

ОСОБЕННОСТИ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В СПОРАХ МИКРОСПОРИДИИ *PARANOSEMA (ANTONOSPORA) GRYLLI*

© В. В. Долгих,¹ П. Б. Семенов,¹ Г. В. Безнусенко²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин,
и ² Институт фармакологических исследований «Марио Негри», Санта Мариа Имбаро, Италия;

¹ электронный адрес: doi1slav@yahoo.com

Длительная адаптация микроспоридий — обширной группы родственных грибам одноклеточных микроорганизмов — к внутриклеточному паразитизму привела к чрезвычайной минимизации функционального аппарата клетки. Например, разнообразие углеводов, входящих в состав гликопротеинов и протеогликанов паразитов, вероятно, ограничивается лишь наличием О-связанных цепей, состоящих из остатков маннозы. Это предположение основано на обнаружении в геноме микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi* трех генов, ответственных за О-маннозилирование белков при отсутствии ферментов, участвующих в N-гликозилировании. В работе предпринято изучение особенностей гликозилирования белков в спорах микроспоридии *Paranosema grylli*, развивающейся в жировом теле двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus*. Разделение белков спор в геле и их окрашивание в присутствии периодата и реагента Шиффа показали, что отдельные гликопротеины *P. grylli* являются высокогликозилированными, а наибольшую интенсивность окраски проявил основной белок полярной трубки РТР1. Обработка экстрагированного материала N-гликозидазой F и гибридизация с лектином WGA, конъюгированным с пероксидазой хрена, не показали присутствия в спорах *P. grylli* N-гликозилированных белков. В то же время избирательно экстрагированный основной белок оболочки спор Р40 специфично распознавался лектином GNA, сшитым с агарозными шариками. Предобработка р40 α- и β-маннозидазами значительно снижала эффективность связывания. Поскольку лектин GNA специфичен по отношению к терминальным остаткам маннозы, это свидетельствует в пользу О-маннозилирования основного белка оболочки споры микроспоридий. Несмотря на интенсивное гликозилирование РТР1, экстрагированные белки полярной трубки *P. grylli* не показали специфичного связывания с GNA-агарозой, что оставляет вопрос об особенностях их гликозилирования открытым. Сопоставление полученных данных с результатами расшифровки генома *E. cuniculi* позволяет сделать вывод о том, что минимизация аппарата гликозилирования белков микроспоридий является общей особенностью этой группы паразитов.

Ключевые слова: микроспоридии, споры, гликозилирование белков, гликопротеины.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДСН — додецилсульфат натрия, ДСН-ПАГЭ — электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, 2-МЭ — 2-меркаптоэтанол.

Микроспоридии представляют собой группу филогенетически близких к грибам облигатных внутриклеточных паразитов, обнаруженных у представителей почти всех типов животного царства от простейших до приматов. Широкое распространение группы и возрастающее число видов, являющихся возбудителями оппортунистических инфекций у людей с ослабленным иммунитетом (Weber et al., 1994), обуславливают практическое значение группы. Наряду с этим микроспоридии привлекают все большее внимание исследователей в качестве минимальной модели эукариотической клетки. Эти древние паразиты имеют наименьший среди эукариот размер клетки и геном, сравнимый по количеству нуклеотидов с бактериальным. В ходе эволюции они утратили большинство органелл, за исключением ядра, эндоплазматического ретикулума и видоизмененного аппарата Гольджи. Как показали результаты расшифровки генома микроспоридии человека *Encephalitozoon cuni-*

culi, функциональный аппарат клетки паразитов также является крайне минимизированным и лишен большинства метаболических путей, а также множества генов, свойственных эукариотической клетке (Katinka et al., 2001).

Анализ списка белоккодирующих последовательностей в геноме *E. cuniculi* выявил одну из интересных особенностей физиологии микроспоридий — полное отсутствие генов, участвующих в N-гликозилировании мембранных и секретируемых белков. N-гликозилирование белков начинается в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме с присоединения олигосахаридного предшественника к остатку аспарагина белковой молекулы. Начальные этапы этого процесса являются идентичными у всех эукариотических организмов от дрожжей до человека включительно. При этом микроспоридии оказались неожиданным исключением. Наряду с потерей всех ферментов, участвующих в N-гликозилировании, микроспо-

ридии, вероятно, сохранили способность к O-маннозилрованию белков по типу, сходному с таковым у дрожжей (Lussier et al., 1997). В геноме *E. cuniculi* обнаружены гены ферментов, участвующих в этом процессе, за исключением α -1,3-маннозилтрансферазы — фермента, обеспечивающего присоединение терминальных остатков маннозы.

