, E. Chromosomal composition of the genome in the monomorphic diplokaryotic microsporidium *Paranosema grylli*: analysis by two-dimensional pulsed-field gel electrophoresis / E. Nassonova, E. Cornillot, G Metenier., N. Agafonova, B. Kudryavtsev, S. Skarlato, C.P. Vivares // Folia Parasitol. – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 145-157.
313. Ndzi, E.S. Fast Technology Analysis enables identification of species and genotypes of latent microsporidia infections in healthy native cameroonians / E.S. Ndzi, T. Asonganyi, M.B. Nkinin, L.H. Xiao, E.S. Didier, L.C. Bowers, S.W. Nkinin, E.S. Kaneshiro // J. Eukaryot. Microbiol. – 2016. – V. 63, № 2. – P. 146-152.
314. Nordin, G.L. Transovarial transmission of a *Nosema* sp. infecting *Malacosoma americanum* / G.L.Nordin // J. Invertebr. Pathology. – 1975. – V. 25, № 2. – P. 221-228.
315. Nordin, G.L., Maddox J.V. Microsporida of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. I. Identification, distribution, and comparison of *Nosema* sp. with similar *Nosema* spp. from other Lepidoptera / G.L. Nordin, J.V. Maddox // J. Invertebr. Pathol. – 1974. – V. 24, № 1. – P. 1-13.
316. Novikoff, A.B., Goldfischer S. Nucleoside-diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies / A.B. Novikoff, S. Goldfischer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1961. – V. 47. – P. 802-810.
317. Nylund, S. *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) / S. Nylund, A. Nylund, K. Watanabe., C.E. Arnesen, E. Karlsbakk // J. Eukaryot. Microbiol. – 2010. – V. 57, № 2. – P. 95-114.
318. Oi, D.H. Evidence of intracolony transmission of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia: Thelohaniidae) in red imported fire ants (Hymenoptera : formicidae) and the first report

- of spores from pupae / Oi D.H., J.J. Becnel, D.F. Williams // *J. Invertebr. Pathol.* – 2001. – V. 78, № 3. – P. 128-134.
319. O'Neal, J., Markin G.P. The larval instars of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren / J.O'Neal, G.P. Markin // *J. Kansas Entomologi, Soc.* – 1975. – V. 48. – P. 141-151.
320. Obiakor, H. A comparison of hydraulic and laser capture microdissection methods for collection of single B cells, PCR, and sequencing of antibody VDJ / H. Obiakor, D. Sehgal, J.F. Dasso, R.F. Bonner, A. Malekafzali, R.G. Mage // *Analyt. Biochemy.* – 2002. – V. 306, № 1. – P. 55-62.
321. O'Mahony, E.M. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi* / E.M. O'Mahony, W.T. Tay, R.J. Paxton // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2007. – V. 54, № 1. – P. 103-109.
322. Orci, L. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack / L. Orci, B.S. Glick, J.E. Rothman // *Cell.* – 1986. – V. 46, № 2. – P. 171-184.
323. Orlofsky, A. Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response / A. Orlofsky, L.M. Weiss, N. Kawachi, M.B. Prystowsky // *J. Immunol.* – 2002. – V. 168, № 4. – P. 1840-1846.
324. Ormières, R. *Amphyamblys bhatiellae* n. sp., microsporidie parasite de *Bhatiella marphysae* Setna, 1931, Eugrégarine d'Annélide Polychète / R. Ormières, C. Loubès, J. Maurand // *Protistologica.* – 1981. – V. 17, № 2. – P. 273-280.
325. Ossareh-Nazari, B. Protein export from the nucleus / B. Ossareh-Nazari, C. Gwizdek, C. Dargemont // *Traffic.* – 2001. – V. 2, № 10. – P. 684-689.
326. Ostermann, J. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles / J. Ostermann, L. Orci, K. Tani, Amherdt M., M. Ravazzola, Z. Elazar, J.E. Rothman // *Cell.* – 1993. – V. 75, № 5. – P. 1015-1025.
327. Overath, P., Engstler M. Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system / P. Overath, M. Engstler // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 53, № 3. – P. 735-744.
328. Overstreet, R.M. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts / Overstreet, R.M. // *Aquaculture.* – 1973. – V. 1. – P. 105-140.
329. Overstreet, R.M., Weidner E. Differentiation of microsporidian spore-tails in *Inodosporus spraguei* gen. et sp. n. . / R.M. Overstreet, E. Weidner // *Z. Parasitenkd* – 1974. – V. 44. – P. 169–186.

330. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis / G. Palade // Science. – 1975. – V. 189, № 4200. – P. 347-358.
331. Pan, G. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation/ G. Pan, J. Xu, T. Li, Q. Xia, S.L. Liu, et al. // BMC Genomics. – 2013. – V. 14, № 1. – doi: 10.1186/1471-2164-14-186
332. Panek, J. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncaliia algerae* / J. Panek, H. El Alaoui, A. Mone, S. Urbach, E. Demette, et al. // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, № 6. – doi: 10.1371/journal.pone.0100791
333. Parisot, N. Microsporidian genomes harbor a diverse array of transposable elements that demonstrate an ancestry of horizontal exchange with metazoans / N. Parisot, A. Pelin, P. Gasc, V. Polonais, A. Belkorchia et al // Genome Biol. and Evol. – 2014. – V. 6, № 9. – P. 2289-2300.
334. Pasharawipas, T., Flegel T.W. A specific DNA probe to identify the intermediate host of a common microsporidian parasite of *Penaeus merguensis* and *P. monodon* / T. Pasharawipas, T.W. Flegel // Asian Fisheries Science. – 1994. – V. 7. – P. 157-167.
335. Pasharawipas, T. Comparison of amplified RNA gene sequences from microsporidian isolates (*Agmasoma* or *Thelohania*) in *Penaeus merguensis* and *P. monodon* / T. Pasharawipas, T. Flegel, S. Chaiyaroj, S. Mongkolsuk, S. Sirisinha // Asian Fisheries Science. – 1994. – V. 7. – P. 169-178.
336. Patterson, G.H. Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system / G.H. Patterson, K. Hirschberg, R.S. Polishchuk, D. // Cell. – 2008. – V. 6. – P. 1055-1067.
337. Gerlich, R.D. Phair, J. Lippincott-Schwartz // Cell. – 2008. – V. 133, № 6. – P. 1055-1067.
338. Swofford, D. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4 / D. Swofford // Sinauer Associates. – 2002. – Sunderland, Massachusetts. [http://www.phylo.org/sub\\_sections/PAUP\\_Cmd\\_ref\\_v2.pdf](http://www.phylo.org/sub_sections/PAUP_Cmd_ref_v2.pdf).
339. Payne, T.M. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. / T.M. Payne, R. Molestina, A.P. Sinai // J Cell Sci. . – 2003. – V. 116, № 21. – P. 4345-4358.
340. Pelham, H.R.B. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus / H.R.B. Pelham // Curr. Opini. Cell Biol. – 1995. – V. 7, № 4. – P. 530-535
341. Perez-Farfante, I. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus* / I. Perez-Farfante // Fishery Bull. – 1969. – V. 67, № 3. – P. 461-591.

342. Peters P.J., Pierson J. Immunogold labeling of thawed cryosections / P.J. Peters, J. Pierson // *Methods Cell Biol.* – 2008. – V. 88. – P. 131-49.
343. Peterson, T.S. Luna stain, an improved selective stain for detection of microsporidian spores in histologic sections / T.S. Peterson, J.M. Spitsbergen, S.W. Feist, M.L. Kent // *Diseases of Aquatic Organisms.* – 2011. – V. 95, № 2. – P. 175-180.
344. Petri, M. Microsporidia and mammalian tumors / M. Petri // *Comparative Pathobiology, Volume 1: Biology of the microsporidia.* – 1976. – Plenum Press. – P. 239-244.
345. Peuvel, I. The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi* / I. Peuvel, P. Peyret, G. Metenier, C.P. Vivares, F. Delbac // *Mol Biochem Parasitol.* – 2002. – V. 122, № 1. – P. 69-80.
346. Peuvel-Fanget, I. EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall / I. Peuvel-Fanget, V. Polonais, D. Brosson, C. Texier, L. Kuhn et al. // *Intern. J. Parasitol.* – 2006. – V. 36, № 3. – P. 309-318.
347. Philippe, H., Laurent J. How good are deep phylogenetic trees? / H. Philippe, J. Laurent // *Current Opinion in Genetics & Development.* – 1998. – V. 8, № 6. – P. 616-623.
348. Philippe, H., Early-branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions / H. Philippe, P. Lopez, H. Brinkmann, K. Budin, A. Germot et al. // *Proceed. Royal Soc. London Series B.* – 2000. – V. 267, № 1449. – P. 1213-1221.
349. Pilley, B.M. A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida), for *Nosema necatrix* Kramer 1965: pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae) / B.M. Pilley // *J. Invertebr. Pathol.* – 1976. – V. 28, № 2. – P. 177-183.
350. Pimpl, P. In situ localization and in vitro induction of plant COP-I-coated vesicles / P. Pimpl, A. Movafeghi, S. Coughlan, J. Denecke, S. Hillmer, D.G. Robinson // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 2219-2236.
351. Pleshinger, J., Weidner E. The microsporidian spore invasion tube. 4. Discharge activations begins with PH- triggered Ca<sup>2+</sup> influx / J. Pleshinger, E. Weidner // *J. Cell Biol.* – 1985. – V. 100, № 6. – P. 1834-1838.
352. Polishchuk, R.S. / R.S. Polishchuk, E.V. Polishchuk, A.A. Mironov // *Europ. J. Cell Biol.* – 1999. – V. 78, № 3. – P. 170-185.
353. Pombert, J.F. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites / J.F. Pombert, M. Selman, F. Burki, F.T. Bardell, L. Farinelli et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109, № 31. – P. 12638-12643.

354. Pombert, J.F. Complete genome sequences from three genetically distinct strains reveal high intraspecies genetic diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / J.F. Pombert, J.S. Xu, D.R. Smith, D. Heiman, S. Young et al. // *Eukaryot. Cell.* – 2013. – V. 12, № 4. – P. 503-511.
355. Quandt, C.A. The genome of an intranuclear parasite, *Paramicrosporidium saccamoebae*, reveals alternative adaptations to obligate intracellular parasitism / C.A. Quandt, D. Beaudet, D. Corsaro, J. Walochnik, R. Michel et al. // *Elife.* – 2017. – V. 6. – doi: 10.7554/eLife.29594.
356. Redelings, B.D., Suchard M.A. Joint Bayesian estimation of alignment and phylogeny / B.D. Redelings, M.A. Suchard // *System. Biol.* – 2005. – V. 54, № 3. – P. 401-418.
357. Refardt, D. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) / D. Refardt, E.U. Canning, A. Mathis, S.A. Cheney, N.J. Lafranchi-Tristem, D. Ebert // *Parasitology.* – 2002. – V. 124, № 4. – P. 381-389.
358. Refardt, D. Morphology, molecular phylogeny, and ecology of *Binucleata daphniae* n. g., n. sp. (Fungi: Microsporidia), a parasite of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Branchiopoda) / D. Refardt, E. Decaestecker, P.T.J. Johnson, J. Vávra // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2008. – V. 55, № 5. – P. 393-408.
359. Regoes, A. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion / A. Regoes, D. Zourmpanou, G. León-Avila, M. Van Der Giezen, J. Tovar, A.B. Hehl // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, № 34. – P. 30557-30563.
360. Richter, B., Encephalitozoonosis in two Inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) / B. Richter, J. Csokai, I. Graner, T. Eisenberg, N. Pantchev, H.U. Eskens., N. Nedorost // *J. Compar. Pathol.* – 2013. – V. 148, № 2-3. – P. 278-282.
361. Richter, B. *Heterosporis anguillarum* infection in a Garter Snake (*Thamnophis sirtalis*) / B. Richter, I. Graner, J. Csokai // *J. Compar. Pathol.* – 2014. – V. 150, № 2-3. – P. 332-335.
362. Romanelli, D. Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis / D. Romanelli, M. Casartelli, S. Cappellosa, M. de Eguileor, G. Tettamanti // *Scientific Reports.* – 2016. – V. 6.
363. Ruhland, A. *Leishmania promastigotes* activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis / A. Ruhland, N. Leal, P.E. Kima // *Cell. Microbiol.* – 2007. – V. 9, № 1. – P. 84-96.
364. Ryan, P. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection / P. Ryan, M.W. Bennett, S. Aarons, G. Lee, J. K. Collins et al. // *Gut.* – 2002. – V. 51, № 5. – P. 665-670.

365. Saldanha A.J. Java Treeview-extensible visualization of microarray data / Saldanha A.J.// Bioinformatics. – 2004. – V. 20, № 17. – P. 3246-3248.
366. Scanlon, M. Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia-infected host cell / M. Scanlon, G.J. Leitch, A.P. Shaw, H. Moura, G.S. Visvesvara // J. Eukaryot. Microbiol. – 1999. – V. 46, № 5. – P. 34S-35S.
367. Scanlon, M. Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle / M. Scanlon, A. Shaw, C.J. Zhou, G.S. Visvesvara., G.J. Leitch // J. Eukaryot. Microbiol. – 2000. – V. 47, № 6. – P. 525-531.
368. Scarborough, A., Weidner E. Some properties of discharged *Glugea hertwigi* (Microsporida) sporoplasms / A. Scarborough, E. Weidner // J. Protozool. – 1985. – V. 32, № 2. – P. 284-289.
369. Seleznev, K.V. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradient for biochemical research / K.V. Seleznev, I.V. Issi, V.V. Dolgikh, G.B. Belostotskaya, O.A. Antonova, J.J. Sokolova // J. Eukaryot. Microbiol. – 1995. – V. 42, № 3. – P. 288-292.
370. Selman, M., Acquisition of an animal gene by microsporidian intracellular parasites / M. Selman, J.F. Pombert, L. Solter, L. Farinelli, L.M. Weiss et al. // Current Biology. – 2011. – V. 21, № 15. – P. 576-577.
371. Selman, M.. Extremely reduced levels of heterozygosity in the vertebrate pathogen *Encephalitozoon cuniculi* / M. Selman, B. Sak, M. Kvac, L.F. Farinelli, L.M. Weiss, N. Corradi // Eukaryot. Cell. – 2013. – V. 12, № 4. – P. 496-502.
372. Senderskiy, I.V. Secretion of *Antonospora (Paranosema) locustae* proteins into infected cells suggests an active role of microsporidia in the control of host programs and metabolic processes / I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, E.V. Seliverstova, O.A. Pavlova, V.V. Dolgikh // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, № 4. – doi: 10.1371/journal.pone.0093585
373. Shapiro, A.M. Ultrastructural characterization and further transmission studies of *Thelohania solenopsae* from *Solenopsis invicta* pupae / A.M. Shapiro, J.J. Becnel, D. H. Oi, D.F. Williams // J. Invertebr. Pathol. – 2003. – V. 83, № 2. – P. 177-180.
374. Sharpstone, D., Gazzard B. Gastrointestinal manifestations of HIV infection / D. Sharpstone, B. Gazzard // Lancet. – 1996. – V. 348, № 9024. – P. 379-383.
375. Shimoni, E., Müller M. On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device / E. Shimoni, Müller // J Microsc. – 1998. – V. 192, № 3. – P. 236-47.

