

УДК 576.893.577

**УНИКАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ОБМЕНА МИКРОСПОРИДИЙ, КАК РЕЗУЛЬТАТ ДЛИТЕЛЬНОЙ
АДАПТАЦИИ К ВНУТРИКЛЕТОЧНОМУ РАЗВИТИЮ**

© В. В. Долгих, И. В. Сендерский, О. А. Павлова, А. М. Наумов

Всероссийский НИИ защиты растений РАСХН
Пушкин, шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608
E-mail: dollslav@yahoo.com
Поступила 17.01.2011

Микроспоридии — широко распространенная группа близких к грибам облигатных паразитов, прошедших длительную адаптацию к внутриклеточному развитию. В работе обобщены полученные авторами оригинальные результаты и литературные данные по изучению особенностей углеводного и энергетического метаболизма представителей этой группы. На основании изложенного материала делается вывод о том, что в ходе эволюции микроспоридий минимизация функционального аппарата клетки сопровождалась приобретением целого ряда уникальных особенностей, не обнаруженных у других эукариот.

Ключевые слова: микроспоридии, энергетический обмен, митосомы, ферменты.

Микроспоридии — облигатные внутриклеточные паразиты, включающие в круг своих хозяев представителей практически всех типов животного царства (Исси, 1986). Развитие паразитов полностью протекает внутри клетки хозяина, а стадией переживания во внешней среде является спора, обладающая толстой сложно устроенной оболочкой и уникальным аппаратом экстрезии, обеспечивающим механическое проникновение спороплазмы во вновь инвазируемую клетку. Уже первые результаты анализа тонкого строения микроспоридий показали отсутствие у них целого ряда органелл и структур, свойственных эукариотической клетке: запасных питательных веществ в виде гранул, митохондрий, лизосом, пероксисом, «классического» аппарата Гольджи.

Эти данные позволили предположить, что микроспоридии перешли к внутриклеточному существованию еще до появления в атмосфере достаточных количеств кислорода и, вследствие этого, лишены митохондрий (Исси, 1978). Анализ нуклеотидной последовательности РНК малой субъединицы рибосом (Vossbrinck et al., 1987; Philippe, Adoutte, 1995) и определение последовательности аминокислот для ряда белков (Hashimoto, Nase-

gawa, 1996) подтвердили уникальность микроспоридий на первом этапе исследований. Тип Microsporidia был даже выделен из подцарства Protozoa в отдельное подцарство Archezoa (Corliss, 1994). Однако позже были получены убедительные данные о филогенетической близости микроспоридий с грибами и доказано, что часто наблюдаемая низкая степень сходства последовательностей микроспоридий и гомологичных генов грибов есть следствие чрезвычайной пластичности их генома (Van de Peer et al., 2000; Weiss, 2001).

На основании родства микроспоридий с грибами можно заключить, что указанные выше «примитивные» черты паразитов на самом деле представляют результат длительной адаптации к внутриклеточному паразитизму. Например, потеря митохондрий может рассматриваться, как следствие усиления метаболической зависимости от клетки хозяина, сопровождающееся утратой или снижением интенсивности ряда собственных биохимических путей. Ниже мы рассмотрим результаты изучения особенностей энергетического обмена микроспоридий с целью показать, что усиление метаболической зависимости от хозяина сопровождалось не только минимизацией собственного метаболического аппарата паразита, но и приобретением целого ряда уникальных особенностей, не обнаруженных у других эукариотических организмов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АТФ/АДФ-ПЕРЕНОСЧИКОВ ПЛАСТИДНО-БАКТЕРИАЛЬНОГО ТИПА ПРИ ПАРАЗИТИРОВАНИИ МИКРОСПОРИДИЙ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ХОЗЯИНА