Несмотря на отсутствие гликозидаз и большинства гликозилтрансфераз, свойственных эукариотической клетке, микроспоридии интенсивно синтезируют множество структурных белков, участвующих в формировании сложно устроенной оболочки споры паразита и длинной полярной трубки. Углеводные компоненты этих гликопротеинов, по всей видимости, играют важную роль в процессе заражения клетки хозяина (Xu et al., 2004). Однако до настоящего времени они остаются малоизученными, а немногочисленные биохимические данные часто противоречат результатам геномного анализа. Например, было показано, что лектины ConA и WGA взаимодействуют с поверхностью спор микроспоридии *Glugea plecoglossi*, а также с мажонным белком с мол. массой 55 кДа и несколькими минорными полипептидами (Kim et al., 1999). Эти же лектины специфично распознавали два структурных белка оболочки споры микроспоридии *Encephalitozoon intestinalis* (Hayman et al., 2001). Однако лектин WGA распознает остатки и олигомеры N-ацетилглюкозамина и, следовательно, является специфичным для N-гликозилированных белков. Гликозилирование основного белка полярной трубки РТР1 микроспоридий является еще одним примером подобных противоречий. Данный гликопротеин распознается лектином ConA, специфичным к терминальным α -маннозным и α -глюкозным остаткам (Xu et al., 2004). Поскольку микроспоридии сохранили лишь ферменты, обеспечивающие O-маннозилрование белков, следовало ожидать, что РТР1 будет распознаваться лектином GNA, специфичным к терминальным α -маннозным остаткам. Однако в случае микроспоридии *E. hellem* этого не наблюдается (Xu et al., 2004).

Для дальнейшего изучения особенностей гликозилирования белков микроспоридий требуются применение новых биохимических методов и расширение круга исследуемых видов. В связи с этим мы предприняли изучение особенностей гликозилирования белков микроспоридии *Paranosema grylli*, паразитирующей в жировом теле двупятнистого сверчка *Gryllus bimaculatus* (Sokolova et al., 2003). В ходе работы были использованы методы обработки белков специфичными гликозидазами и лектинами, а также специфичной окраски гликопротеинов в геле с помощью периодата и реагента Шиффа. Использованные методы позволили показать отсутствие N-связанных гликопротеинов в спорах данного вида микроспоридий и маннозилрование основного белка оболочки споры. Кроме того, было показано, что, являясь наиболее гликозилированным гликопротеином паразита и клетки хозяина, основным белком полярной трубки не распознается лектином, специфичным к терминальным остаткам маннозы, что оставляет открытым вопрос об особенностях его гликозилирования. Поскольку представители родов *Paranosema* и *Encephalitozoon* филогенетически удалены друг от друга, сопоставление полученных данных с результатами расшифровки генома *E. cuniculi* позволяет заключить, что редукция аппарата гликозилирования белков — общее свойство данной группы внутриклеточных паразитов.

Материал и методика

Споры *P. grylli* выделяли из жирового тела искусственно зараженных двупятнистых сверчков *G. bimaculatus* по ранее описанной методике (Seleznev et al., 1995) и разрушали в растворе 50 мМ Трис-НСl (pH 7.4) и 150 мМ NaCl, содержащем стеклянные бусы, на автоматическом встряхивателе Vortex в течение 30 мин. Экстракцию белков оболочки споры и полярной трубки осуществляли согласно ранее разработанной методике (Долгих, Семенов, 2003), подробно описанной ниже.

Обработка белков спор N-гликозидазой F. Белки оболочки экстрагировали кипячением интактных спор в течение 10 мин в присутствии 0.1 М Трис-НСl (pH 8.0), 2 % ДСН и 5 % 2-МЭ. После осаждения спор центрифугированием супернатант разводили водой в 10 раз и добавляли дополнительные компоненты с целью получения реакционной смеси, содержащей 0.1 М Трис-НСl (pH 8.0), 0.2 % ДСН, 0.5 % 2-МЭ, 10 мМ ЭДТА-Na₂, 1 % Тритона X-100 и 5 ед./мл N-гликозидазы F (Roche, Германия).

С целью высвобождения внутренних белков спор была осуществлена стимуляция экстрезии (выброса) полярных трубок по ранее описанной методике (Долгих, Семенов, 2003). Поскольку экстрезии нерастворимый материал (выброшенные полярные трубки и оболочки спор) удаляли центрифугированием. К супернатанту добавляли различные компоненты для получения реакционной смеси того же состава, за исключением присутствия 170 мМ KCl, добавление которого было необходимо для стимуляции процесса экстрезии.