376. Silveira, H., Canning E.U. In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of albendazole / H. Silveira, E.U. Canning // *Folia Parasitol.* – 1995. – V. 42, № 4. – P. 241-250.
377. Simakova, A.V. *Senoma* gen.n., a new genus of microsporidia, with the type species *Senoma globulifera* comb.n. (syn. *Issia globulifera* Issi et Pankova 1983) from the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall / A.V. Simakova, F.P. Pankova, Y.S. Tokarev, I.V.Issi // *Protistology.* – 2005. – V. 4, № 2. – P. 135-144.
378. Simakova, A.V. *Pankovaia semitubulata* gen. et sp. n. (Microsporidia: Tuzetiidae) from nymphs of mayflies *Cloeon dipterum* L. (Insecta: Ephemeroptera) in Western Siberia / A.V. Simakova, Y.S. Tokarev, I.V. Issi // *Europ. J. Protistol.* – 2009. – V. 45, № 1. – P. 13-20.
379. Slamovits, C.H. Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites / C.H. Slamovits, N.M. Fast, J.S. Law, P.J. Keeling // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14, № 10. – P. 891-896.
380. Snowden, K.F. Microsporidia in higher vertebrates / K.F Snowden.// *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition.* – Oxford: Wiley Blackwell. – 2014. – P. 469-491.
381. Snowden, K.F. Simple, filter-based PCR detection of *Thelohania solenopsae* (Microspora) in fire ants (*Solenopsis invicta*) / K.F. Snowden, K.S. Logan, B.S. Vinson // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2002. – V. 49, № 6. – P. 447-448.
382. Snowden, K.F., Shadduck J.A. Microsporidia in higher vertebrates / Snowden K. F., Shadduck J. A. // *The Microsporidia and microsporidiosis.* – 1999. – Washington, D.C.: American Society of Microbiology. – P. 393-413.
383. Sokolova, J., Entzeroth R. Morphological and immunological studies on microsporidia: antigene properties of *Nosema mesnili* spores / J. Sokolova, R. Entzeroth // *Archiv fur Protistenkunde.* – 1995. – V. 145, № 1-2. – P. 100-104.
384. Sokolova, O.I. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients / O.I. Sokolova, A.V. Demyanov, B L. Bowers, E.S. Didier, A.V. Yakovlev, S.O. Skarlato, Y.Y. Sokolova // *J. Clinic. Microbiol.* – 2011. – V. 49, № 6. – P. 2102-2108.
385. Sokolova, Y.Y. Perspectives of microsporidia as human pathogens: clues from invertebrate research (minireview) / Y.Y. Sokolova // *Protistology.* – 2015. – V. 9, № 3/4. – P. 117-126.
386. Sokolova, Y. Y. The microsporidium *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants (Hymenoptera : Formicidae) from Louisiana pastures / Y.Y. Sokolova, R.L. Bossard, J.

- R. Fuxa, D. W. Sanson, L.D. Foil // *Southwestern Entomologist*. – 2004a. – V. 29, № 4. – P. 271-276.
387. Sokolova, Y.Y. Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* gen. nov., comb. nov (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, E.V. Morzhina, E.S. Nasonova, I.V. Issi, et al // *J. Invertebr. Pathol.* – 2003. – V. 84, № 3. – P. 159--172.
388. Sokolova, Y.Y. Analysis of antibodies raised against soluble and membrane bound proteins of *Nosema grylli* (Microspora) spores / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, A. Weck-Heimann., R. Entzeroth // *Tsitologiya*. – 2000. – V. 42, № 10. – P. 993-1003.
389. Sokolova, Y.Y., Fuxa J.R. Biology and life-cycle of the microsporidium *Kneallhazia solenopsae* Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., from the fire ant *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa // *Parasitology*. – 2008. – V. 135, № 8. – P. 903-929.
390. Sokolova, Y. Y.. The nature of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) cysts in abdomens of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa, O.N. Borkhsenius // *J. Invertebr Pathol.* – 2005. – V. 90, № 1. – P. 24-31.
391. Sokolova, Y.Y., Hawke J. *Perezia nelsoni* (Microsporidia) in *Agmasoma penaei* infected Atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Paenaidae, Decapoda) and phylogenetic analysis of *Perezia* spp. complex / Y.Y. Sokolova, J. Hawke // *Protistology*. – 2016. – V. 10, № 3. – P. 67-78.
392. Sokolova, Y.Y. Ultrastructural analysis supports transferring *Nosema whitei* Weiser 1953 to the genus *Paranosema* and creation a new combination, *Paranosema whitei* / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, E.V. Morzhina, Y.S. Tokarev, C.R. Vossbrinck // *J. Invertebr.Pathol.* – 2005. – V. 90. – P. 122-126.
393. Sokolova, Y.Y. Annotated list of species of the Microsporidia described in the Former Soviet Union and Russia in 20th century (1967–2000) / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, V.N. Voronin // *Protistology*. – 2018. – V. 12, № 1. – P. 12-37.
394. Sokolova, Y.Y. Development, ultrastructure, natural occurrence, and molecular characterization of *Liebermannia patagonica* n. g., n. sp., a microsporidian parasite of the grasshopper *Tristiria magellanica* (Orthoptera : Tristiridae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // *J. Invertebr. Pathol.* – 2006b. – V. 91, № 3. – P. 168-182.
395. Sokolova, Y.Y. Establishment of *Liebermannia dichroplusae* n comb on the basis of molecular characterization of *Perezia dichroplusae* Lange, 1987 (Microsporidia) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2007. – V. 54, № 3. – P. 223-230.

396. Sokolova, Y.Y. Phylogenetic relationships of *Heterovesicula cowani*, a microsporidian pathogen of Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera : Tettigoniidae), based on SSU rDNA-sequence analyses / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2008. – V. 99, № 1. – P. 112-116.
397. Sokolova, Y.Y. Morphology and taxonomy of the microsporidium *Liebermannia covasacrae* n. sp from the grasshopper *Covasacris pallidinota* (Orthoptera, Acrididae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, Y. Mariottini, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2009. – V. 101, № 1. – P. 34-42.
398. Sokolova, Y.Y. PCR-based analysis of spores isolated from smears by laser pressure catapult microdissection confirms genetic identity of spore morphotypes of the microsporidian *Thelohania solenopsae* / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R. Fuxa // J. Eukaryot. Microbil. – 2003b. – V. 50. – P. 584-585.
399. Sokolova, Y.Y. Spore morphotypes of *Thelohania solenopsae* (microsporidia) described microscopically and confirmed by PCR of individual spores microdissected from smears by position ablative laser microbeam microscopy / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R. Fuxa, S.B. Vinson // Microbiology. – 2004b. – V. 150. – P. 1261--1270.
400. Sokolova, Y.Y., Mironov A.A. Structure and function of the Golgi organelle in parasitic protists / Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov // in: The Golgi Apparatus. State of art 110 years after Camillo Golgi's discovery. – 2008. – Springer. – P. 647-675.
401. Sokolova, Y.Y., Overstreet R.M. A new microsporidium, *Apotasporea heleios* n. g., n. sp., from the Riverine grass shrimp *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) / Y.Y. Sokolova, R.M. Overstreet // J. Invertebr. Pathol. – 2018. – V. 157. – P. 125-135.
402. Sokolova, Y.Y. Fine structure of *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914 (microsporidia), a hyperparasite of gregarines *Polyrhabdina* sp from the polychaete *Pygospio elegans* / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nassonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2013. – V. 140, № 7. – P. 855-867.
403. Sokolova, Y.Y. Description of *Metchnikovella spiralis* sp n. (Microsporidia: Metchnikovellidae), with notes on the ultrastructure of metchnikovellids / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nassonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2014. – V. 141, № 8. – P. 1108-1122.
404. Sokolova, Y.Y. Establishing a New Species *Encephalitozoon pogonae* for the Microsporidian Parasite of Inland Bearded Dragon *Pogona vitticeps* Ahl 1927 (Reptilia, Squamata, Agamidae) / Y.Y. Sokolova, K. Sakaguchi, D.B. Paulsen // J. Eukaryot. Microbiol. – 2016a. – V. 63, № 4. – P. 524-535.

405. Sokolova, Y.Y. Microsporidia *Alfvenia sibirica* sp. n. and *Agglomerata cladocera* (Pfeiffer) 1895, from Siberian microcrustaceans and phylogenetic relationships within the "Aquatic outgroup" lineage of fresh water microsporidia / Y.Y. Sokolova, I.V. Senderskiy, Y.S. Tokarev // J. Invertebr. Pathol. – 2016b. – V. 136. – P. 81-91.
406. Sokolova, Y.Y. Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010a. – V. 103, № 1. – P. 71-73.
407. Sokolova, Y.Y. New microsporidia parasitizing bark lice (Insecta: Psocoptera) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010b. – V. 104, № 3. – P. 186-194.
408. Sokolova, Y.Y. Identification of Microsporidia infections in nature: Light microscopy or PCR? / Y.Y. Sokolova, I. M. Sokolov, J.R. Fuxa // Protistology. – 2004b. – V. 3, № 4. – P. 273-281.
409. Sokolova, Y.Y. *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) in the dragonfly *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae) from South Siberia: morphology and molecular characterization / Y. Sokolova, N. Kryukova, V. Glupov, J. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2006a. – V. 53, № 1. – P. 49-57.
410. Sokolova, Y., Lange C. An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). / Y. Sokolova, C. Lange // Acta Protozoologica. – 2002. – V. 41. – P. 229-237.
411. Sokolova, Y. Morphology and phylogeny of *Agmasoma penaei* (Microsporidia) from the type host, *Litopenaeus setiferus*, and the type locality, Louisiana, USA / Y. Sokolova, A. Pelin, J. Hawke, N. Corradi // Intern. J. Parasitol. – 2015. – V. 45, № 1. – P. 1-16.
412. Sokolova, Y. Visualization of early Golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli* / Y. Sokolova, E. Snigirevskaya, E. Morzhina, S. Skarlato, A. Mironov, Y. Komissarchik // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. – P. 86S-87S.
413. Sollberger, G., Caspase-4 is required for activation of inflammasomes / G. Sollberger, G.E. Strittmatter, M. Kistowska, L.E. French, H.D. Beer // J. Immunol. – 2012. – V. 188, № 4. – P. 1992-2000.
414. Southern, T.R. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro / T.R. Southern, C.E. Jolly, M.E. Lester, J.R. Hayman // Eukaryot. Cell. – 2007. – V. 6, № 8. – P. 1354-1362.

415. Southern, T.R. Identification of a microsporidia protein potentially involved in spore adherence to host cells / Southern T.R., Jolly C.E., Lester M.E., Hayman J.R. // J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – V. 53. – P. S68-S69.
416. Sprague, V. Classification and phylogeny of the Microsporidia / V.S. Prague // Comparative Pathobiology. – 1977. – Plenum Press, – P. 1-31.
417. Sprague, V. Zoological distribution of microsporidia / V. Sprague. // Comparative Pathobiology. – 1977b. – P. 335-387.
418. Sprague, V. Taxonomy of phylum Microspora / V. Sprague, J.J. Becnel, E.I. Hazard // Critical Reviews in Microbiology. – 1992. – V. 18, № 5-6. – P. 285-395.
419. Stark, R.W. Combined nanomanipulation by atomic force microscopy and UV-laser ablation for chromosomal dissection / R.W. Stark, F.J. Rubio-Sierra, S. Thalhammer, W.M. Heckl // Europ. Biophysics J.1 with Biophysics Lett. – 2003. – V. 32, № 1. – P. 33-39.
420. Stentiford, G. D., Becnel J. J., Weiss L. M., Keeling P. J., Didier E. S. et al. Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain / G.D. Stentiford, J.J. Becnel., L.M. Weiss, P.J. Keeling, Didier E.S. et al.. // Trends Parasitol. – 2016. – V. 32, № 4. – P. 336-348.
421. Stentiford, G.D., Dunn A. M. Microsporidia in Aquatic Invertebrates / G.D. Stentiford, A.M. Dunn // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition, 2014. – P. 579-604.
422. Stentiford G.D., Feist S.W., Stone D.M., Bateman K.S., Dunn A. M. Microsporidia: Diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems / Stentiford G.D., Feist S.W., Stone D.M., Bateman K.S., Dunn A. M. // Trends Parasitol. – 2013. – V. 29, № 11. – P. 567-578.
423. Stentiford, G.D., Ross S., Minardi D., Feist S., Bateman K., Gainey P., Troman C., Bass D. Evidence for trophic transfer of *Inodosporus octospora* and *Ovipleistophora arlo* n. sp. (Microsporidia) between crustacean and fish hosts / G.D. Stentiford, S. Ross, D. Minardi, S. Feist, K. Bateman, P. Gainey., C. Troman, D. Bass // Parasitology. – 2017. – V. 145, № 8. – P. 1105-1117
424. Streett, D.A., Henry J.E. Epizootiology of a microsporidium in field populations of *Aulocara ellioti* and *Psoloessa delicatula* (Insecta, Orthoptera) / D.A. Streett, J.E. Henry // Canadian Entomologist. – 1984. – V. 116, № 10. – P. 1439-1440.
425. Takizawa, H. Developpement intranucleaire de la microsporidie *Nosema bombycis* dans les cellule de vers a soie apres infestation experimentale. / H. Takizawa, E. Vivier, A. Petiprez // C.R.Acad.Sci. – 1973. – V. 277. – P. 1769-1772.