Впервые предположение об использовании микроспоридиями АТФ клетки хозяина было выдвинуто на основании эксперимента, показавшего, что добавление этого соединения в среду для культивирования спороплазм *Nosema michaelis* поддерживает сохранение *in vitro* их структуры (Weidner, Trager, 1973). В пользу этой гипотезы свидетельствовали и ультраструктурные данные о плотном контакте митохондрий хозяина с цитоплазматической мембраной паразитов (Durfort, Vallinitjana, 1982). Позже мы показали, что в активно размножающихся меронтах и споронтах микроспоридии *Paranosema* (*Nosema*, *Antonospora*) *grylli*, выделенных в градиенте плотности Перколла (Seleznev et al., 1995), наблюдается более низкая активность ферментов гликолиза по сравнению с таковой в покоящихся спорах (Dolgikh, 2000). Это позволило заключить, что гликолиз не используется паразитами в качестве основного поставщика АТФ при внутриклеточном развитии. В то же время содержание резервных липидов (триглицеридов) и гликогена в зараженных клетках снижалось приблизительно в одинаковой степени (в 2—3 раза), а содержание АТФ и соотношение концентраций АТФ/АДФ в зараженной клетке возрастало в 4 раза по сравнению с контролем (Долгих и др., 2002). Так как лишенные митохондрий микроспоридии не могут самостоятельно использовать липиды хозяина в качестве энергетического субстрата, это косвенно свидетельствовало об усиленном катаболизме запасных веществ самим хозяином и паразитировании микроспоридий на его АТФ-синтезирующей системе (Долгих и др., 2002). Анализ перечисленных выше косвенных данных позволил нам выдвинуть

гипотезу об использовании микроспоридиями специфичных АТФ/АДФ-переносчиков (Weidner et al., 1999) и приступить к их поиску. В первую очередь мы попытались найти у микроспоридий белки, близкие к АТФ/АДФ-транслоказам, присутствующим во внутренней мембране митохондрий, но все попытки оказались неудачными.

Противоречие удалось разрешить в результате расшифровки французскими коллегами генома микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka et al., 2001). Гены, кодирующие митохондриальные АТФ/АДФ-переносчики, действительно отсутствовали у данного паразита. При этом было обнаружено 4 последовательности, кодирующие белки, сходные с АТФ/АДФ-транслоказами пластидно-бактериального типа. Данный тип переносчиков не имеет сходства с митохондриальными транспортерами и присутствует в мембранах внутриклеточных бактерий *Rickettsia prowazekii* (Krause et al., 1985) и *Chlamydia trachomatis* (Tjaden et al., 1999), а также в пластидах растений (Kampfenkel et al., 1995). АТФ-транспортирующая активность всех четырех белков *E. cuniculi* была подтверждена после их экспрессии в бактериях *Escherichia coli* (Tsaousis et al., 2008). Биологический смысл приобретения таких переносчиков очевиден. В отличие от белков, осуществляющих экспорт АТФ из митохондрий, пластидно-бактериальные транспортеры приспособлены к импорту энергетического субстрата в бактериальные клетки и пластиды растений. Время и механизм приобретения соответствующих генов микроспоридиями остаются неизвестными. Поскольку последовательности, обнаруженные у паразита человека *E. cuniculi*, показали наибольшую степень сходства с гомологичными генами возбудителя тифа *Rickettsia prowazekii*, можно было предполагать, что перенос произошел сравнительно недавно в пределах небольшой группы микроспоридий при заражении одной клетки хозяина двумя паразитами. Однако в 2004 г. мы обнаружили две последовательности, гомологичные пластидно-бактериальным переносчикам, в геноме *P. grylli* (Dolgikh et al., 2004), принадлежащей удаленной от *E. cuniculi* филогенетической кладе (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Расшифровка генома патогена перелетной саранчи *P. locustae*, осуществляемая в настоящее время американскими коллегами (<http://forest.mbl.edu/cgi-bin/site/antonospora01>), показала, что у данного вида паразитов 3 гена кодируют транспортеры пластидно-бактериального типа.

Исходя из широкого распространения этих генов у микроспоридий и присутствия нескольких копий внутри одного генома, можно заключить, что горизонтальный перенос произошел очень давно. С высокой степенью вероятности можно утверждать, что это уникальное приобретение определило успех микроспоридий на пути адаптации к внутриклеточному развитию и широкое распространение в качестве паразитов у представителей всех типов животного царства от простейших до позвоночных, включая человека.

Усиление метаболической зависимости от хозяина при внутриклеточном развитии обусловило возникновение еще одной интересной особенности физиологии микроспоридий — использование собственной метаболической системы только на стадии споры.

СПЕЦИФИЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В СПОРАХ МИКРОСПОРИДИЙ

Как было отмечено выше, сравнительный анализ активности ряда ферментов микроспоридии *P. grylli* показал достаточно неожиданный результат. Активности гликолитических ферментов, фосфоглюкомутаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в развивающихся меронтах и споронтах оказались более низкими, чем в покоящихся спорах. Новые методологические возможности для изучения этого вопроса появились в ходе расшифровки геномов микроспоридий. На основании полученных американскими коллегами данных нам удалось осуществить ПЦР-амплификацию и клонирование последовательностей, кодирующих 5 метаболических ферментов *P. locustae*: фосфофруктокиназу (ключевой компонент гликолиза), митохондриальную форму глицерол-3-фосфат дегидрогеназы, альтернативную оксидазу, альфа и бета субъединицы фермента E1 пируватдегидрогеназного комплекса (Dolgikh et al., 2009). Кроме того, были клонированы последовательности, кодирующие ряд неметаболических белков «домашнего хозяйства» паразита: митохондриальную форму молекулярного шаперона Hsp70, SNARE-белок синтаксин, Sec13 субъединицу комплекса COPII (Beznoussenko et al., 2007; Долгих и др., 2010). Гетерологичная экспрессия клонированных последовательностей в бактериях *E. coli*, получение антител к рекомбинантным продуктам и последующий анализ белков спор и стадий внутриклеточного развития с помощью иммуноблоттинга полностью подтвердили полученные ранее результаты. Для 5 изученных ферментов энергетического обмена было показано специфичное накопление в зрелых спорах и отсутствие в стадиях внутриклеточного развития. При этом пробы были выровнены по содержанию общего белка с помощью метода Брэдфорд (Bradford, 1976). В то же время для всех белков, невовлеченных в обменные процессы, наблюдалось примерно одинаковое содержание в спорах и стадиях внутриклеточного развития, что исключает деградацию метаболических ферментов при выделении меронтов и споронтов.

На основании этого можно заключить, что если при внутриклеточном развитии микроспоридии могут полностью полагаться на обменные процессы хозяина, после формирования оболочки споры они вынуждены использовать собственный метаболизм для выживания во внешней среде и заражения нового хозяина. Более детальный анализ обменных процессов у различных видов микроспоридий выявил ряд других интересных особенностей.

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ В АМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МИКРОСПОРИДИЙ

Одним из основных результатов биохимического (догеномного) этапа изучения физиологии микроспоридий следует признать обнаружение в спорах высокого содержания дисахарида трегалозы (Wood et al., 1970; Undeen et al., 1987), трегалазы (Vandermeer, Gochnauer, 1971; Undeen et al., 1987), компонентов гликолиза и глицерол-3-ФДГ как единственных фер-

мента, способного реокислять НАДН, образуемый при катаболизме углеводов (Dolgikh et al., 1997). Первая расшифровка генома микроспоридии *E. cuniculi* полностью подтвердила эти данные, а также выявила в геноме паразита цитоплазматический и митохондриальный компоненты глицерол-3-фосфатного челнока, осуществляющего перенос электронов с глицерол-3-фосфата на внутреннюю мембрану митохондрий (Katinka et al., 2001). Поскольку митохондрии не были обнаружены у микроспоридий, последний результат оказался неожиданным. Однако в следующем году с помощью антител к митохондриальной форме шаперона Hsp70 в клетках микроспоридии *Trachipleistophora hominis* были обнаружены митосомы — крайне редуцированные производные митохондрий (Williams et al., 2002). Позднее эти органеллы были обнаружены в клетках микроспоридии *E. cuniculi* (Tsaousis et al., 2008; Williams et al., 2008) и *P. locustae* (наши неопубликованные данные). Одним из наиболее важных открытий в области изучения метаболизма микроспоридий оказалось обнаружение в двух удаленных филогенетических кладах (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005) последовательностей, кодирующих альтернативную оксидазу (Williams et al., 2010). Данный фермент отвечает за перенос электронов от мембранных переносчиков на кислород. Таким образом, было обнаружено последнее звено в общей схеме энергетического обмена спор микроспоридий, способных синтезировать АТФ в ходе гликолиза и осуществлять реокисление НАДН с помощью альтернативной дыхательной цепи. Недавно мы показали, что оба компонента этой цепи (митохондриальная форма глицерол-3ФДГ и альтернативная оксидаза) колокализуются с митохондриальным шапероном Hsp70 на криосрезах спор микроспоридии *P. locustae* и располагаются на внутренней мембране митосом.