Осадок тщательно промывали 3%-ным ДСН и белки полярной трубки избирательно экстрагировали в течение ночи в присутствии 50 % 2-МЭ (Dolgikh et al., 2005). После осаждения нерастворимый материал удаляли центрифугированием, а супернатант разводили водой в 10 раз и добавляли дополнительные компоненты с целью получения реакционной смеси того же состава, что и в случае белков оболочки. Единственным отличием данного раствора являлось более высокое содержание 2-МЭ (5 %). Экстрагированные белки спор инкубировали в присутствии фермента N-гликозидазы F в течение ночи при 4 °С и реакционную смесь анализировали методом ДСН-ПАГЭ (Laemmly, 1970). Трансферин человека (Sigma, США) инкубировали при тех же условиях, что и экстрагированные белки оболочки, и использовали в качестве положительного контроля.

Изучение связывания основного белка оболочки спор и белков полярной трубки *P. grylli* с GNA-агарозой. Основным белком оболочки, являющийся компонентом экзоспоры *P. grylli* (p40) (Dolgikh et al., 2005), избирательно сольбилизовали при обработке интактных спор щелочно-солевым раствором, содержащим 10 мМ КОН и 170 мМ NaCl (Долгих, Семенов, 2003). Споры осаждали центрифугированием и супернатант нейтрализовали добавлением 1/20 объема 1 М Na-фосфатного буфера (pH 6.0). Экстрагированный белок инкубировали в течение 3 ч при 37 °С в присутствии α -маннозидазы (2 ед./мл; Sigma, США) или β -маннозидазы (2 ед./мл; ICN, США). Инкубацию контрольной пробы осуществляли без добавления фермента. После этого к 50 мкл каждой пробы добавляли от 12.5 до 100.0 мкл 50%-ной суспензии агарозных шариков, конъюгированных с лектином GNA (Sigma, США), и суспензию инкубировали в течение 1 ч при комнатной темпера-

туре. Предварительно GNA-агароза была уравновешена 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 6.0), содержащим 170 мМ NaCl.

Солубилизацию белков полярной трубки осуществляли по методике, использованной в экспериментах с N-гликозидазой F, описанной выше. При этом концентрация в 2-МЭ в инкубационной среде была снижена до 5 %. С целью минимизировать влияние 2-МЭ на процесс связывания белков с лектином экстракт дополнительно разводили водой в 2 или 10 раз добавлением Na-фосфатного буфера (рН 6.0) до конечной концентрации 20 мМ. К 70 мкл полученного раствора добавляли 40 мкл 50%-ной GNA-агарозы, уравновешенной и ресуспендированной в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6.0), и смесь инкубировали 1.5 ч при комнатной температуре, периодически встряхивая.

После инкубации агарозные шарики тщательно отмывали раствором, используемым для уравновешивания GNA-агарозы, и ресуспендировали в 50 мкл буфера, используемого при приготовлении проб для ДСН-ПАГЭ (0.06 М Трис-НСl, рН 8.0, 2 % ДСН, 5 % 2-МЭ и 10 % глицерина). Связавшиеся с лектином белки элюировали кипячением суспензии в течение 10 мин, осаждали агарозу центрифугированием и анализировали супернатант с помощью ДСН-ПАГЭ.

Электрофорез белков в присутствии ДСН и окраска гелей. Пробы белков смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-НСl-буфера, содержащего 4 % ДСН, 10 % 2-МЭ и 20 % глицерина, и кипятили в течение 10 мин. Белки разделяли методом ДСН-ПАГЭ в 12%-ном геле и окрашивали с помощью красителя Ку-масси R-250 (Reanal, Венгрия). Специфичную окраску на гликопротеины проводили с помощью периодата и реагента Шиффа (Гааль и др., 1982). Гели после разделения белков методом ДСН-ПАГЭ фиксировали в течение ночи в 40%-ном этаноле в присутствии 5%-ной уксусной кислоты, переносили на 2 ч в раствор 0.7%-ного периодата и 5%-ной уксусной кислоты, затем на 2 ч в раствор 0.2%-ного метабисульфита натрия и 5%-ной уксусной кислоты. После этого гели инкубировали в течение ночи с реагентом Шиффа. Для его приготовления 1 г основного фуксина (розанилина) растворяли в 120 мл 0.17 М НСl с последующим добавлением 1.7 г метабисульфита натрия. После перемешивания в течение 15 мин смесь осветляли с помощью активированного угля, который удаляли центрифугированием.