426. Takvorian, P.M. The Multilayered Interlaced Network (MIN) in the sporoplasm of the microsporidium *Anncaliia algerae* is derived from Golgi / P.M.Takvorian, K.F. Buttle, Mankus D., Mannella C. A., Weiss L. M., Cali A. // J. Eukaryot. Microbiol. – 2013. – V. 60, № 2. – P. 166-178.
427. Takvorian P.M., Cali A. Enzyme histochemical identification of the Golgi apparatus in the microsporidian *Glugea stephani* / P.M. Takvorian, A. Cali // J. Eukaryot. Microbiol. – 1994. – V. 41, № 5. – P. S63-S64.
428. Takvorian, P.M., The early events of *Brachiola algerae* (Microsporidia) infection: spore germination, sporoplasm structure, and development within host cells / P.M. Takvorian, L.M. Weiss, A. Cali // Folia Parasitol. – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 118-129.
429. Tamura, K. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K.Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – V. 28, № 10. – P. 2731-2739.
430. Tamura, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipiński, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – V. 30, № 12. – P. 2725-2729.
431. Tanabe, Y. Are Microsporidia really related to Fungi?: a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi / Y.Tanabe, M.M. Watanabe, J. Sugiyama // Mycological Research. – 2002. – V. 106. – P. 1380-1391.
432. Tay, W.T. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites / W.T. Tay, E.M. O'Mahony, R.J. Paxton // J. Eukaryot. Microbiol. – 2005. – V. 52, № 6. – P. 505-513.
433. Temereva, E.N., Sokolova Y.Y. A Microsporidian Infection in Phoronids (Phylum Phoronida): *Microsporidium phoronidi* n. sp from a *Phoronis embryolabi* / E.N. Temereva, Y.Y. Sokolova // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – V. 65, № 3. – P. 427-431.
434. Terry, R.S. Ultrastructural characterisation and molecular taxonomic identification of *Nosema granulosis* n. sp., a transovarially transmitted feminising (TTF) microsporidium / R.S. Terry, J.E. Smith, D. Bouchon, T. Rigaud, P. Duncanson, R.G. Sharpe, A.M. Dunn // J. Eukaryot. Microbiol. – 1999. – V. 46, № 5. – P. 492-499.
435. Timofeev, S.A., Senderskiy I. V., Tsarev A. A., Tokarev Y. S., Dolgikh V. V. Heterologous expression of *Paranosema (Antonospira) locustae* hexokinase in lepidopteran, Sf9, cells is followed by accumulation of the microsporidian protein in

- insect cell nuclei / S.A.Timofeev, I.V. Senderskiy, A.A. Tsarev, Y.S. Tokarev, V.V. Dolgikh // J. Invertebr. Pathol. – 2017. – V. 143. – P. 104-107.
436. Tokarev, Y.S., Sokolova Y. Y., Entzeroth R. A primary culture of haemocytes isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) and their interactions with two intracellular paeasites - *Paranosema grylli* (Microsporidia) and *Adelina grylli* (Coccidia) / Y.S. Tokarev, Y.Y. Sokolova, R. Entzeroth // Tsitologiya. – 2005. – V. 47, № 6. – P. 478-485.
437. Tokarev, Y.S. Molecular and morphological characterization of *Anncaliia azovica* sp n. (Microsporidia) infecting *Niphargogammarus intermedius* (Crustacea, Amphipoda) from the Azov Sea / Y.S. Tokarev, Y.Y. Sokolova, A.A.Vasilieva, I.V. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – V. 65, № 3. – P. 296-307.
438. Tokuyasu, K. A technique for ultracyotomy of cell suspensions and tissues / K. Tokuyasu // J. Cell. Biol. – V. 57, № 2. 1973. – P. 551-65.
439. Torruella, G. The transcriptome of *Paraphelidium tribonemae* illuminates the ancestry of Fungi and Opisthosporidia / G.Torruella, X. Grau-Bové, D. Moreira, S.A. Karpov, J. A. Burns, A. Sebé-Pedrós, E. Völcker, P. López-García // Commun Biol. – 2018. – V. 1, № 231. – doi: 10.1038/s42003-018-0235-z.
440. Tovar, J. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica* / J. Tovar, A. Fischer, C.G. Clark // Mol. Microbiol. – 1999. – V. 32, № 5. – P. 1013-1021.
441. Troemel, E.R. New models of microsporidiosis: Infections in zebrafish, *C. elegans*, and honey bee / E.R. Troemel // PLoS Pathogens. – 2011. – V. 7, № 2. – doi: 10.1371/journal.ppat.1001243.
442. Tsai, Y.C. Morphological and molecular studies of a microsporidium (*Nosema* sp.) isolated from the thee spot grass yellow butterfly, *Eurema blanda arsakia* (Lepidoptera: Pieridae) / Y.C. Tsai, L.F. Solter, C.Y. Wang, H.S. Fan, C.C. Chang, C.H. Wang // J. Invertebr. Pathol. – 2009. – V. 100, № 2. – P. 85-93.
443. Tsaousis, A.D. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi* / A.D. Tsaousis, E.R. Kunji, A.V. Goldberg, J.M. Lucocq, R.P. Hirt, T.M. Embley // Nature. – 2008. – V. 453, № 7194. – P. 553-6.
444. Tschinkel, W.R. The fire ants./ W.R. Tschinkel // Cambridge, MA, USA and London, England: The Belknap Press of Harvard University Press, 2006. – 723 p.
445. Undeen, A.H. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa, Microspora) spores / A.H. Undeen // J. Theor. Biol. – 1990. – V. 142, № 2. – P. 223-235.

446. Undeen, A.H. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora, Nosematidae) / A.H. Undeen, L.M. Elgazzar, R.K. Vandermeer, S. Narang // J. Invertebr. Pathol. – 1987. – V. 50, № 3. – P. 230-237.
447. Undeen, A.H., Vandermeer R.K. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination / A.H. Undeen, R.K. Vandermeer // J. Invertebr. Pathol. – 1999. – V. 73, № 3. – P. 294-302.
448. Undeen, A.H., Vandermeer R.K. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista, Microspora) spores - a quantitative study / A.H. Undeen, R.K. Vandermeer // J. Eukaryot. Microbiol. – 1994. – V. 41, № 2. – P. 129-132.
449. Van de Peer, Y. Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi / Y. Van de Peer, A. Ben Ali, A. Meyer // Gene. – 2000. – V. 246, № 1-2. – P. 1-8.
450. Vandermeer J.W., Gochnauer T.A. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis* / J.W. Vandermeer, T.A. Gochnauer // J. Invertebr. Pathol. – 1971. – V. 17, № 1. – P. 38-41.
451. Vávra, J., Larsson J.I.R. *Berwaldia schaefernai* (Jírovec, 1937) comb. n. (Protozoa, Microsporida), fine structure, life cycle, and relationship to *Berwaldia singularis* Larsson, 1981 / J. Vávra, J.I.R. Larsson // Europ. J. Protistol. – 1994. – V. 30, № 1. – P. 45-54.
452. Vávra, J., Larsson J.I.R. Structure of Microsporidia // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition. – 2014. – P. 1-70.
453. Vávra, J., Larsson J.I.R. Structure of the Microsporidia / J. Vávra, J.I.R. Larsson // The Microsporidia and Microsporidiosis / Washington D.C.: American Society for Microbiology, –1999. – P. 7-84.
454. Vávra, J., Lukeš J. Microsporidia and 'the art of living together' / J. Vávra, J. Lukeš // Advances in Parasitology. – 2013. – V. 82. – P. 253-319.
455. Vavra, J., Maddox J.V. Methods in microsporidiology / J. Vavra, J.V. Maddox // Comparative Pathobiology / Bulla L. A., Jr., Cheng T. C. – New York: Plenum Press, 1976. – P. 281-318.
456. Visvesvara, G.S., Moura H., Leitch G.J., Schwarz D.A. Culture and propagation of microsporidia / G.S. Visvesvara, H. Moura, G.J. Leitch, D.A. Schwarz // The microsporidia and microsporidiosis. – Washington, D.C.: ASM Press. – 1999. – P. 363-393.

457. Vivier, E. Étude, au microscope électronique, de la spore de *Metchnikovella hovassei* n. sp. : appartenance des Metchnikovellidae aux Microsporidies / E. Vivier // C. R. Soc. Biol. – 1965. – V. 260. – P. 6982-6984.
458. Vivier, E. The Microsporidia of the Protozoa / E. Vivier // Protistologica. – 1975. – V. 11, № 3. – P. 345-361.
459. Vossbrinck, C.R. Verification of intermediate hosts in the life cycles of microsporidia by small subunit rDNA sequencing / C.R. Vossbrinck, T.G. Andreadis, B.A. Debrunner-Vossbrinck // J. Eukaryot. Microbiol. – 1998. – V. 45, № 3. – P. 290-292.
460. Vossbrinck, C. R. Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic microsporidia (Microsporidia : Amblyosporidae) / C.R. Vossbrinck, T.G. Andreadis, J. Vavra, J.J. Becnel // J. Eukaryot. Microbiol. – 2004. – V. 51, № 1. – P. 88-95.
461. Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck B.A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations / C.R. Vossbrinck, B.A. Debrunner-Vossbrinck // Folia Parasitologica. – 2005. – V. 52, № 1-2. – P. 131-142.
462. Vossbrinck, C.R. Ribosomal-RNA sequence suggests Microsporidia are extremely ancient eukaryotes / C.R. Vossbrinck, J.V. Maddox, S. Friedman, B.A. Debrunner-Vossbrinck, C.R. Woese // Nature. – 1987. – V. 326, № 6111. – P. 411-414.
463. Vossbrinck, C.R., Woese C.R. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8s RNA / C.R. Vossbrinck, Woese C.R. // Nature. – 1986. – V. 320, № 6059. – P. 287-288.
464. Wang, J.Y. Interactions microsporidies – insects in vivo: dissimulation de *Nosema bombycis* (Microsporidia) dans son hôte *Bombyx mori* (Lepidoptera) et caractérisation de protéines structurales majeures de *N. bombycis* impliquées dans l'invasion / J.Y. Wang // PhD dissertation – № NNT: 2007 CLF 21736; Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II and Université D'Auvergne, Clermont-Ferrand I – 2012. – url: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00717814>.
465. Wang, T.C. A new microsporidium, *Triwangia caridinae* gen. nov., sp. nov. parasitizing fresh water shrimp, *Caridina formosae* (Decapoda: Atyidae) in Taiwan / T.C. Wang, Y.S. Nai, C.Y. Wang, L.F. Solter, H.C. Hsu, C.H. Wang, C.F. Lo // J. Invertebr. Pathol. – 2013. – V. 112, № 3. – P. 281-293.
466. Wang W., Chen J. Ultrastructural study on a novel microsporidian, *Endoreticulatus eriocheir* sp. nov. (Microsporidia, Encephalitozoonidae), parasite of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda) / W. Wang, J. Chen // J. Invertebr. Pathol. – 2007. – V. 94, № 2. – P. 77-83.

467. Weber, R. Laboratory diagnosis of microsporidiosis / R.Weber, D.A. Schwartz, P. Deplazes // In: The Microsporidia and Microsporidiosis. – Washington D.C.: American Society for Microbiology. – 1999. – P. 315-362.
468. Weidner, E.H. Microsporidian spore/sporoplasm dynactin in *Spraguea* / E.H. Weidner, J. Sokolova, J. Lynn // Mol. Biol. Cell. – 2001. – V. 12. – P. 167A-168A.
469. Weidner, E., Byrd W. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge / E. Weidner, W. Byrd // J. Cell. Biol. – 1982. – V. 93, № 3. – P. 970-975.
470. Weidner, E. Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane / E. Weidner, W. Byrd, A. Scarborough, J. Pleshinger, D. Sibley // J. Protozool. – 1984. – V. 31, № 2. – P. 195-198.
471. Weidner, E. Microsporidian biochemistry and physiology / E. Weidner, A.M. Findley, V.V. Dolgikh, Y. Sokolova // The Microsporidia and Microsporidiosis / Washington D.C.: American Society for Microbiology. – 1999. – P. 172-196.
472. Weidner, E., Halonen S.K. Microsporidian spore envelope keratins phosphorilate and disassemble during spore activation / E. Weidner, S.K. Halonen // J. Eukaryot. Microbiol. – 1993. – V. 40, № 6. – P. 783-788.
473. Weidner, E. Protein-membrane interactions is essential to normal assembly of the microsporidian spore invasion tube / E. Weidner, S.B. Manale, S.K. Halonen, J.W. Lynn // Biol. Bull. – 1995. – V. 188, № 2. – P. 128-135.
474. Weidner, E., Trager W. Adenosine-triphosphate in extracellular survival of an intracellular parasite (*Nosema michaelis*, Microsporida) / E. Weidner, W. Trager // J. Cell Biol. – 1973. – V. 57, № 2. – P. 586-591.
475. Weiss, L.M. Clinical Syndromes Associated with Microsporidiosis / L.M. Weiss // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition. – Oxford: Wiley Blackwell. – 2014. – P. 371-401.
476. Williams, B.A.P. localization patterns of two putative mitochondrial proteins in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* / B.A.P.Williams, A. Cali, P.M. Takvorian, P.J. Keeling // J. Eukaryot. Microbiol. – 2008. – V. 55, № 2. – P. 131-133.
477. Williams, B.A.P. Microsporidian biochemistry and physiology / Williams B.A.P., Dolgikh V.V., Sokolova Y.Y. // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition / Weiss L. M., Becnel J. J. – Oxford: Wiley Blackwell, 2014. – P. 245-260.
478. Williams, B.A.P. A broad distribution of the alternative oxidase in microsporidian parasites / B.A.P. Williams, C. Elliot, L. Burri, Y. Kido, K. Kita, A.L. Moore, P.J. Keeling // PLoS Pathogens. – 2010. – V. 6, № 2. – doi: 10.1371/journal.ppat.1000761.

479. Williams, B.A.P., Keeling P.J. Microsporidian mitochondrial proteins: expression in *Antonospora locustae* spores and identification of genes coding for two further proteins / B.A.P. Williams, P.J. Keeling // J. Eukaryot. Microbiol. – 2005. – V. 52, № 3. – P. 271-276.
480. Williams, B.A.P. A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes / B.A.P. Williams, C.H. Slamovits, N.J. Patron, N.M. Fast, P.J. Keeling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – V. 102, № 31. – P. 10936-10941.
481. Williams, B.A., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis* / B.A. Williams, R.P. Hirt, J.M. Lucocq, T.M. Embley // Nature. – 2002. – V. 418, № 6900. – P. 865-869.
482. Xiao, L.H., Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health / L.H. Xiao, I.M. Sulaiman, U.M. Ryan, L. Zhou, E.R. Atwill, M.L. Tischler, X.C. Zhang, R. Fayer // Intern. J. Parasitol. – 2002. – V. 32, № 14. – P. 1773-1785.
483. Xu, Y. Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi* / Y.Xu , P. Takvorian, A. Cali, F. Wang, H. Zhang, G. Orr, L.M. Weiss // Infection and Immunity. – 2006. – V. 74, № 1. – P. 239-247.
484. Xu, Y. Lectin binding of the major polar tube protein (PTP1) and its role in invasion / Y. Xu., P. Takvorian, A. Cali, L.M. Weiss // J. Eukaryot. Microbiol. – 2003. – V. 50 Suppl. – P. 600-601.

### Список использованных сокращений

Большинство ниже приведенных сокращений, за исключением наиболее широко распространенных, расшифровываются в тексте при первом упоминании, однако для удобства чтения они также приведены ниже в списке.