Участие крайне редуцированных митосом в энергетическом обмене является одной из физиологических особенностей микроспоридий. В настоящее время показано, что рудименты митохондрий присутствуют в клетках всех амитохондриальных эукариотических микроорганизмов, являющихся представителями типов Heterocontophyta, Metamonada, Amoebozoa, Apicomplexa и Microsporidia (Hjort et al., 2010). Это предполагает выполнение ими каких-то универсальных функций, жизненно необходимых микроорганизмам. Одной из таких функций признана сборка FeS-кластеров, входящих в состав многих белков. Другой важной функцией редуцированных митохондрий может быть их участие в энергетическом обмене клетки. Эта функция подтверждена для гидрогеносом трихомонад (Metamonada) (Steinbüchel, Müller, 1986), производных митохондрий простейшего *Blastocystis* spp. (Heterocontophyta) (Stechmann et al., 2008) и криптоспоридий (Apicomplexa) (Abrahamsen et al., 2004; Xu et al., 2004; Mogi, Kita, 2010). Только крайне редуцированные множественные митосомы, обнаруженные у лямблии *Giardia lamblia* (Metamonada) (Regoes et al., 2005), эндопаразитических амеб *Entamoeba histolytica* (Amoebozoa) (Tovar et al., 1999) и микроспоридий, рассматривались в качестве органелл, лишенных этой функции (Hjort et al., 2010). Наши исследования показали, что митосомы микроспоридий должны быть вычеркнуты из этого списка.

Важно еще раз отметить, что ферменты альтернативной дыхательной цепи в отличие от митосомального шаперона Hsp70 специфично накапливаются в зрелых спорах *P. locustae*. Это указывает на серьезные перестрой-

ки в составе белков митосом в ходе жизненного цикла паразитов. Поскольку структурно-функциональные изменения митохондрий наблюдаются в ходе жизненного цикла многих паразитов, являясь перспективной мишенью для разработки новых методов химиотерапии (Kita et al., 2001), дальнейшее изучение этого вопроса у микроспоридий представляет несомненный интерес.

Интересной физиологической особенностью микроспоридий является пластичность обменных процессов не только на разных стадиях жизненного цикла, но и в различных филогенетических группах. Наибольший интерес в этом отношении представляют представители клады IV (класс Terresporidia), развивающиеся в наземных хозяевах (Vossbrinck, Debrunner-Vossbrinck, 2005). Первые данные об уникальности обменных процессов у микроспоридий из наземных хозяев были получены при анализе изменения содержания трегалозы в ходе экструзии спор (Undeen, Vander Meer, 1999). Авторы показали, что у микроспоридий из водных хозяев — *Edhazardia aedis* (клада I, класс Aquasporidia), *Vavraia culicis* (клада III, класс Marinosporidia) и *Anncalia (Brachiola, Nosema) algerae* (клада V, класс Aquasporidia) — выбрасывание полярных трубок сопровождалось снижением концентрации трегалозы и образованием значительных количеств глюкозы. В то же время никаких изменений в содержании сахаров не наблюдалось в спорах 7 видов паразитов из наземных хозяев (клада IV, класс Terresporidia), включая микроспоридий *Vairimorpha necatrix*, *V. lymantriae*, *Nosema disstriae* и *N. apis*. Обнаружение генов альтернативной оксидазы у представителей родов *Trachipleistophora*, *Glugea*, *Spraguea* (клада III, класс Marinosporidia) и *Paranosema* (клада II, класс Aquasporidia) при их отсутствии у всех проанализированных представителей клады IV (несколько видов из родов *Nosema*, *Encephalitozoon* и *Enterocytozoon*) подтверждает уникальность представителей класса Terresporidia. Несмотря на то что геномы микроспоридий родов *Nosema* (Cornman et al., 2009) и *Encephalitozoon* (Katinka et al., 2001; Corradi, 2010) содержат оба компонента глицерофосфатного челнока, митохондриальная глицерол-3ФДГ *E. cuniculi* не распознавалась дрожжевой системой импорта белков в митохондрии в отличие от гомологичного белка *P. locustae* (Burri et al., 2006). Иммунофлюоресцентная микроскопия также не подтвердила митосомальную локализацию этого белка в клетках *E. cuniculi* (Williams et al., 2008). Наиболее уникальным представителем микроспоридий клады IV является паразит млекопитающих *Enterocytozoon bieneusi*, поскольку в его геноме не обнаружены какие-либо ферменты углеводного и энергетического обмена, за исключением цитоплазматической формы глицерол-3ФДГ (Akiyoshi et al., 2009; Keeling et al., 2010).