Вестерн-блоттинг белков микроспоридий с лектином WGA. Разделенные с помощью ДСН-ПАГЭ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью стандартного полусухого метода. Мембраны окрашивали Понсо (Serva, Германия), отмывали в ТТБС (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 150 мМ NaCl и 0.05 % Tween-20), инкубировали в течение 1 ч в ТТБС в присутствии 1 % БСА и добавляли лектин WGA, конъюгированный с пероксидазой хрена (Sigma, США), разведенный 1 : 500 в ТТБС, содержащем 0.5 % БСА. После инкубации в течение ночи при 4 °С мембрану тщательно отмывали в ТТБС, затем в ТБС (ТТБС без добавления детергента Tween-20) и для проявления пероксидазной реакции инкубировали в свежеприготовленном растворе, содержащем ТБС, 15 % метанола, 0.05 % 4-хлоро-1-нафтола (Sigma, США) и 0.02 % H₂O₂.

Результаты

Общая оценка степени гликозилирования белков спор *P. grylli*. На первом этапе исследования белки спор *P. grylli* и жирового тела хозяина (сверчков *G. bimaculatus*) были разделены методом ДСН-ПАГЭ с последующей окраской общих гликопротеинов в геле с помощью периодата и реагента Шиффа (рис. 1). Чувствительность данного метода довольно низка и позволяет обнаружить лишь высокогликозилированные белки и протеогликаны (Jay et al., 1990). Это подтверждается отсутствием яркоокрашенных полос при анализе проб жирового тела сверчков. Несмотря на наличие у насекомых классического аппарата Гольджи и интенсивный синтез в их жировом теле таких гликопротеинов, как вителлогенины (Кемра-Томм et al., 1990), анализ данных проб показал лишь присутствие множества слабоокрашенных полос (рис. 1, дорожки 4, 5). Среди белков спор микроспоридий общее количество окрашенных полос оказалось меньше (рис. 1, дорожка 1), однако отдельные полосы демонстрировали более яркую окраску, что свидетельствует о высокой степени их гликозилирования. Среди всех белков микроспоридий и клетки хозяина наиболее гликозилированным оказался основной белок полярной трубки паразита РТР1 с мол. массой около 56 кДа (рис. 1, дорожка 1). Высокая степень гликозилирования данного белка сохранялась и после солубилизации экстрагированных полярных трубок в присутствии 50 % 2-МЭ (рис. 1, дорожка 3). Интересно отметить, что в случае основного белка оболочки споры с мол. массой около 40 кДа (р40) положительная реакция отсутствовала (рис. 1, дорожка 2). На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что некоторые белки спор являются высокогликозилированными. Вероятно, это структурные компоненты споры, и присутствие в их составе значительного количества углеводных компонентов необходимо для выполнения специфичных функций. В то же время основная часть белков спор или не гликозилирована, или содержит небольшое число углеводных остатков. Поскольку низкая чувствительность данного метода не позволяет выявить слабогликозилированные белки, на следующем этапе исследования были использованы более чувствительные методы обработки белков специфичными гликозидазами и связывания с лектинами.

Отсутствие N-гликозилированных белков в спорах *P. grylli*. Для обнаружения в спорах микроспоридий *P. grylli* гликопротеинов с N-связанными углеводными цепями был использован метод их отщепления от белковой молекулы с помощью высокоспецифичной N-гликозидазы F (Tarentino et al., 1985). С этой целью избирательно экстрагированные белки оболочки споры, внутренние белки спор и белки полярной трубки инкубировали в присутствии фермента и анализировали изменение их электрофоретической подвижности в ПААГ после обработки N-гликозидазой F. В качестве положительного контроля был использован трансферин человека — гликопротеин, содержащий N-связанные углеводные цепи. Как показало разделение белков методом ДСН-ПАГЭ, обработка трансферина человека N-гликозидазой F приводила к повышению электрофоретической подвижности данного белка в геле за счет удаления N-связанных углеводных компонентов (рис. 2, дорожки 1, 2). В то же время ни один из экстрагированных внутренних белков спор (рис. 2, дорожки 3,