**АГ**, аппарат Гольджи; **АТФ**, аденозинтрифосфорная кислота; **АЭ**, аппарат экструзии споры; **ВК**, везикулярный кластер(ы), **АГ меронтов**; **БСрРНК**, LSUrRNA, малая субъединица рибосомальной РНК; **ДСН-ПАГЭ**, одномерный электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; **К3, К4**, и т.д., каспаза 3, 4, и т.д.; **КТ**, комнатная температура; **МСрРНК**, SSUrRNA, малая субъединица рибосомальной РНК; **ОТ-кПЦ**, количественный ПЦР в реальном времени с реакцией обратной транскрипции; **ПМ**, плазматическая мембрана; **ПТ**, полярная трубка; **рРНК**, рибосомальная РНК; **СК**, синаптомембранные комплексы; **СЭМ**, сканирующая электронная микроскопия; **ТК**, тубулярный кластер(ы), **АГ споронтов**; **ТСБ**, трис-солевой буфер; **ТТСБ**, трис солевой буфер с Tween-20; **ТЭМ**, трансмиссионная электронная микроскопия; **ЭМ**, электронная микроскопия; **ЭР**, эндоплазматический ретикулум; **ARM**, филогенетическая клада Aphelidea-Rozellomycota-Microsporidia; **АТСС**, American Type Culture Collection, Американская коллекция клеточных культур; **СОР1**, белки-коатомеры комплекса 1; **СОР2**, белки-коатомеры комплекса 2; **DAPI**, 4',6-diamidino-2-phenylindole, **ДАПИ**, ядерный флуоресцентный краситель; **EMS**, Electron Microscopy Sciences, USA, основной поставщик реактивов для ЭМ; **IFA**, immunofluorescent assay, **ИФА**, иммуно-флуоресцентный анализ; **ITS**, internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спэйсер, участок гена РНК; **MIN**, Multilayered Interlaced Network, многослойная переплетающаяся сеть, **АГ спопроплазм**; **NEM**, N-ethylmaleimide, фактор, блокирующий слияние везикул; **PBS**, phosphate buffer saline, Натрий-фосфатный буфер; **RPB1**, DNA-directed RNA polymerase II subunit rpb1, ДНК-зависимая, РНК полимеразы 2, **SNARE**, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor, комплекс белков, опосредующих слияние везикул с целевым компартментом; **TMR**, tetramethylrhodamine, флуоресцентный краситель; **TUNEL**, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, метод мечения разрывов ДНК при апоптозе.

## **Благодарности и источники финансирования**

Автор выражает огромную благодарность всем коллегам и соавторам за помощь в экспериментальной работе и плодотворные дискуссии. В первую очередь, я хочу поблагодарить Ирму Викторовну Исси за советы, личный пример и поддержку на всех этапах моей карьеры, за тщательный и критический анализ первого варианта диссертационной работы. Я благодарна моим коллегам и соавторам из Лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР, в особенности, Вячеславу В. Долгих, Елене С. Насоновой (сейчас сотрудник ИНЦ РАН) и Юрию С. Токареву, а также сотрудникам Группы по изучению клеточных мембран Института цитологии РАН, Екатерине Сергеевне Снигиревской и Яну Юдовичу Комиссарчику, и, конечно, всем без исключения сотрудникам Лаборатории цитологии одноклеточных организмов за поддержку и помощь. Специально мне хочется поблагодарить моего Научного консультанта Сергея Орестовича Скарлато за ценные советы по обобщению, написанию и представлению материалов моей работы к защите. Из зарубежных коллег, я особенно признательна Александру Миронову и Галине Безноуссенко (Alexander Mironov и Galina Besnoussenko, Италия), Рольфу Энцекроту (Rolf Entzeroth, Германия), Джиму Фуксе (Jim Fuxa, США) и Лиз Дидье (Elizabeth Didier, США), в лабораториях которых мне посчастливилось работать, а также Карлосу Ланге (Carlos Lange, Аргентина), и Джоржу Кйеи-Поку (George Kyei-Poku, Канада).

Исследования, обобщенные в диссертации были поддержаны грантами следующих фондов: Российским Фондом Фундаментальных Исследований (РФФИ); Государственной программой «Интеграция»; «International Association formed by the European Community to preserve and promote the valuable scientific potential of the NIS partner countries (INTAS); «Independent nonprofit organization that promotes safety, security, and sustainability through science and innovation» (CRDF); National Institute of Health (NIH); National Science Foundation (NSF); Discover Life in America (DLIA)

# **ПРИЛОЖЕНИЯ**

## Приложение 1:

### СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования*

1. Видтман, С.С. Описание нового рода *Larssonia* на основании ультраструктурного анализа *Microsporidium (Pleistophora) obtusa* Moniez, 1887 из *Daphnia pulex* (Cladocera) / С.С. Видтман, **Ю.Я. Соколова** // Паразитология. – 1994. – Т. 28. С. 202-314.
2. **Соколова, Ю.Я.** Микроспоридия *Nosema grylli* n.s. из сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, К.В. Селезнев, В.В. Долгих, И.В. Исси // Паразитология. – 1994. – Т. 28. – С. 488-493.
3. Видтман, С.С. Новая микроспоридия *Alfvenia ceriodaphniae* из *Ceriodaphnia reticulata* (Crustacea, Cladocera) / С.С. Видтман, **Ю.Я. Соколова** // Паразитология. – 1995. – Т. 29. – С. 214-218.
4. **Соколова, Ю.Я.** О роде *Nosema* (Microsporidia) в связи с новыми данными по жизненному циклу *Nosema mesnili* Paillot (1933) (Microsporidia, Nosematida) / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. – 1997. – Т. 31. – С. 307-313.
5. Исси, И.В. Микроспоридиоз красногрудой пьявицы *Oulema melanopus* (Coleoptera) / И.В. Исси, Е.В. Моржина, С.В. Крылова, **Ю.Я. Соколова** // Паразитология. – 1998. – Т. 32. – С.275-279.
6. **Соколова, Ю.Я.,** Насонова Е.С., Сомова Н.В., Скарлато С.О. 1998. Ультраструктура ядерного аппарата и электрофоретический кариотип микроспоридии *Nosema grylli* – внутриклеточного паразита сверчка *Gryllus bimaculatus*/ Ю.Я. Соколова, Е.С. Насонова, Н.В. Сомова, С.О. Скарлато // Цитология. – 1998. – Т. 40. – С.407-415.
7. **Соколова, Ю.Я.** Подавление эстеразной активности как особенность патогенеза микроспоридиоза сверчка *Gryllus bimaculatus*/ Ю.Я. Соколова, О.В. Сундуков // Паразитология. – 1999. – Т. 33. – С.527-535
8. **Соколова, Ю.Я.** Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в контроле и при остром микроспоридиозе, вызванном *Nosema grylli* / Ю. Соколова, Ю. Токарев, Я. Лозинская, В. Глупов // Паразитология. – 2000. – Т. 34. – 534-543
9. Исси, И.В. О паразитофорной вакуоли микроспоридий / И.В. Исси, **Ю.Я. Соколова**, В.Н. Воронин // Паразитология. – 2001. – Т. 35. – С. 45-59.
10. **Соколова, Ю.Я.** Необычная организация аппарата Гольджи на пролиферативных стадиях жизненного цикла микроспориций / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снегиревская, С.О. Скарлато, Я.Ю. Комиссарчик, А.А. Миронов // Доклады Академии Наук, Биология. – 2001. – Т. 378. – С. 403-406.
11. Крюкова, Н.А. Микроспоридиоз личинок стрекоз *Aeshna viridis* (Odonata: Aeshnidae) вызываемый *Systemostrema alba* Larsson, 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) / Н.А. Крюкова, **Ю.Я. Соколова**, В.В. Глупов // Паразитология. – 2006. – Т. 40. – С. 66-73.
12. Снегиревская, Е.С. Структурно-функциональная организация аппарата Гольджи / Е.С. Снегиревская, **Ю.Я. Соколова**, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2006. – Т. 48. – С. 57-81.
13. **Соколова, Ю.Я.** Аппарат Гольджи паразитических простейших (обзор литературы) / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снегиревская, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2007. – Т. 49. – С. 163-181
14. **Соколова, Ю.Я.** Происхождение микроспориций и их положение в системе эукариот / Ю.Я. Соколова // Микология и Фитопатология. – 2009. – Т. 43. – С. 177-192.
15. Соколова, О.И. Опыт использования технологии FTA® для сбора, архивирования

и молекулярного анализа ДНК микроспоридий из клинических образцов / О.И. Соколова, А.В. Демьянов, Л.С. Боверс, Е.С. Дидье, Ю.Я. Соколова // Цитология. – 2011. – Т. 53. – С. 911-914.

16. **Sokolova, I.** Electron-microscopic and electrophoretic studies of microsporidian prespore stages isolated from infected host cells by gradient centrifugation on Percoll / I. Sokolova, K. Selesnjov, V. Dolgikh, I. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 1994. – V. 41. – P. S62-S62.

17. **Sokolova, J., Entzeroth R.** Morphological and immunological studies on microsporidia: antigene properties of *Nosema mesnili* spores / J. Sokolova, R. Entzeroth // Archiv fur Protistenkunde. – 1995. – V. 145, № 1-2. – P. 100-104.

18. Seleznev, K.V. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradienr for biochemical research / K.V. Seleznev, I.V. Issi, V.V. Dolgikh, G.B. Belostotskaya, O.A. Antonova, **J.J. Sokolova** // J. Eukaryot. Microbiol. – 1995. – V. 42, № 3. – P. 288-292.

19. Dolgikh, V.V. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian *Nosema grylli* / V.V. Dolgikh, **J.J. Sokolova**, I.V. Issi// J. Eukaryot. Microbiol. – 1997. – V. 44, № 3. – P. 246-249.

20. **Sokolova, Y.Y.** Analysis of antibodies raised against soluble and membrane bound proteins of *Nosema grylli* (Microspora) spores / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, A. Weck-Heimann., R. Entzeroth // Tsitologiya. – 2000. – V. 42, № 10. – P. 993-1003.

21. Nasonova, E.S. Phagocytosis of *Nosema grylli* (Microsporida, Nosematidae) spores in vivo and in vitro / E.S. Nasonova, Y.S. Tokarev, T. Trammer, R. Entzeroth, **Y.Y. Sokolova** // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. Supplement. – P. 83S-84S.

22. **Sokolova, Y.** Development of *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants *Solenopsis invicta* from polygynous colonies results in formation of three spore types / Y. Sokolova, J. Fuxa, // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. Supplement. – P. 85S.

23. **Sokolova, Y.** Visualization of early Golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli* / Y. Sokolova, E. Snigirevskaya, E. Morzhina, S. Skarlato, A. Mironov, Y. Komissarchik // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. – Supplement. – P. 86S-87S.

24. **Sokolova, Y.** An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). / Y. Sokolova, C. Lange // Acta Protozoologica. – 2002. – V. 41. – P. 229-237.

25. **Sokolova, Y.Y.** Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* gen. nov., comb. nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, E.V. Morzhina, E.S. Nasonova, I.V. Issi, et al. // J. Invertebr. Pathol. – 2003. – V. 84, № 3. – P. 159-172.

26. **Sokolova, Y.Y.** PCR-based analysis of spores isolated from smears by laser pressure catapult microdissection confirms genetic identity of spore morphotypes of the microsporidian *Thelohania solenopsae* / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R.Fuxa // J. Eukaryot. Microbil. – 2003. – V. 50. – P. 584-585.

27. **Sokolova, Y.Y.** The microsporidium *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) from Louisiana pastures / Y.Y. Sokolova, R.L. Bossard, J.R. Fuxa, D.W. Sanson, L.D. Foil // Southwest. Entomol. – 2004. – V. 29. – P. 271-276.

28. **Sokolova, Y.Y.** Spore morphotypes of *Thelohania solenopsae* (microsporidia) described microscopically and confirmed by PCR of individual spores microdissected from smears by position ablative laser microbeam microscopy / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R. Fuxa, S.B. Vinson // Microbiology. – 2004. – V. 150. – P. 1261-1270.

29. Milks, M.L. Comparative effectiveness of light-microscopic techniques and PCR in detecting *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) infections in red imported fire ants

- (*Solenopsis invicta*) / M.L. Milks, **Y.Y. Sokolova**, I.A. Isakova, J.R. Fuxa, F. Mitchell, K.F. Snowden, S.B. Vinson // J. Eukaryot. Microbiol. – 2004. – V. 51. – P. 187-191.
30. Chen, J.S.C. Sources of spores for the possible horizontal transmission of *Thelohania solenopsae* (Microspora: Thelohaniidae) in the red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / J.S. Chen, K. Snowden, F. Mitchell, **J. Sokolova**, J. Fuxa, S.B. Vinson // J. Invertebr. Pathol. – 2004. – V. 85. – P. 139-145.
31. **Sokolova, Y.Y.** Identification of Microsporidia infections in nature: Light microscopy or PCR? / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, J.R. Fuxa // Protistology. – 2004. – V. 3, № 4. – P. 273-281.
32. Fuxa, J.R. Interaction of an entomopathogen with an insect social form: an epizootic of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) in a population of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* / J.R. Fuxa, M.L. Milks, **Y.Y. Sokolova**, A.R. Richter // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 88, № 1. – P. 79-82.
33. Fuxa, J.R. Prevalence, spread, and effects of the microsporidium *Thelohania solenopsae* released into populations with different social forms of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) / J.R. Fuxa, **Y.Y. Sokolova**, M.L. Milks, A.R. Richter, D.F. Williams, D.H. Oi // Environ. Entomol. – 2005. – V. 34, № 5. – P. 1139-1149.
34. **Sokolova, Y.Y.** The nature of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) cysts in abdomens of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa, O.N. Borkhsenius // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 90, № 1. – P. 24-31.
35. **Sokolova, Y.Y.** Ultrastructural analysis supports transferring *Nosema whitei* Weiser 1953 to the genus *Paranosema* and creation a new combination, *Paranosema whitei* / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, E.V. Morzhina, Y.S. Tokarev, C.R. Vossbrinck // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 90. – P. 122-126.
36. **Sokolova, Y.Y.** *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) in the dragonfly *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae) from South Siberia: morphology and molecular characterization / Y. Sokolova, N. Kryukova, V. Glupov, J. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – V. 53, № 1. – P. 49-57.
37. **Sokolova, Y.Y.** Development, ultrastructure, natural occurrence, and molecular characterization of *Liebermannia patagonica* n. g., n. sp., a microsporidian parasite of the grasshopper *Tristira magellanica* (Orthoptera: Tristiridae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2006. – V. 91, № 3. – P. 168-182.
38. Tokarev, Y.S. Melanization enhances teratospore formation in microsporidia-infected tissues of *Locusta migratoria* and *Gryllus bimaculatus* (Insecta, Orthoptera) / Y.S. Tokarev, **Y.Y. Sokolova**, R. Entzeroth // J. Invertebr. Pathol. – 2007. – V. 9. – P. 70-73.
39. Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function / G.V. Beznoussenko, V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D. Di Giandomenico, P. Auinger, I.V. Senderskiy, S.O. Skarlato, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, **Y.Y. Sokolova**, and A.A. Mironov // J. Cell Sci. – 2007. – V. 120. – P. 1288-1298.
40. **Sokolova, Y.Y.** Establishment of *Liebermannia dichroplusae* n. comb on the basis of molecular characterization of *Perezia dichroplusae* Lange, 1987 (Microsporidia) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2007. – V. 54, № 3. – P. 223-230.
41. **Sokolova, Y.Y.** Phylogenetic relationships of *Heterovesicula cowani*, a microsporidian pathogen of Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera : Tettigoniidae), based on SSU rDNA-sequence analyses / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2008. – V. 99, № 1. – P. 112-116.
42. **Sokolova, Y.Y.** Biology and life-cycle of the microsporidium *Kneallhazia solenopsae* Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., from the fire ant *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa // Parasitology. – 2008. – V. 135, № 8. – P. 903-929.
43. **Sokolova, Y.Y.** Morphology and taxonomy of the microsporidium *Liebermannia*

*covasacrae* n. sp from the grasshopper *Covasacris pallidinota* (Orthoptera, Acrididae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, Y. Mariottini, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2009. – V. 101, № 1. – P. 34-42.