К сожалению, мы пока не обладаем достаточным количеством данных, чтобы понять роль собственной метаболической системы в физиологии спор микроспоридий и объяснить биологический смысл метаболических различий между группами. Присутствие альтернативной дыхательной цепи в спорах предполагает их зависимость от кислорода, поступающего из окружающей среды. Такой обмен, вполне возможный в водной среде, может быть нарушен при переходе к паразитированию в наземных хозяевах. В этом случае длительная адаптация спор к суховоздушным условиям может привести к потере альтернативной дыхательной цепи, снижению

интенсивности обменных процессов и активности трегалазы в спорах, а также к увеличению содержания убихинонов (акцепторов электронов) за счет их накопления не только в мембране митосом, но и в других структурах споры (эндоплазматический ретикулум, тубулярный комплекс Гольджи, поляропласт и т. д.). С одной стороны, данная гипотеза может объяснить потерю альтернативной оксидазы и низкую активность трегалазы у наземных видов микроспоридий, а также эволюционную релокализацию митохондриальной глицерол-3ФДГ *E. cuniculi* за пределы митосом. С другой стороны, сохранение инфекционности, содержащих альтернативную оксидазу спор микроспоридии *P. locustae* (клада II, класс Aquasporidia) в ходе длительного хранения в сухих пшеничных отрубях (препарат Nolo Bait™) позволяет предположить независимую адаптацию разных групп к заражению наземных хозяев. Интересно отметить, что экструзия полярных трубок у спор микроспоридии *P. grylli* из той же филогенетической группы не сопровождается гидролизом трегалозы, как и у наземных паразитов клады IV (Долгих, Семенов, 2003). Возможно, это свидетельствует о конвергентном характере адаптаций в различных группах микроспоридий.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ РЕЛОКАЛИЗАЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЗА ПРЕДЕЛЫ МИТОСОМ МИКРОСПОРИДИЙ

В качестве одной из уникальных особенностей физиологии микроспоридий можно рассматривать изменение локализации ряда митохондриальных белков, обнаруживаемых за пределами митосом. Наряду с предварительными данными о внемитосомальной локализации митохондриальной глицерол-3ФДГ микроспоридии *E. cuniculi*, такие данные были получены для двух ключевых компонентов биосинтеза FeS-кластеров микроспоридии *T. hominis* (белки Isu1 и фратаксин) (Goldberg et al., 2008). Кроме того, мы показали эволюционную релокализацию в цитоплазму спор *P. locustae* альфа и бета субъединиц фермента E1 пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ) (Dolgikh et al., 2009). Если в двух первых случаях биологический смысл изменения внутриклеточной локализации митохондриальных белков пока не ясен, накопление двух субъединиц ПДГ в цитоплазме спор вполне объяснимо. Следует отметить, что E2 и E3 компоненты ПДГ отсутствуют в геномах всех изученных видов микроспоридий, и данная редуцированная форма фермента обнаружена только у паразитов этой группы.