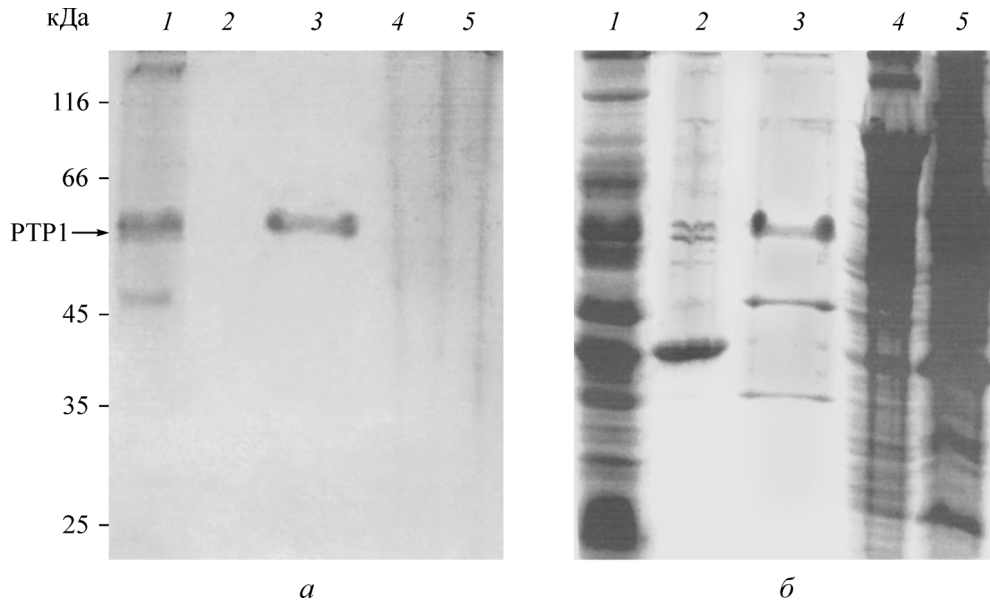


Рис. 1. Выявление гликопротеинов в спорах микроспоридии *Paranosema grylli*.

Белки разделяли методом ДСН-ПАГЭ с последующим окрашиванием в присутствии периодата и реагента Шиффа для обнаружения углеводов (а) или Кумасси R-250 для выявления белков (б). Дорожки: 1 — общий экстракт белков спор *P. grylli* (разрушенные споры кипятили 10 мин в присутствии 0.1 М Трис-НСl, рН 8.0, 2 % ДСН и 5 % 2-МЭ); 2 — основной белок оболочки р40, экстрагированный в ходе инкубации интактных спор в 10 мМ КОН и 170 мМ КСl; 3 — споры после стимуляции выброса полярных трубок были отмыты 3%-ным ДСН, белки полярной трубки экстрагированы в присутствии 50 % 2-МЭ; 4, 5 — соответственно растворимая и мембранная фракции жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus*. РТР1 — основной белок полярной трубки (56 кДа).

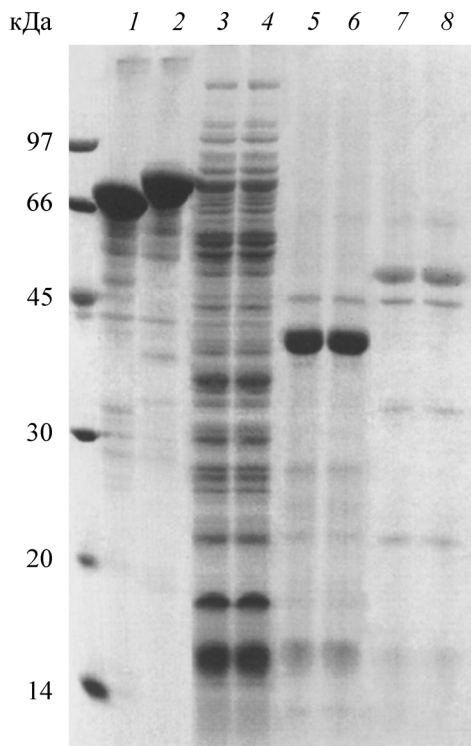


Рис. 2. Обработка белков спор *Paranosema grylli* N-гликозидазой F.

Пробы содержали: трансферрин человека (1, 2), внутренние белки спор (3, 4), поверхностные белки спор (5, 6) и белки полярной трубки (7, 8). 1, 3, 5, 7 — пробы обработаны ферментом, 2, 4, 6, 8 — контроль; ДСН-ПАГЭ.

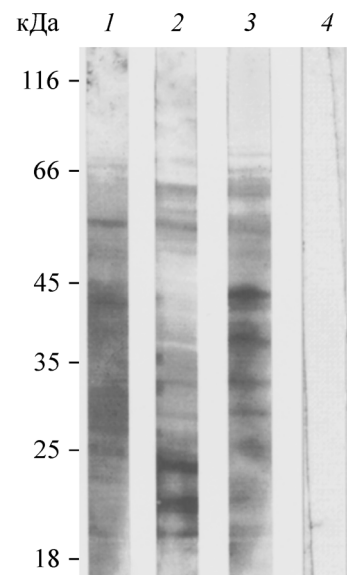


Рис. 3. Гибридизация общих белков хозяина (жирового тела сверчка) и спор *Paranosema grylli* с лектином WGA, конъюгированным с пероксидазой хрена.