44. **Sokolova, Y.Y.** Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010. – V. 103, № 1. – P. 71-73.

45. **Sokolova, Y.Y.** New microsporidia parasitizing bark lice (Insecta: Psocoptera) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010. – V. 104, № 3. – P. 186-194.

46. Sokolova, O.I. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients / O.I. Sokolova, A.V. Demyanov, B.L. Cowers, E.S. Didier, A.V. Yakovlev, S.O. Skarlato, **Y.Y. Sokolova** // J. Clin. Microbiol. – 2011. – V. 49, № 6. – P. 2102-2108.

47. **Sokolova, Y.Y.** Fine structure of *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914 (microsporidia), a hyperparasite of gregarines *Polyrhabdina* sp from the polychaete *Pygospio elegans* / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nassonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2013. – V. 140, № 7. – P. 855-867.

48. **Sokolova, Y.Y.** Description of *Metchnikovella spiralis* sp n. (Microsporidia: Metchnikovellidae), with notes on the ultrastructure of metchnikovellids / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nassonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2014. – V. 141, № 8. – P. 1108-1122.

49. **Sokolova, Y.Y.** Morphology and phylogeny of *Agmasoma penaei* (Microsporidia) from the type host, *Litopenaeus setiferus*, and the type locality, Louisiana, USA / Y. Sokolova, A. Pelin, J. Hawke, N. Corradi // Intern. J. Parasitol. – 2015. – V. 45, № 1. – P. 1-16.

50. Rotari, Y.M. Diversity of metchnikovellids (Metchnikovellidae, Rudimicrosporea), hyperparasites of bristle worms (Annelida, Polychaeta) from the White Sea // Y.M. Rotari, G.G. Paskerova, **Y.Y. Sokolova** / Protistology. – 2015. – V. 9. – P. 50-59.

51. **Sokolova, Y.Y.** Perspectives of microsporidia as human pathogens: clues from invertebrate research (minireview) / Y.Y. Sokolova // Protistology. – 2015. – V. 9, № 3/4. – P. 117-126.

52. **Sokolova, Y.Y.** Establishing a New Species *Encephalitozoon pogonae* for the Microsporidian Parasite of Inland Bearded Dragon *Pogona vitticeps* Ahl 1927 (Reptilia, Squamata, Agamidae) / Y.Y. Sokolova, K. Sakaguchi, D.B. Paulsen // J. Eukaryot. Microbiol. – 2016. – V. 63, № 4. – P. 524-535.

53. Stentiford, G. Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain / G. Stentiford, J. Becnel, L. Weiss, P. Keeling, E. Didier S. B. Williams, S. Bjornson, M. Kent, M. Freeman, M. Brown, E. Troemel, K. Roesel, **Y. Sokolova**, K. Snowden, L. Solter // Trends Parasitol. – 2016. – V. 32, № 4. – P. 336-348.

54. **Sokolova, Y.Y.** Microsporidia *Alfvenia sibirica* sp n. and *Agglomerata cladocera* (Pfeiffer) 1895, from Siberian microcrustaceans and phylogenetic relationships within the "Aquatic outgroup" lineage of fresh water microsporidia / Y.Y. Sokolova, I.V. Senderskiy, Y.S. Tokarev // J. Invertebr. Pathol. – 2016. – V. 136. – P. 81-91.

55. **Sokolova, Y.Y.** *Perezia nelsoni* (Microsporidia) in *Agmasoma penaei* infected Atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Penaeidae, Decapoda) and phylogenetic analysis of *Perezia* spp. complex / Y.Y. Sokolova, J. Hawke // Protistology. – 2016. – V. 10, № 3. – P. 67-78.

56. Kyei-Poku, G. The microsporidium *Nosema distriiae* (Thomson 1959): Fine structure and phylogenetic position within the *N. bombycis* clade / G. Kyei-Poku, **Y.Y. Sokolova** // J. Invertebr. Pathol. – 2017. – V. 143. – P. 90-103.

57. Tokarev, Y.S. Molecular and morphological characterization of *Anncaliia azovica* sp n. (Microsporidia) infecting *Niphargogammarus intermedius* (Crustacea, Amphipoda) from the Azov Sea / Y.S. Tokarev, **Y.Y. Sokolova**, A.A. Vasilieva, I.V. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – V. 65, № 3. – P. 296-307.

58. Temereva, E.N. A Microsporidian Infection in Phoronids (Phylum Phoronida): *Microsporidium phoronidi* n. sp from a *Phoronis embryolabi* / E.N. Temereva, **Y.Y. Sokolova** // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2018. – V. 65, № 3. – P. 427-431.

59. Lange, C.E. The development of the microsporidium *Paranosema (Nosema) locustae* for grasshopper control: John Henry's innovation with worldwide lasting impacts / C.E. Lange, **Y.Y. Sokolova** // *Protistology.* – 2017. – V. 11, № 3. – P. 170-174.

60. **Sokolova, Y.Y.** Annotated list of species of the Microsporidia described in the Former Soviet Union and Russia in 20th century (1967–2000) / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, V.N. Voronin // *Protistology.* – 2018. – V. 12, № 1. – P. 12-37.

61. **Sokolova, Y.Y.,** Overstreet R.M. A new microsporidium, *Apotaspora heleios* n. g., n. sp., from the Riverine grass shrimp *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) / Y.Y. Sokolova, R.M. Overstreet // *J. Invertebr. Pathol.* – 2018. – V. 157. – P. 125-135.

62. **Sokolova, Y.Y.** *Encephalitozoon cuniculi* and *Vittaforma corneae* (Phylum Microsporidia) inhibit staurosporine-induced apoptosis in human THP-1 macrophages in vitro / Y.Y. Sokolova, L.C. Bowers, X. Alvarez and E.S. Didier // *Parasitology (Cambridge).* – 2018. – doi: 10.1017/S0031182018001968. [Epub ahead of print]

#### **Публикации в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ:**

63. Исси, И.В. Факторы патогенности микроспоридий – внутриклеточных паразитов насекомых / И.В. Исси, В.В. Долгих, **Ю.Я. Соколова**, Ю.С. Токарев // *Вестник Защиты Растений.* – 2005. – №3. – С. 16-25

64. Соколова, О.И. Микроспоридиоз у ВИЧ-инфицированных пациентов / О.И. Соколова, А.В. Демьянов, Л.С. Боверс, Е.С. Дидье, С.О. Скарлато, **Ю.Я. Соколова**, А.В. Яковлев // *ВИЧ-Инфекция и Иммуносупрессии.* – 2013. – №3. – С. 63-70.

#### **Главы в коллективных монографиях:**

65. **Соколова, Ю.Я.** Энтомопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // *Патогены насекомых: структура и функция.* – Москва: Круглый год, 2001. – С. 76-188.

66. **Sokolova, Y.Y.** Structure and function of the Golgi organelle in parasitic protists / Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov // in: *The Golgi Apparatus. State of art 110 years after Camillo Golgi's discovery.* – 2008. – Springer. – P. 647-675.

67. Weidner, E. Microsporidian biochemistry and physiology / E. Weidner, A.M. Findley, V.V. Dolgikh, **J. Sokolova** // *The Microsporidia and Microsporidiosis / Washington B. C.: American Society for Microbiology.* – 1999. – P. 172-196.

68. Williams, B.A.P. Microsporidian biochemistry and physiology / Williams B.A.P., Dolgikh V.V., **Sokolova Y.Y.** // *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition / Weiss L. M., Becnel J. J.* – Oxford: Wiley Blackwell, 2014. – P. 245-260.

#### **Презентации на конференциях**

1. IX Intern. Congr. Protozool. Berlin, July, 1993. **Sokolova J.,** Issi I., Entzeroth R., 1993. One more "*Nosema*" with two types of sporogony (poster).

2. IV Intern. Workshops on Opportunistic Protists, Clievlend 1994. **Sokolova J.,** Selesnjov K., Dolgikh V., Issi I., 1994. Electron-microscopic and electrophoretic studies of microsporidian prespore stages, isolated from infected host cells by gradient centrifugation on Percoll (talk)

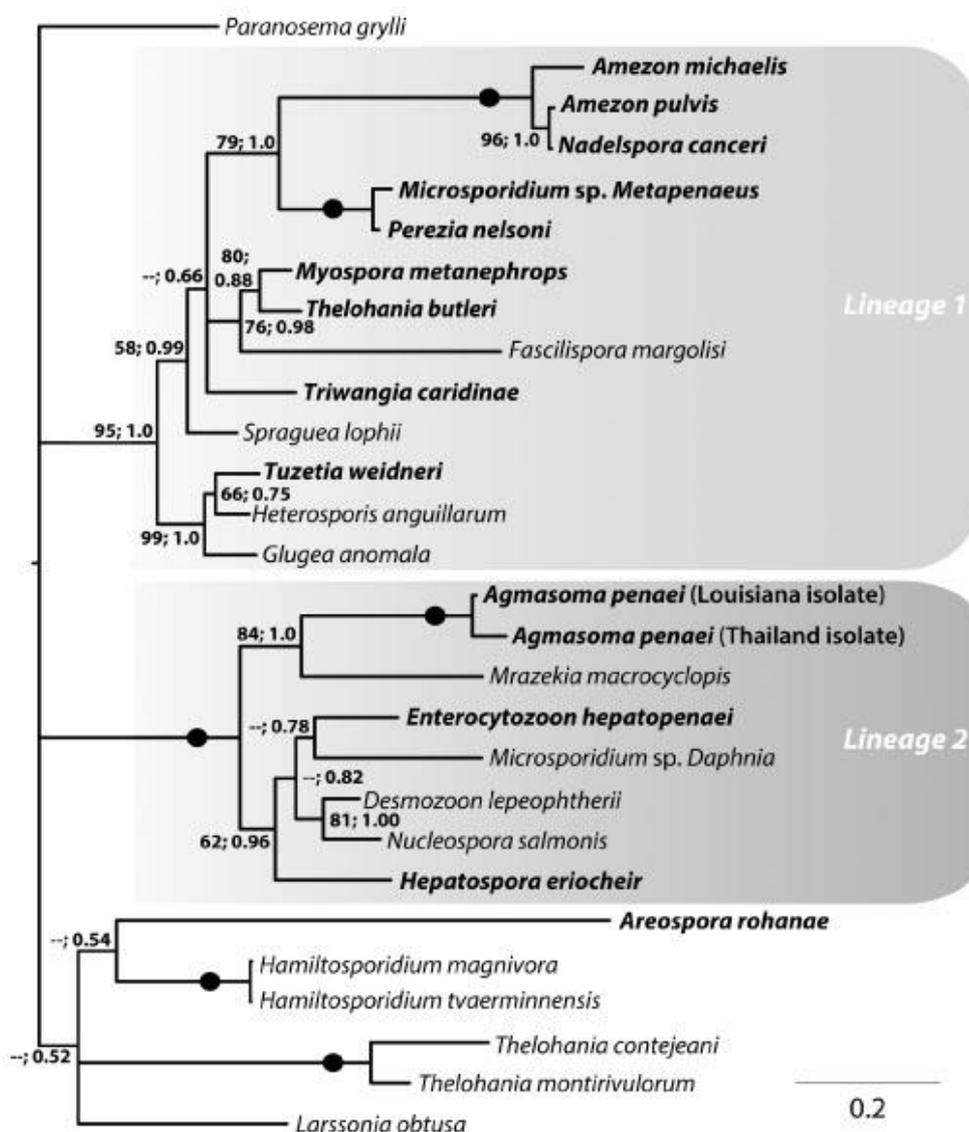
3. Всероссийский симпозиум «Клеточная биология на рубеже 21-го века», 17-19 октября 2000 г. С.Петербург. Соколова Ю.Я., Снигиревская Е.С., Насонова Е.С.,

- Скарлато С.О., Комиссарчик Я.Ю. Структурные и функциональные элементы аппарата Гольджи локализуются в перинуклеарной области микроспоридии *Nosema grylli* на ранних стадиях внктриклеточного развития *Tsitologiya*. 395 -396. (poster)
4. 7th Intern. Workshops on Opportunistic Protists, Ohio June13-16, 2001. **Sokolova Y.**, Fuxa J. Development of *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants *Solenopsis invicta* from polygynous colonies results in formation of three spore types (poster).
  5. XI International Congress of Protozoology ICOP XI, Salzburg, Austria, July 15-19, 2001. **Sokolova Y. Y.**, Snigirevskaya E. S., Morzhina E. V., Skarlato S. O., Komissarchik Y.Y., 2001. Organization of the Golgi compartment at early (proliferate) stages of a microsporidian *Nosema grylli* (poster)
  6. Imported Fire Ant Conference March 24-26, 2002. Athens Georgia. **Sokolova, Y.**, Isakova, I., Fuxa, J. Comparative diagnosis of microsporidian infections in fire ant colonies by light microscopy techniques (Giemsa, Calcofluor and Trichrome Stains) and by PCR. Proceedings, 85-90. (poster)
  7. 8th International Workshop on opportunistic Protists, Hawaii, Hilo July 25-29 2003. **Sokolova Y.Y.**, McNally L. R, Fuxa J.R. PCR-based analysis of spores isolated from smears by Laser Pressure Catapult microdissection techniques (LPC) confirms genetic identity of three morphotypes of *Thelohania solenopsae*. (poster)
  8. Imported Fire Ant Conference Baton Rouge, Louisiana. March 21-23, 2004. **Sokolova Y.Y.**, McNally L. R, Fuxa J.R. PCR-based analysis of *Thelohania solenopsae* spores isolated from smears by Laser Pressure Catapult microdissection techniques. (poster)
  9. Emergent pathogens in the 21st Century: 1-st United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate hosts. Czech Republic, Ceske Budejovice, July 12-15, 2004. **Sokolova Y.Y.**, Fuxa J.R. Fine structure of *Thelohania solenopsae* from *Solenopsis invicta* with reference to the microsporidium life cycle (poster).
  10. Emergent pathogens in the 21st Century: 1-st United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate hosts. Czech Republic, Ceske Budejovice, July 12-15, 2004. Structural organization of Golgi compartment in microsporidia. **Sokolova Y.Y.**, Snigirevskaya E.S., Svezhova N.V., Dolgikh V.V., Skarlato S.O., Mironov A.A. & Komissarchik Y.Y. (talk)
  11. 37th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Helsinki, Finland, August 1-6, 2004. Comparative ultrastructural analysis of three species of the genus *Paranosema* from Orthoptera and Coleoptera. **Sokolova Y.Y.**, Issi I.V., Tokarev Y. S., Morzhina E. V., and Lange C.E. (poster).
  12. 37th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Helsinki, Finland, August 1-6, 2004. **Sokolova Y.**, Fuxa J. Structure and development of *Thelohania solenopsae* in fire ants (talk).
  13. 52nd Annual Meeting of the Entomological Society of America, Salt Lake City, Utah, November 14-17, 2004. **Sokolova Y.**, Fuxa J., Borkchsenius O. Further studies on life history of *Thelohania solenopsae*: the nature of cysts produced in abdomens of infected fire ants *Solenopsis invicta*. (poster)
  14. Зоологические культуры и биологические ресурсы. Московская Сельскохозяйственная Академия и Московский Зоопарк, 04-06 февраля, 2004. **Соколова Ю.Я.**, Семенов П.Б., Токарев Ю.С., Березин М.В. Протистные инфекции *Gryllus bimaculatus* and *Locusta migratoria* при лабораторном разведении. Сборник докладов концернции. 2005. Под ред Рожнова и др. Москва, Московская Сельхоз. Акадкмия. стр 135-136) (приглашенный доклад)
  15. 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Anchorage, Alaska 7-11 August, 2005. **Sokolova Y. Y.**, Lange C., Tokarev Y., Fuxa J. Do *Johenrea locustae* and *Paranosema locustae* represent two different developments of the same species? (talk) Abstract book. P 41(talk)
  16. 38th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Anchorage, Alaska 7-11 August, 2005. Fuxa J., Milks M., **Sokolova Y.**, Richter A. Epizootiology of *Thelohania*