Гетерологичная экспрессия E1альфа и E1бета субъединиц пируватдегидрогеназного комплекса бактерии *Bacillus stearothermophilus* в *E. coli* показала, что смешивание очищенных белков приводит к формированию активного тетрамера (2 альфа и 2 бета субъединицы), осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетата и CO₂ (Lessard, Perham, 1994). Поскольку микроспоридии не имеют гена, кодирующего АТФ цитрат лиазу — ключевой фермент, ответственный за образование ацетил-КоА в нуклеоцитозольном компартменте, есть все основания полагать, что ферменты гликолиза, две субъединицы пируватдегидрогеназы и обнаруженная в геноме ацетил-КоА синтетаза вместе участвуют в синтезе этого очень важного соединения. Например, ацетил-КоА может быть необходим для ацетилирования гистонов и активации транс-

крипционной активности хроматина при заражении нового хозяина (Sterner, Berger, 2000). Кроме того, ацетилирование белков цитоскелета может играть важную роль в их структурном взаимодействии (Hammond et al., 2008).

На основании вышеизложенного можно заключить, что в ходе эволюции микроспоридий минимизация функционального аппарата клетки сопровождалась приобретением целого ряда уникальных особенностей, не обнаруженных у других эукариот. Расшифровка геномов целого ряда микроспоридий открывает перед исследователями новые возможности в изучении как рассмотренных выше вопросов, так и новых направлений. Одним из наиболее перспективных направлений дальнейшего постгеномного анализа микроспоридий является изучение их секретомы — комплекса секретуемых белков и выяснение их роли в паразито-хозяинных отношениях (Долгих и др., 2010).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01358).

С п и с о к л и т е р а т у р ы

- Долгих В. В., Павлова О. А., Сендерский И. В., Пэн Г. 2010. Секреторные белки микроспоридии *Paranosema locustae* и их участие в патогенном воздействии на организм перелетной саранчи *Locusta migratoria*. Вестн. защ. раст. 1 : 48—51.
- Долгих В. В., Семенов П. Б. 2003. Особенности катаболизма трегалозы в спорах микроспоридии *Nosema grylli*. Паразитология. 37 (4) : 372—377.
- Долгих В. В., Семенов П. Б., Григорьев М. В. 2002. Особенности энергетического обмена микроспоридии *Nosema grylli* при внутриклеточном развитии. Паразитология. 36 (6) : 493—501.
- Долгих В. В., Сендерский И. В., Павлова О. А., Безнусенко Г. В. 2010. Анализ экспрессии генов везикулярного транспорта в авезикулярных клетках микроспоридии *Paranosema (Antonospora) locustae*. Цитология. 52 (1) : 5—11.
- Исси И. В. 1978. Эволюция и филогения микроспоридий. Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 78 : 30—43.
- Исси И. В. 1986. Микроспоридии как тип паразитических простейших. Протозоология. 10 : 6—137.
- Abrahamsen M. S., Templeton T. J., Enomoto S., Abrahante J. E., Zhu G., Lancto C. A., Deng M., Liu C., Widmer G., Tzipori S., Buck G. A., Xu P., Bankier A. T., Dear P. H., Konfortov B. A., Spriggs H. F., Iyer L., Anantharaman V., Aravind L., Kapur V. 2004. Complete genome sequence of the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. Science. 304 : 441—445.
- Akiyoshi D. E., Morrison H. G., Lei S., Feng X., Zhang Q., Corradi N., Mayanja H., Tumwine J. K., Keeling P. J., Weiss L. M., Tzipori S. 2009. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. PLoS Pathog. 5 : e1000261.
- Beznoussenko G. V., Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Semenov P. B., Tokarev Y. S., Trucco A., Micaroni M., Giandomenico D. Di., Auinger P., Senderskiy I. V., Skarlato S. O., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Y. Y., Pavelka M., De Matteis M. A., Luini A., Sokolova Y. Y., Mironov A. A. 2007. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. Journ. Cell. Sci. 120 : 1288—1298.