Дорожки: 1, 2 — белки хозяина, соответственно окрашенные Понсо и инкубированные с WGA-пероксидазой; 3, 4 — белки спор паразита, соответственно окрашенные Понсо и инкубированные с WGA-пероксидазой.

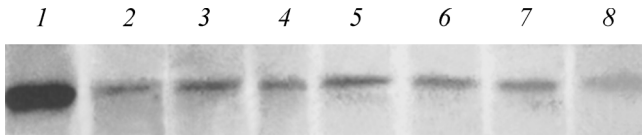


Рис. 4. Связывание основного белка оболочки спор *Paranosema grylli* с GNA-агарозой.

50 мкл экстрагированного из интактных спор белка (1) инкубировали в присутствии 100 (2) 50 (3, 4, 6—8) или 12.5 (5) мкл 50%-ной суспензии шариков агарозы с пришитым лектином; дополнительно связывание проводили в присутствии 1% Тритона X-100 (3) и после обработки белка β-маннозидазой (7), α-маннозидазой (8) или после контрольной инкубации в буфере для маннозидазы (6). Осадки отмывали и связавшиеся белки элюировали кипячением 10 мин в 50 мкл раствора 0.1 М Трис-HCl, pH 8.0, содержащего 2% ДСН и 5% 2-МЭ.

4), белков оболочки (рис. 2, дорожки 5, 6) и полярной трубки (рис. 2, дорожки 7, 8) не показал изменения электрофоретической подвижности после обработки данным ферментом. Это свидетельствует в пользу отсутствия N-связанных углеводных цепей в составе белков *P. grylli*.

С целью подтвердить данные, полученные в ходе экспериментов с N-гликозидазой F, общие фракции белков спор *P. grylli* и хозяина (жирового тела сверчка) были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и инкубированы в присутствии лектина WGA, выделенного из зародышей пшеницы и конъюгированного с пероксидазой хрена. Лектин WGA распознает остатки и олигомеры N-ацетил-β-D-гликозамина и, следовательно, является специфичным для N-гликозилированных белков. Как и следовало ожидать, WGA-пероксидазные конъюгаты распознавали целый ряд белков различной молекуляр-

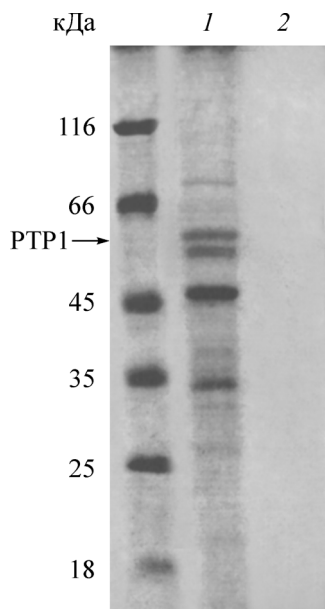


Рис. 5. Отсутствие специфического связывания экстрагированных белков полярной трубки *Paranosema grylli* с GNA-агарозой.

1 — споры после стимуляции выброса полярных трубок были отмывы в 3%-ном ДСН, белки полярной трубки экстрагированы в присутствии 5% 2-МЭ, раствор разбавлен водой в 2 раза; 2 — отсутствие специфического связывания при инкубации 70 мкл полученного экстракта в присутствии 40 мкл 50%-ной GNA-агарозы. РТР1 — основной белок полярной трубки (56 кДа).

ной массы в пробах жирового тела хозяина (рис. 3, дорожки 1, 2). В то же время в пробах спор ни один белок не продемонстрировал специфического окрашивания (рис. 3, дорожки 3, 4). На основании полученных данных можно сделать вывод об отсутствии N-гликозилированных белков в спорах данного вида микроспоридий.

Выявление остатков маннозы в структурных белках спор *P. grylli*. Как отмечалось выше, анализ предполагаемых кодирующих белок последовательностей в геноме микроспоридии *E. cuniculi* выявил наличие ферментов, участвующих в O-маннозилировании белков. В связи с этим представляло интерес получить биохимическое подтверждение присутствия остатков маннозы в составе различных белков микроспоридий, в первую очередь в составе структурных компонентов споры. С этой целью была проведена избирательная солюбилизация основного белка оболочки споры *P. grylli* р40 и белков полярной трубки (Долгих, Семенов, 2003) и предпринята попытка их преципитации в присутствии лектина GNA, конъюгированного с агарозными шариками. Данный лектин выделен из подснежника *Galanthus nivalis* и специфично распознает терминальные остатки маннозы. В результате эксперимента было показано, что, несмотря на отсутствие положительной реакции при окраске р40 в присутствии периода и реагента Шиффа, данный белок связывается с GNA-агарозой (рис. 4). Способность р40 связываться с лектином нарушалась после обработки белка α- и β-маннозидазами (рис. 4, дорожки 7, 8), но не зависела от присутствия в инкубационной среде 1% неионного детергента Тритона X-100 (рис. 4, дорожка 3), что свидетельствует о специфичности данного процесса. Однако в результате инкубации лишь часть солюбилизированного белка связывалась с GNA-агарозой. Поскольку инкубация одной и той же аликвоты солюбилизированного р40 с возрастающими объемами GNA-агарозы не приводила к заметному увеличению количества преципитируемого белка (рис. 4, дорожки 1, 2, 5), наблюдаемое частичное связывание не является следствием недостаточной емкости использованного сорбента.