- solenopsae* in the red imported fire ant, with emphasis on social form of the host. (talk) Abstract book. P 88 (talk)
17. V European Congress of Protistology, July 23-27, 2007, St. Petersburg, Russia. Demyanov A.V., Sokolova O.I., Cama V.A., Yakovlev A.A., Xiao L., **Sokolova Y.Y.**, Skarlato S.O. Occurrence of Microsporidia and Cryptosporidia in stool samples from HIV positive patients with chronic diarrhea in Botkin City Hospital (St. Petersburg, Russia). (poster) Protistology: 5(1): 21.
  18. V European Congress of Protistology, July 23-27, 2007, St. Petersburg, Russia. Fuxa J.R., Milks M.L., **Sokolova Y.Y.**, Richter A.R. Epizootology of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) in the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. (talk) Protistology: 5(1): 32 (talk)
  19. V European Congress of Protistology, July 23-27, 2007, St. Petersburg, Russia. **Sokolova Y.Y.**, Tetz V.V. Effect of “Micobactovir”, a new broad-spectrum fungicide, on *Encephalitozoon cuniculi* replication in vitro. (poster) Protistology: 5(1):76 (poster)
  20. V European Congress of Protistology, July 23-27, 2007, St. Petersburg, Russia. **Sokolova Y.Y.**, Fuxa J.R. Social parasitism in microsporidia: *Thelohania solenopsae* development in colonies of the fire ant, *Solenopsis invicta*. (talk) Protistology: 5(1):76 (talk)
  21. X International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-10) May 28-31, Boston Massachusetts, USA. **Sokolova Y.Y.**, Sokolov I.M., Carlton C.E. New microsporidia-insect host association: four new species of microsporidia parasitizing bark lice (Psocoptera). Program and Abstracts, p. 86-87. (poster)
  22. 57th ASTMH Annual Meeting December 7-11, 2008, New Orleans, Louisiana USA. Bowers L.C., Rasmussen T.A., Thompson T., **Sokolova Y.Y.**, Didier E.S. Accelerated loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* (Phylum Microsporidia). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2008 79(6), Suppl. (Abstract book): 135-136. (poster)
  23. The 96th meeting of the American Association of Immunologists. May 8-12 2009 Seattle, Washington. **Sokolova Y.Y.**, Bowers L.C., Alvarez X., Didier E.S. *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) suppress apoptosis in human macrophages. (poster)
  24. 42nd Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Park City, Utah, 16-20 August, 2009. **Sokolova Y.Y.**, Fuxa J.R. Social parasitism of *Kneallhazia solenopsae* in colonies of fire ants. (invited talk, Symposium “Microsporidia of Beneficial Arthropods).
  25. 42nd Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Park City, Utah, 16-20 August, 2009. **Sokolova Y.Y.**, Sokolov I.M., Carlton C.E. New species of microsporidia parasitizing bark lice (Psocoptera). (poster)
  26. International Workshops on Opportunistic Protists IWOP 12. Tarrytown, New York. August 5 -9, 2012. **Sokolova Y.Y.** and Hawke. J.P. Molecular and Morphological characterization of *Agmasoma penaei* parasitizing *Litopenaeus setiferus* from the Gulf of Mexico, and analysis of microsporidian diversity in marine decapods inferred from SSUrDNA phylogenies. Program and Abstracts, p. 107. (poster)
  27. International Workshops on Opportunistic Protists IWOP 12. Tarrytown, New York. August 5 -9, 2012. Sokolova O.I., Demyanov A.V., Dedov V.F., Didier E.S., and **Sokolova Y.Y.** Microsporidia and Cryptosporidia in HIV infected patients in St. Petersburg, Russia, Program and Abstracts, p. 56. (invited talk)
  28. International Workshops on Opportunistic Protists IWOP 12. Tarrytown, New York. August 5 -9, 2012. **Sokolova Y.Y.**, Bowers L.C., Alvarez X., and Didier E.S. Macrophage apoptosis inhibition by microsporidia Infection. Program and Abstracts, p. 48 (invited talk)
  29. 47nd Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Mainz, Germany, 3-7 August, 2014. **Sokolova Y.** White Sea metchnikovellids: morphology, life cycles, potential ancestral features of microsporidia. Program and Abstract book, p.47 (invited talk on the Symposium: “Microsporidiology: Advances in Europe”)

30. 47nd Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Mainz, Germany, 3-7 August, 2014. **Sokolova Y.**, John J. Observations on *Agmasoma penaei* and *Perezia nelsoni* in White Shrimp *Litopenaeus setiferus* from the Gulf of Mexico. Program and Abstract book, p.67 (contributed talk)
31. 48th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Vancouver, Canada, 9-13 August, 2015. **Sokolova Y.**, Tokarev Y., Rusakovich G., Senderskiy I. 2015. Ultrastructural analysis and SSU rRNA gene sequencing of *Alfvenia* sp. and *Agglomerata cladocera* from Siberian microcrustaceans shed light on diversification within the “Aquatic Outgroup. Program and Abstract book, p.46 (contributed talk)
32. 48th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Vancouver, Canada, OECD-CRP Satellite Symposium «Microsporidia in the Animal to Human Food Chain: An International Symposium to Address Chronic Epizootic Disease” 9. **Sokolova Y.** Clues from Invertebrate Research. (invited talk).
33. VII ECOP-ISOP Joint Meeting. 5-10 September 2015. Seville-Spain. Congress Programme & Abstracts, P.172. Nassonova E., Paskerova G., **Sokolova Y.**, Rotari Y., Smirnov A. 2015. Phylogenetic position of Metchnikovellids (Microsporidia: Metchnikovellida). (contributed talk).
34. Sokolova Y., Bowers L., Alvarez X., Didier E., 2016. Inhibition of apoptosis is a universal mechanism of intracellular survival of microsporidia? The 49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Tour, France, 9-13, August, 2016.
35. Sokolova Y. 2017. History and highlights of microsporidia research in Russia. The 50th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. La Jolla, CA, USA, 13-17 August 2017 (invited talk)

Приложение 2: Дополнительные материалы к Главе 3 (Рис. ПЗ-1 – ПЗ-7)



**Рис. ПЗ-1.** Филогенетические связи *Agmasoma penaei* из *Litopenaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae). Дерево, построено на основании анализа сиквенсов МСрРНК Байесовским методом (МВ) и методом наибольшего правдоподобия (МЛ) (оба метода дают идентичную топологию). В анализ включены 559 информативных позиций, полученных в результате выравнивания 20 сиквенсов длиной 720 по. Значения бутстрапов (МЛ), предшествуют значениям апостериорной вероятности (МВ). Оба анализа использовали GTR + G4 модель эволюции. Ветви с поддержкой <50 в МВ показаны в виде политомий. Микроспоридии, заражающие морских и солоноватоводных декапод (выделены жирным шрифтом), разделены между двумя кладами (серые боксы). Ветвь, содержащая сиквенс *A. penaei*, принадлежит ко второй кладе и объединяется с сиквенсами микроспоридий пресноводных и солоноватоводных ракообразных отрядов Anostraca, Cladocera (не включены в данный анализ) и Cystlozoidea (представлен *Mrazekia macrocyclopis*). Черные круги означают 100% поддержку клады обоими анализами. Масштаб: 0.2 замены на сайт.

A

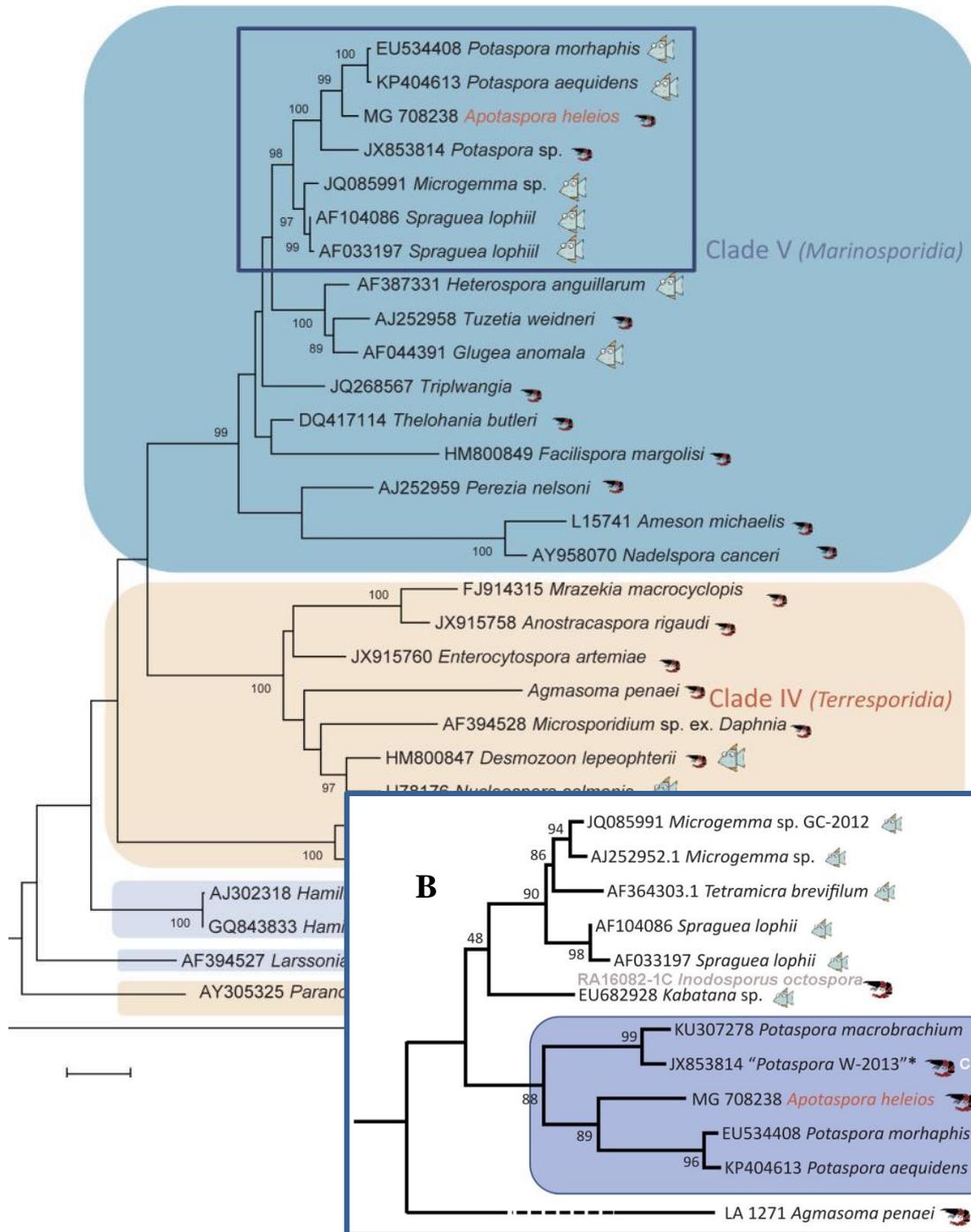
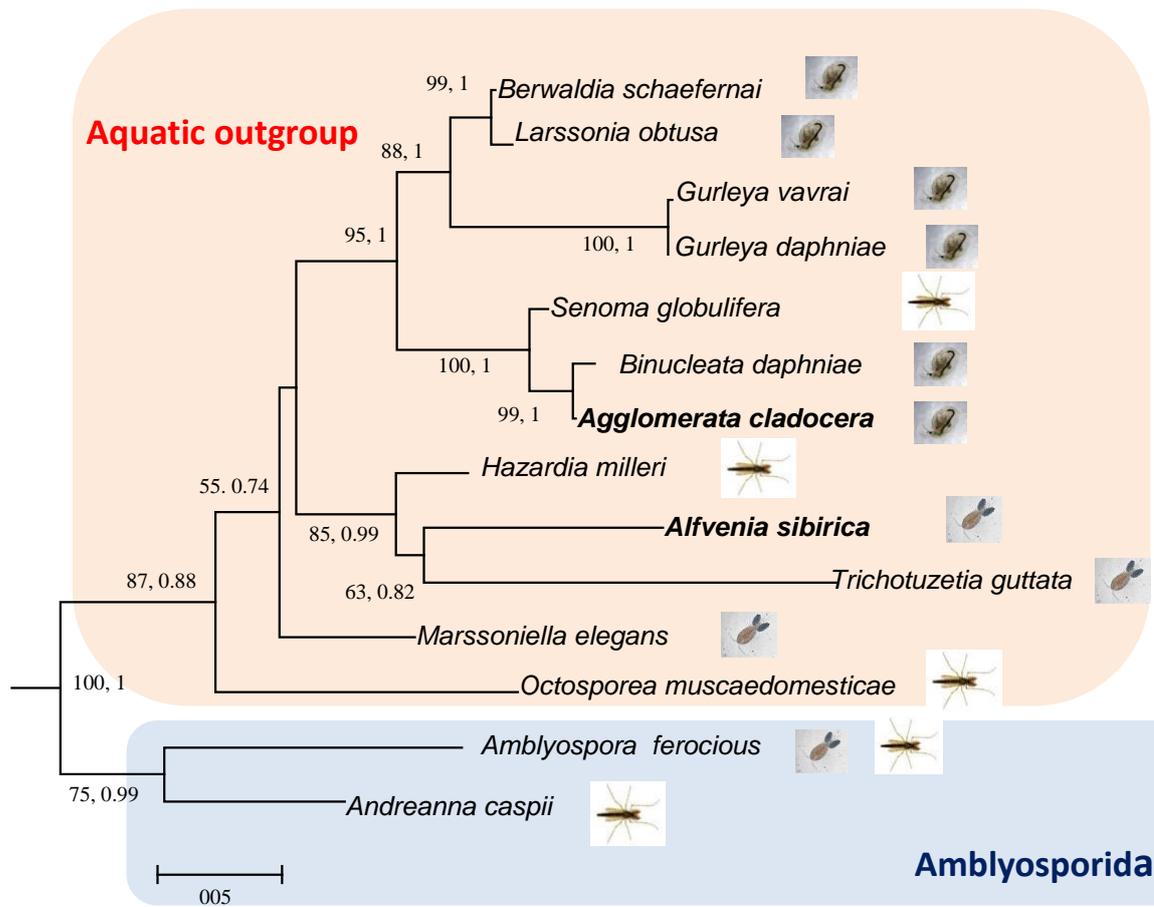
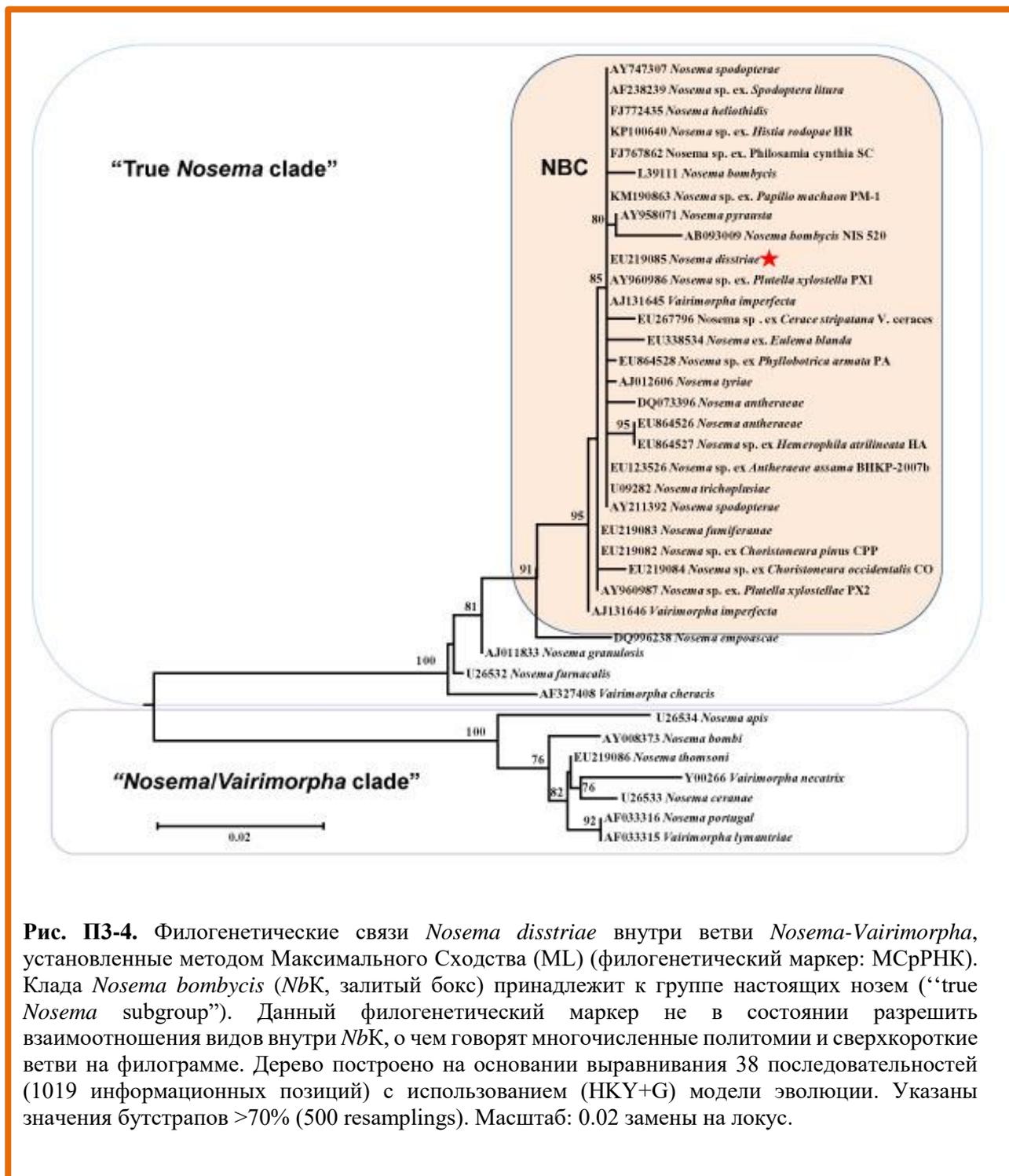