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248—254.
- Burri L., Williams B. A. P., Bursac D., Lithgow T., Keeling P. J. 2006. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 15916—15920.
- Corliss J. O. 1994. An interim utilitarian («user-friendly») hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool.* 33 : 1—51.
- Cornman R. S., Chen Y. P., Schatz M. C., Street C., Zhao Y., Desany B., Egholm M., Hutchison S., Pettis J. S., Lipkin W. I., Evans J. D. 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog.* 5 : e1000466.
- Corradi N., Pombert J. F., Farinelli L., Didier E. S., Keeling P. J. 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat. Commun.* 1 : doi:10.1038/ncomms1082.
- Dolgikh V. V. 2000. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the intracellular stages of the microsporidian *Nosema grylli*. *Protistology.* 1 (3) : 87—91.
- Dolgikh V. V., Seliverstova E. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Pavlova O. A., Beznoussenko G. V. 2009. Heterologous expression of pyruvate dehydrogenase E1 subunits of the microsporidium *Paranosema (Antonospora) locustae* and immunolocalization of the mitochondrial protein in amitochondrial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 293 : 285—291.
- Dolgikh V. V., Sokolova J. J., Issi I. V. 1997. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian *Nosema grylli*. *Journ. Euk. Microbiol.* 44 : 246—249.
- Dolgikh V., Trezeguet V., Lauquin G. 2004. Energy metabolism of microsporidia: do eukaryotic parasites use the plastidic-bacterial transporter to import host cell ATP? Proceedings of CRDF Workshop «Cryptosporidiosis and Microsporidiosis as HIV/AIDS Co-Related Infections». July 7—9, Saint Petersburg, Russia.
- Durfort M., Vallinitjana L. 1982. Ultrastructure of merontes and spores of *Unikaryon mytilicolae* (Microspora, Unikaryonidae), hyperparasite of the Copepoda *Mytilicola intestinalis*. *Rev. Iberica Parasitol.* 42 (2) : 143—160.
- Goldberg A. V., Molik S., Tsaousis A. D., Neumann K., Kuhnke G., Delbac F., Vivares C. P., Hirt R. P., Lill R., Embley T. M. 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature.* 452 : 624—628.
- Hammond J. W., Cai D., Verhey K. J. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20 : 71—76.
- Hashimoto T., Hasegawa M. 1996. Origin and early evolution of eukaryotes inferred from the amino acid sequences of translation elongation factors 1alpha/Tu and 2/G. *Adv. Biophys.* 32 : 73—120.
- Hjort K., Goldberg A. V., Tsaousis A. D., Hirt R. P., Embley T. M. 2010. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365 : 713—727.
- Kampfenkel K., Mohlmann T., Batz O., Van Montagu M., Inze D., Neuhaus H. E. 1995. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Letters.* 374 : 351—355.
- Katinka M. D. et al. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414 : 450—453.
- Keeling P. J., Corradi N., Morrison H. G., Haag K. L., Ebert D., Weiss L. M., Akiyoshi D. E., Tzipori S. 2010. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biol. Evol.* 2 : 304—309.
- Kita K., Miyadera H., Saruta F., Miyoshi H. 2001. Parasite Mitochondria as a Target for Chemotherapy. *Journ. of Health Science.* 47 : 219—239.
- Krause D. C., Winkler H. H., Wood D. O. 1985. Cloning and expression of the *Rickettsia prowazekii* ADP/ATP translocator in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 3015—3019.