В то же время ни один из трех экстрагированных белков полярной трубки не показал связывания с GNA-агарозой (рис. 5). Даже в случае РТР1, являющегося самым высокогликозилированным белком спор, не было обнаружено специфического узнавания маннозных остатков данным лектином.

Обсуждение

В последние время в научной литературе стали появляться первые биохимические данные, подтверждающие результаты расшифровки генома микроспоридии *E. cuniculi*. Эти исследования посвящены изучению особенностей гликозилирования основного белка полярной трубки РТР1 у микроспоридии *E. hellem* — представителя того же рода *Enccephalitozoon* (Xu et al., 2004). В частности, было показано, что электрофоретическая подвижность данного белка не изменяется в результате его обработки гликозидазами, специфичными к N-связанным углеводным цепям. Однако РТР1 *E. hellem* распознавался лектином ConA, специфичным к остаткам маннозы и глюкозы. Поскольку это связывание нарушалось в присутствии α-метил-маннопиранозида, авторы сделали вывод о маннозилировании РТР1.

В настоящей работе мы выбрали в качестве объекта исследования микроспоридию *P. grylli*. Представители рода *Paranosema* развиваются в жировом теле насекомых и филогенетически удалены от представителей рода *Encephalitozoon*, являющихся паразитами млекопитающих. Таким образом, сопоставление полученных нами результатов и данных из литературы позволяет сделать некоторые общие выводы об особенностях гликозилирования белков микроспоридий. В первую очередь следует признать, что неспособность клетки микроспоридий к N-связанному гликозилированию мембранных и секретрируемых белков, вероятнее всего, является общим свойством группы. Это подтверждается как результатами расшифровки генома *E. cuniculi*, так и биохимическими данными, полученными при изучении представителей двух филогенетически удаленных родов микроспоридий.

При этом микроспоридии сохранили способность к O-связанному маннозилированию белков. Об этом свидетельствует не только присутствие соответствующих генов в геноме *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001), но и биохимические данные, полученные при изучении особенностей гликозилирования основного белка полярной трубки *E. hellem* (Xu et al., 2004) и основного белка оболочки спор *P. grylli* (настоящая работа). Более того, в Интернете появилась информация о находящейся в печати статье, демонстрирующей присутствие в спорах микроспоридий *E. cuniculi* и *P. locustae* O-связанных гликанов, состоящих из линейных цепей α 1,2-связанных остатков маннозы (Taupin et al., 2007).

Вместе с тем ряд вопросов, связанных с маннозилированием белков микроспоридий, остается неясным. Например, не совсем понятно, почему лишь часть р40 *P. grylli* связывается с GNA-агарозой. Одно из возможных объяснений может быть связано с тем, что лишь часть молекул р40 содержит остатки маннозы. При этом количество углеводных остатков, связанных с отдельной молекулой, не является достаточным для визуального различия гликозилированной и негликозилированной форм белка при электрофорезе. Частичное дегликозилирование р40 может быть как результатом активности маннозидаз цитоплазмы клетки хозяина, так и следствием экстракции белка в щелочных условиях. Другое объяснение может быть связано с разной аффинностью лектина GNA к олигомерам маннозы. Данный лектин проявляет приблизительно в 10 раз более высокую связывающую способность по отношению к α 1,3-связанным терминальным остаткам маннозы, чем к остаткам, связанным α 1,2-связью (Shibuya et al., 1998). Поскольку в геноме микроспоридий обнаружена лишь α 1,2-маннозилтрансфераза, а α 1,3-маннозилтрансфераза отсутствует, связывающая способность GNA лектина по отношению к р40 и другим маннозилированным белкам микроспоридий может быть недостаточно высокой.