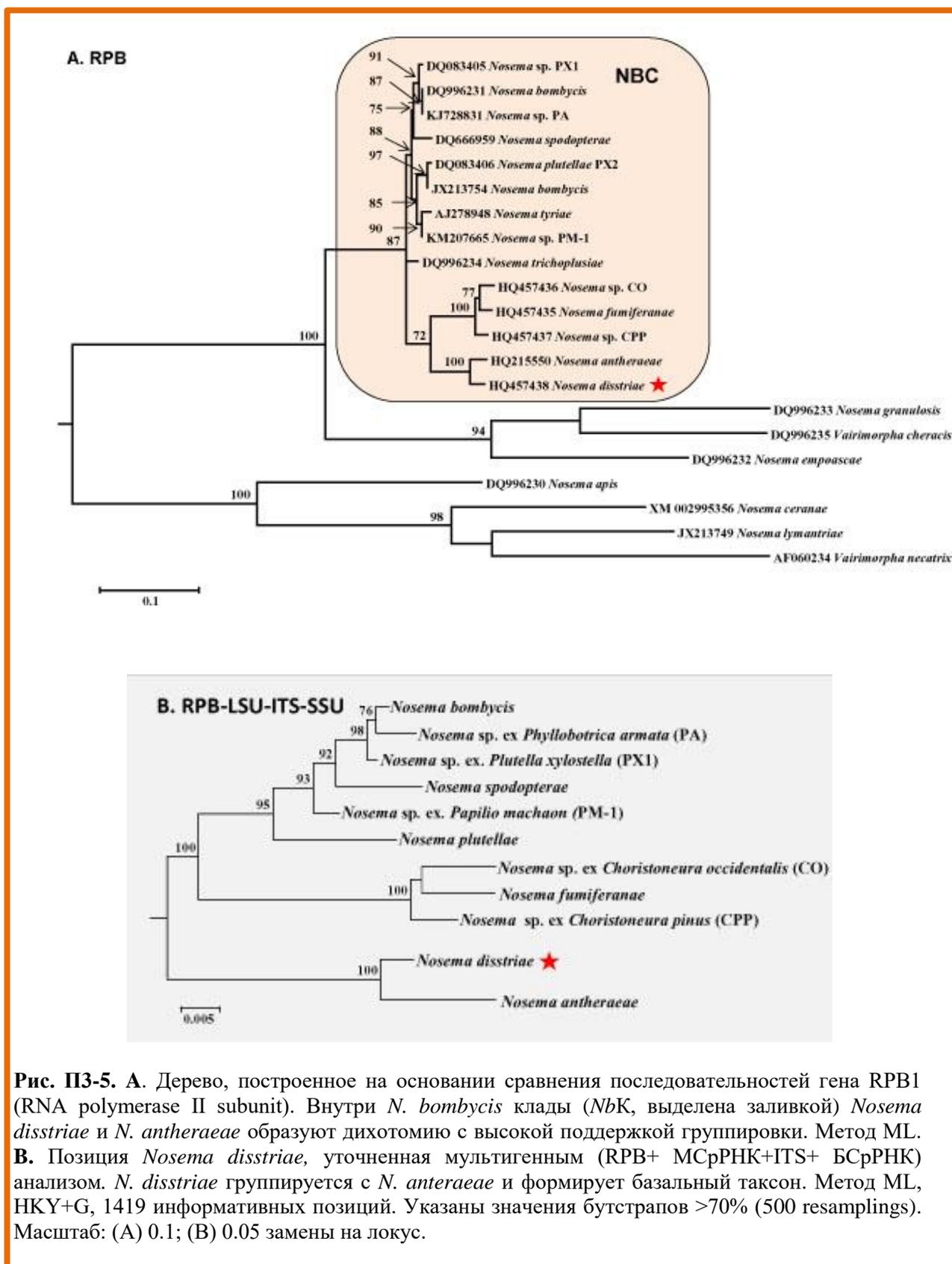
Рис. ПЗ-2. А. *Apotasporea heleios* входит в кластер видов *Potasporea-Microgemma-Spraguea*, супертаксона «Clade V Marinosporidia». В. Филогенетические связи *A. heleios* с полифилетичным родом *Potasporea*, представленным паразитами рыб бассейна Амазонки и креветок внутренних водоёмов Китая, и с кладой *Kabatana-Microgemma-Spraguea*. Предположительно, для представителей этих групп характерны поликсенные жизненные циклы. Анализ МСрПНК сиквенсов методом ML (А:889 информативных позиций (и.п.), 30 сиквенсов по 1200 п.о.; В:728 и.п., 12 сиквенсов по 759 п.о.); хозяева – рыбы / ракообразные, указаны иконками. Идентичность сиквенса *Inodosporus octospora* (не участвовал в анализе) и *Kabatana* sp. показана Stentiford et al. 2017. Внешние группы: А. *Paranosema grylli*; В. *Agmasoma penaei* Масштаб: 0,1 замена на сайт.

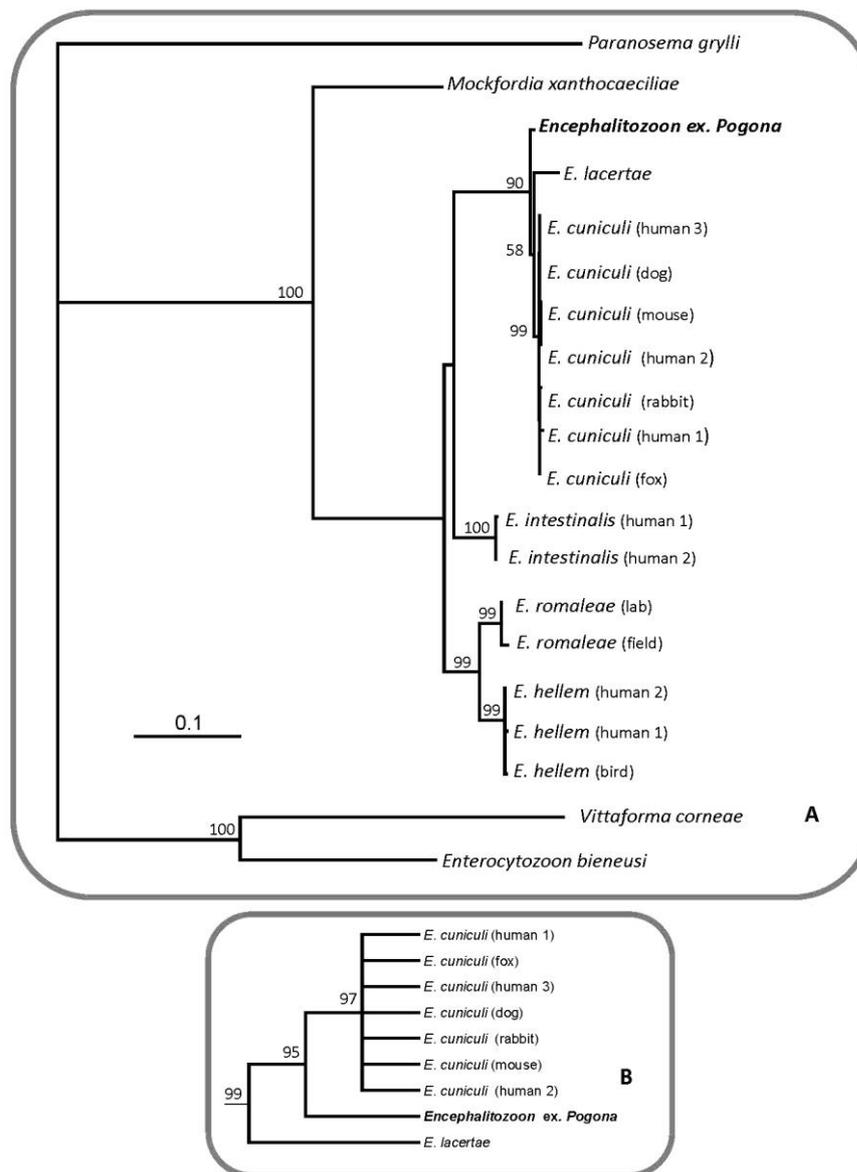


**Рис. ПЗ-3.** Филогения «Aquatic outgroup» и диверсификация клады по группам хозяев. По Sokolova et al., 2016 (пояснения в тексте, раздел 3.2.3)

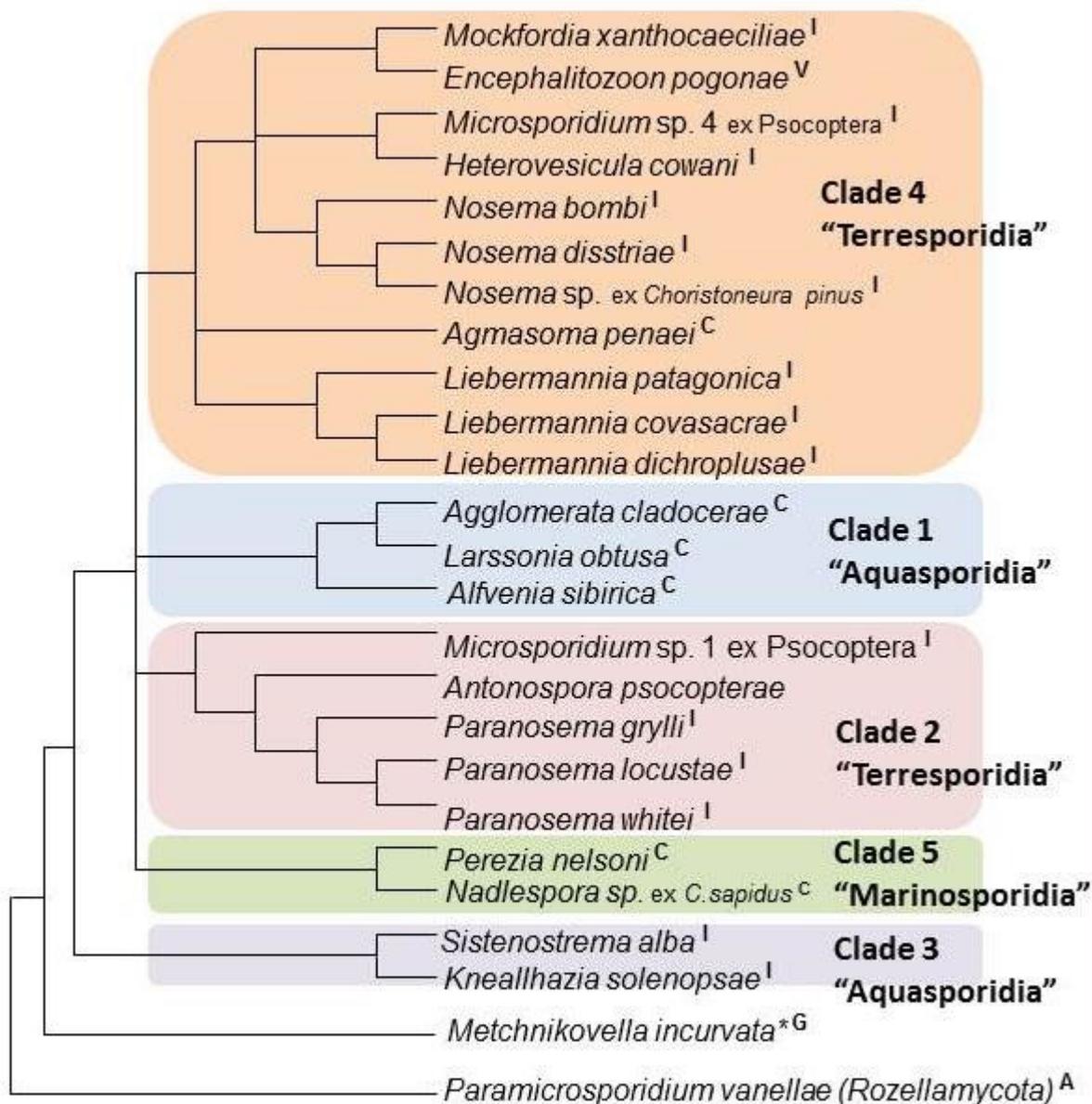


**Рис. ПЗ-4.** Филогенетические связи *Nosema disstriae* внутри ветви *Nosema-Vairimorpha*, установленные методом Максимального Сходства (ML) (филогенетический маркер: МСрРНК). Клада *Nosema bombycis* (NbК, залитый бокс) принадлежит к группе настоящих нозем (“true *Nosema* subgroup”). Данный филогенетический маркер не в состоянии разрешить взаимоотношения видов внутри NbК, о чем говорят многочисленные политомии и сверхкороткие ветви на филограмме. Дерево построено на основании выравнивания 38 последовательностей (1019 информационных позиций) с использованием (НКY+G) модели эволюции. Указаны значения бутстрапов >70% (500 resamplings). Масштаб: 0.02 замены на локус.