- Lessard I. A., Perham R. N. 1994. Expression in *Escherichia coli* of genes encoding the E1 alpha and E1 beta subunits of the pyruvate dehydrogenase complex of *Bacillus stearothermophilus* and assembly of a functional E1 component (alpha 2 beta 2) in vitro. *Journ. Biol. Chem.* 269 : 10378—10383.
- Mogi T., Kita K. 2010. Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitol. Int.* 59 : 305—312.
- Philippe H., Adoutte A. 1995. How reliable is our current view of eukaryotic phylogeny? *Protistological Actualities / Ed by G. Brugerolle, J. P. Mignot.* 17—33.
- Regoes A., Zourmpanou D., León-Avila G., van der Giezen M., Tovar J., Hehl A. B. 2005. Protein import, replication, and inheritance of a vestigial mitochondrion. *Journ. Biol. Chem.* 280 : 30557—30563.
- Seleznnev K., Issi I., Dolgikh V., Belostotskaya G., Antonova O., Sokolova J. 1995. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradient for biochemical research. *Journ. Euk. Microbiol.* 42 : 288—292.
- Stechmann A., Hamblin K., Pérez-Brocá V., Gaston D., Richmond G. S., van der Giezen M., Clark C. G., Roger A. J. 2008. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Biol.* 18 : 580—585.
- Steinbuchel A. M. Muller. 1986. Anaerobic pyruvate metabolism of *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20 : 57—65.
- Sterner D. E., Berger S. L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 : 435—459.
- Tjaden J., Winkler H. H., Schwoppe C., Van Der Laan M., Mohlmann T., Neuhäus H. E. 1999. Two nucleotide transport proteins in *Chlamydia trachomatis*, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. *Journ. Bacteriol.* 181 : 1196—1202.
- Tovar J., Fischer A., Clark C. G. 1999. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 32 : 1013—1021.
- Tsaousis A. D., Kunji E. R., Goldberg A. V., Lucocq J. M., Hirt R. P., Embley T. M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 453 : 553—556.
- Undeen A. H., ElGazzar L. M., Vander Meer R. K., Narang S. 1987. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microsporida: Nosematidae). *Journ. Invertebr. Pathol.* 50 : 230—237.
- Undeen A. H., Vander Meer R. K. 1999. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *Journ. Invertebr. Pathol.* 73 : 294—302.
- Van de Peer Y., Ben Ali A., Meyer A. 2000. Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene.* 246 : 1—8.
- Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. 1971. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. *Journ. Invertebr. Pathol.* 17 : 38—41.
- Vossbrinck C., Maddox J., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B., Woese C. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature.* 326 : 411—414.
- Vossbrinck C. R., Debrunner-Vossbrinck B. A. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol.* 52 : 131—142.
- Weidner E., Findley A. M., Dolgikh V., Sokolova J. 1999. Microsporidian biochemistry and physiology. *The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society for Microbiology, Washington, D. C.* 172—195.
- Weidner E., Trager W. 1973. Adenosine triphosphate in the extracellular survival of an intracellular parasite (*Nosema michaelis*, Microsporidia). *Journ. Cell Biology.* 57 : 586—591.
- Weiss L. M. 2001. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.* 78 : 89—102.

- Williams B. A., Cali A., Takvorian P. M., Keeling P. J. 2008. Distinct Localization Patterns of Two Putative Mitochondrial Proteins in the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Journ. Euk. Microbiol.* 55 : 131—133.
- Williams B. A., Elliot C., Burri L., Kido Y., Kita K., Moore A. L., Keeling P. J. 2010. A broad distribution of the alternative oxidase in microsporidian parasites. *PLoS Pathog.* 6 : e1000761.
- Williams B. A. P., Hirt R. P., Lucocq J. M., Embley T. M. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature.* 418 : 865—869.
- Wood P. J., Siddiqui I. R., Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. 1970. Carbohydrates of *Nosema apis* spores. *Carbohydr. Res.* 15 : 154—158.
- Xu P., Widmer G., Wang Y., Ozaki L. S., Alves J. M., Serrano M. G., Puiu D., Manque P., Akiyoshi D., Mackey A. J., Pearson W. R., Dear P. H., Bankier A. T., Peterson D. L., Abrahamsen M. S., Kapur V., Tzipori S., Buck G. A. 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature.* 431 : 1107—1112.

UNIQUE CHARACTERISTICS OF THE ENERGY METABOLISM
IN MICROSPORIDIA AS A RESULT OF DURATIONAL ADAPTATION
TO THE INTRACELLULAR DEVELOPMENT

V. V. Dolgikh, I. V. Senderskiy, O. A. Pavlova, A. M. Naumov

Key words: Microsporidia, energy metabolism, mitosomes, enzymes.

S U M M A R Y

Microsporidia is a large group of fungi-related unicellular eukaryotes with obligate intracellular lifestyle infecting a wide range of invertebrate and vertebrate hosts. Long adaptation of the parasites to intracellular development resulted in extraordinary minimization of their metabolic system. The paper summarizes the original results and literature data on the study of microsporidian carbohydrate and energy metabolism. On the basis of the material, it is concluded that minimization of microsporidian cell machinery was accompanied by the acquisition of a number of unique characteristics, which were not found in other eukaryotes.