**Рис. ПЗ-6.** Филогенетические связи *Encephalitozoon pogonae* с другими микроспоридиями – паразитами человека (*Encephalitozoon* spp., *Enterocytozoon bieneusi*, *Vittaforma corneae*) и с ближайшим родственником *Encephalitozoon* spp., паразитом сеноедов *Mockfordia xanthocaeciliae*. Внешняя группа: *Paranosema grylli*. Деревья построены на основании выравнивания последовательностей МСрРНК методами Максимального Правдоподобия (ML) (A) и Максимального Сходства (MP) (B). Финальная матрица включает 20 сиквенов и 1,202 информативных позиции. Поддержка ветвей (бутстрап тест, 1000 повторностей) > 50% указана в узлах дерева. (A). *E. pogonae* – сестринский таксон по отношению к дихотомии «комплекс *E. cuniculi* – *E. laceratae*». (B). Фрагмент дерева MP, представленный в виде кладограммы с немного иной топологией. *E. pogonae* – сестринский таксон по отношению к комплексу *E. cuniculi*. *E. laceratae* занимает базальную позицию по отношению к этой дихотомии. Ветви с поддержкой <50% в бутстрап-тесте показаны как политомии. Масштаб: 0.1 замены на локус.



**Рис. ПЗ-7.** Филогения микроспоридий описанных или изученных автором (до 2018 г), построенная на основании анализа сиквенсов гена SSUrRNA методом Maximum Parsimony. Внешняя группа: *P. vanellae*. Изученные виды представляют все пять существующих клад типа Microsporidia (Vossbrinck, Debruner-Vossbrinck, 2005). Буквы обозначают систематическое положение хозяина: A, Amoebazoa; G, Gregarina; C, Crustacea; I, Insecta; V, Vertebrata. \*Сиквенс *M. incurvata* не участвовал в анализе и позиция этого таксона определена на основании предварительных данных (Nassonova et al., 2015)

### Приложение 3 (к Главе 4)

Таблица П4-1 Элементы секреторного пути у протистов разных систематических групп

| 1  | 2                               | 3   | 4                       | 5                         | 6          | 7                         | 8                                      | 9                     | 10                    | 11  |
|--|---------------------------------|---|-------------------------|---------------------------|------------|---------------------------|--|-----------------------|-----------------------|---|
| Клада <sup>1</sup> : группа, род                                       | Секретируемые продукты          | ЭР  | Рецикл. ЭР сигн. мотива | АГ:стаки; № цистерн/ стак | АГ         | ТГС:                      | Коаномерн. белки (COP1, COP2, клатрин) | GTP-азы (№гав белков) | SNARE слияния везикул | Источники   |
| Opisthoconta:<br>Fungi<br><i>Sacharamyces</i>                          | Вакуолярные белки               | + <sup>2</sup><br>Б,<br>ЭМ,М <sup>3</sup> | +                       | –<br>ЭМ                   | +          | +                         | +                                      | +                     | +                     | Rambourg et al., 1995; 1996; Morin-ganet et al., 2000                   |
| Amoebozoa:<br>Dictiostelia<br><i>Dictiostelium</i>                     | гидролазы, оболочка споры       | +   | +                       | +                         | +          | Нет данных                | COPs, клатрин ЭМ, М                    | +(?)<br>М             | +                     | Lenhard et al., 1989; Becker, Melkonian, 1996                           |
| Amoebozoa:<br>Entamoebida<br><i>Entamoeba</i>                          | гидролазы,цист а,поверхн.белк и | +   | +                       | –                         | +          | +                         | +                                      | +                     | +                     | Ghosheetal., 1999; Manning-Celaetal., 2003;                             |
| Amoebozoa:<br>Pelobiontida<br><i>Mastigamoeba</i>                      | Нет данных                      | Нет данных                                | Нет данных              | –<br>ЭМ                   | Нет данных | +Ретром <sup>4</sup><br>М | COP1, Adaptin <sup>5</sup><br>М        | Нет данных            | Нет данных            | Dacks et al., 2003  |
| Excavata:<br>Diplomonada<br><i>Giardia</i>                             | Оболчка споры, по-верхн. белки  | +   | +                       | –/+<br>батип<br>ЭМ        | +          | – или<br>атип<br>ЭМ, М    | +                                      | +                     | +                     | Lujan et al., 1995<br>Marti et al, 2003a,b;<br>Lujan,Touz, 2003,<br>etc |
| Excavata:<br>Parabasalida<br><i>Trichomonas</i>                        | Адгезины                        | +   | Нет данных              | +                         | +          | +                         | +                                      | Нет данных            | Нет данных            | Dyer, 1990;<br>Benhimol et al., 2001                                    |
| Excavata:<br>Kinetoplastida<br><i>Trypanosoma</i><br><i>Leishmania</i> | Поверхн.глико-протенины         | +   | +                       | +                         | +          | +                         | +                                      | +                     | Нет данных            | Clayton et al., 1995; Duscenko et al., 1988;<br>McConville et al., 2002 |

| 1  | 2   | 3             | 4             | 5                  | 6             | 7                         | 8                                       | 9             | 10         | 11   |
|--|---|---------------|---------------|--------------------|---------------|---------------------------|---|---------------|------------|--|
| Excavata:<br>Heterolobosea<br><b>Naegleria</b>                           | Нет данных                                  | Нет данных    | Нет данных    | –<br>ЭМ            | Нет данных    | Ретром. <sup>4</sup><br>М | +<br>COP1,<br>Adaptin <sup>5</sup><br>М | Нет данных    | Нет данных | Dacks et al., 2003   |
| SAR, Alveolata:<br>Apicomplexa<br><b>Toxoplasma</b><br><b>Plasmodium</b> | Микрономы,<br>роптрии<br>плотные<br>гранулы | +<br>Б, ЭМ, М | +<br>Б, ЭМ, М | +/-<br>3-5<br>atyp | +<br>Б, ЭМ, М | +<br>Б, ЭМ, М             | +<br>Б, ЭМ, М                           | + (?)<br>ЭМ,М | Нет данных | Karsten et al.,<br>2002;<br>Hager et al., 1999;<br>Stedman et al.,<br>2003 |
| SAR, Alveolata:<br>Ciliophora<br><b>Paramecium</b>                       | Экструсомы                                  | +<br>Б        | +<br>ЭМ       | +<br>2-3, ЭМ       | +<br>Б, ЭМ    | +<br>Б,ЭМ                 | +<br>ЭМ,М                               | + (5)<br>М    | Нет данных | Allen, Fok, 1993;<br>Plattner, 1993;<br>Becker, Melkonian,<br>1996,        |
| Archaeplastida:<br>Plantae<br><b>Chlamidomonas</b>                       | Клеточные<br>стенки,<br>scales <sup>6</sup> | +<br>Б        | +<br>ЭМ       | +<br>5-20, ЭМ      | +<br>Б        | +<br>Б, ЭМ                | +<br>Б, ЭМ                              | + (6)<br>Б    | Нет данных | Becker, Melkonian,<br>1996   |

<sup>1</sup>По классификации Adl et al. (2012) эукариоты делятся на пять клад: Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, SAR (Stramenopalis+Alveolata+Rhizaria) и Archaeplastida

<sup>2</sup>«+», признак присутствует, «-», отсутствует; «+/-», на одних стадиях жизненного цикла присутствует, на других – отсутствует

<sup>3</sup>Информация получена на основании: **ЭМ**, ультраструктурных; **Б**, биохимических/цитохимических; **М**, геномных данных

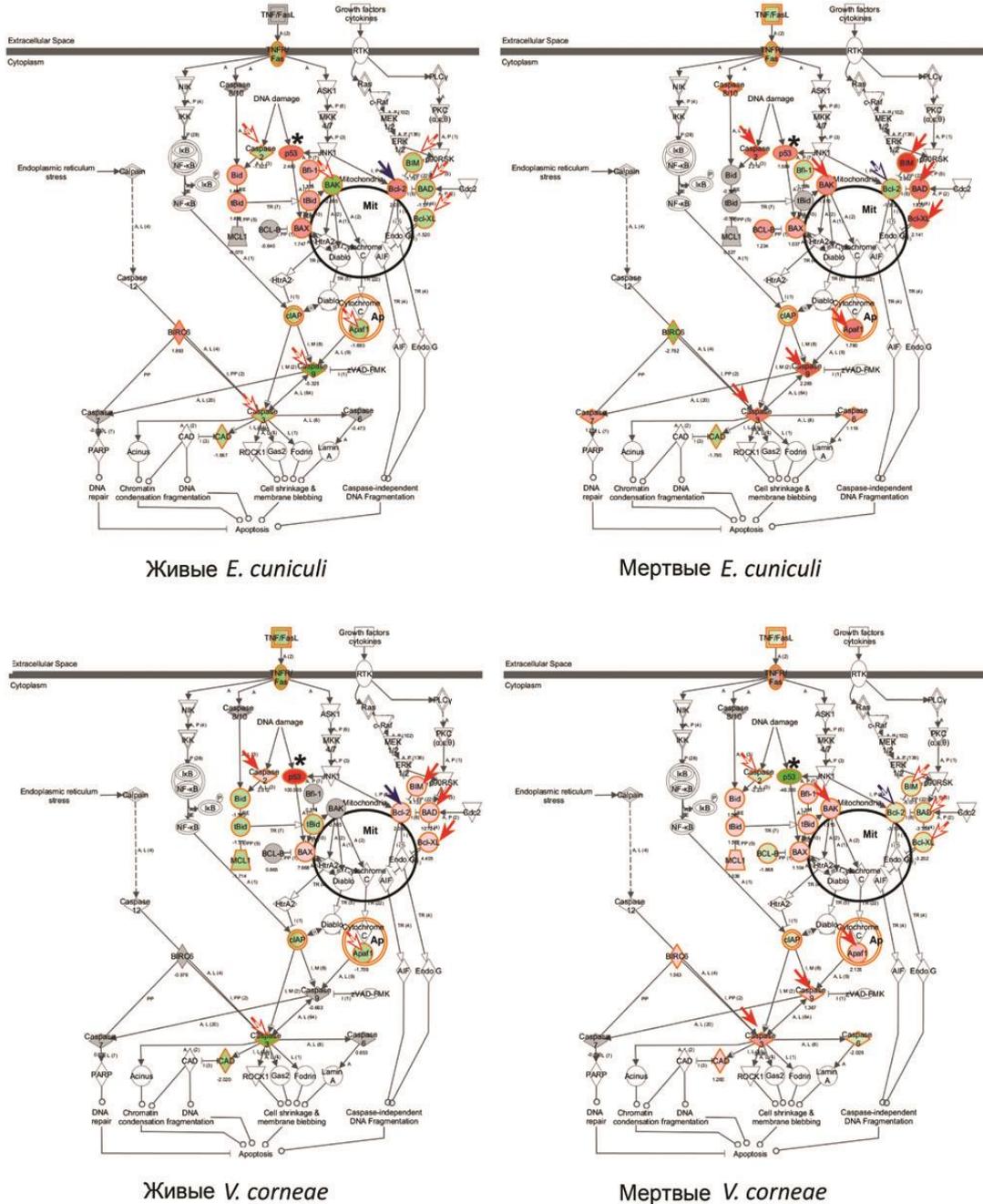
<sup>4</sup>Ретромерный комплекс, комплекс протеинов опосредующих рециклирование трансмембранных рецепторов от эндосом к транс-Гольджи

<sup>5</sup>Адаптины, вспомогательные белки, участвующие в связывании клатрина с мембраной везикул

<sup>6</sup>«Чешуйки», экстра-целлюлярный компонент клеточной стенки низших зелёных водорослей

**Другие сокращения:** **АГ**, аппарат Гольджи; **атип.**, атипичный; **ЭР**, эндоплазматический ретикулум, **Рецикл.** **ЭР** **сигн. мотива**, рециклирование ЭР сигнального мотива; **ТГС**, транс Гольджи сеть, **№**, число элементов.

## Приложение 4 (К Главе 5)



**Рис. П5-1.** Влияние живых и мертвых спор *E. cuniculi* и *V. corneae* на апоптотный сигнальный путь (Ingenuity Pathway Analysis). Про-апоптотные гены *Bak*, *Bim*, *Bad*, *Bcl-X*, ап-регулированы мертвыми и даун-регулированы живыми спорами *E. cuniculi*. Анти-апоптотные гены сем. *Bcl-2* – наоборот. Все эти гены модулируют выход цитохрома С из митохондрий (Mit). Высвобождение цитохрома С приводит к формированию апоптосомы (Ap), активации К9, расщеплению про-К9 и клеточной смерти по «митохондриальному» пути. Про-апоптотные гены *Araf 1*, *K9* и *K3* были также даун-регулированы живыми, но не мертвыми спорами. Эффект *V. corneae* выражен менее однозначно. Заполненные стрелки указывают на ап-регулированные гены (красные круги), пустые стрелки – на даун-регулированные гены (зеленые круги). Красные стрелки указывают на про-, синие – на анти-апоптотные гены, регулируемые разнонаправленно живыми и мертвыми спорами.