Открытым остается вопрос и об особенностях гликозилирования белков полярной трубки микроспоридий. Несмотря на интенсивное гликозилирование РТР1, экстрагированные белки полярной трубки *P. grylli* не показали связывания с GNA-агарозой. Как было отмечено выше, сходный результат был отмечен и в случае РТР1 *E. hellem* (Xu et al., 2004), несмотря на то что данный белок распознавался лектином ConA. Поскольку присоединение маннозных остатков, по-видимому, является единственным способом гликозилирования белков микроспоридий, полученный результат может быть связан как со

структурными особенностями РТР1, препятствующими взаимодействию углеводных цепей с данным лектином, так и с низкой связывающей способностью GNA по отношению к α 1,2-связанным терминальным остаткам маннозы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49616).

Список литературы

- Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. 1982. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир. 446 с.
- Долгих В. В., Семенов П. Б. 2003. Изучение белков оболочки спор и полярной трубки микроспоридии *Nosema grylli*: высвобождение основного белка оболочки спор предшествует процессу экстрюзии. Цитология. 45 (3) : 324—329.
- Dolgikh V. V., Semenov P. B., Mironov A. A., Beznousenko G. V. 2005. Immunocytochemical identification of the major exospore protein and three polar-tube proteins of the microsporidia *Paranosema grylli*. Protist. 156 : 77—87.
- Hayman J. R., Hayes S. F., Amon J., Nash T. E. 2001. Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian. Infect Immun. 69 : 7057—7066.
- Jay G. D., Culp D. J., Jahnke M. R. 1990. Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. Anal. Biochem. 185 : 324—330.
- Katinka M. D., Duprat S., Cornillot E., Metenier G., Thoma-rat F., Prenier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Winkler P., Delbac F., El Alaoui H., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivares C. P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature. 414 : 450—453.
- Kempa-Tomm S., Hoffmann K. H., Engelmann F. 1990. Vitellinogenin and vitellins of the mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*: isolation, characterization and quantification. Physiol. Entomol. 15 : 167—178.
- Kim J. H., Ogawa K., Wakabayashi H. 1999. Lectin-reactive components of the microsporidian *Glugea plecoglossi* and their relation to spore phagocytosis by head kidney macrophages of ayu *Plecoglossus altivelis*. Dis. Aquat. Organ. 39 : 59—63.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Lussier M., Sdicu A. M., Bussereau F., Jacquet M., Bussey H. 1997. The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. J. Biol. Chem. 272 : 15 527—15 531.
- Seleznov 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. J. Euk. Microbiol. 42 : 288—292.
- Shibuya N., Goldstein I. J., Van Damme E. J. M., Peumans W. J. 1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the Snowdrop (*Galanthus nivalis*) Bulb. J. Biol. Chem. 263 : 728—734.
- Sokolova Y. Y., Dolgikh V. V., Morzhina E. V., Nassonova E. S., Issi I. V., Terry R. S., Ironside J. E., Smith J. E., Vossbrinck C. R. 2003. 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. J. Invertebr. Pathol. 84 : 159—172.
- Tarentino A. L., Gomez C. M., Plummer T. H., Jr. 1985. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. Biochemistry. 24 : 4665—4671.
- Taupin V., Garenaux E., Mazet M., Maes E., Denise H., Prenier G., Vivares C. P., Guerardel Y., Metenier G., 2007. Major

O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing alpha-1,2 linkages. *Glycobiology*. 17 : 56—67. (Электронная версия опубликована 15 сентября 2006 г.).

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994. Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 : 426—461.

Xu Y., Takvorian P. M., Cali A., Orr G., Weiss L. M. 2004. Glycosylation of the major polar the protein of *Encephalitozoon hellem*, amicrosporidian parasite that infects humans. *Infect. Immun.* 72 : 6341—6350.

Поступила 13 XII 2006

PECULIARITIES OF PROTEIN GLYCOSYLATION IN THE SPORES OF THE MICROSPORIDIA

PARANOSEMA (ANTONOSPORA) GRYLLI

V. V. Dolgikh,¹ P. B. Semenov,¹ G. V. Beznusenko²

¹ All-Russian Institute for Plant Protection, St. Petersburg—Pushkin, Russia,
and ² Istituto di Ricerche Farmacologiche «Mario Negri», Santa Maria Imbaro (Chieti), Italy;

¹ e-mail: dol1slav@yahoo.com

Long adaptation of microsporidia, a large group of fungi-related protozoa, to intracellular lifestyle has resulted in drastic minimization of a parasite cell. Thus, diversity of carbohydrates in microsporidia glycoproteins and proteoglycans is expected to be restricted by O-linked manno-oligosaccharides because three genes involved in O-mannosylation of proteins and no components of N-linked glycosylation machinery were found in genome of human pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. In this study we investigated glycosylation of spore proteins of microsporidia *Paranosema (Antonospora) grylli* infecting crickets *Gryllus bimaculatus*. Using periodic acid-Schiff reagent staining we have demonstrated that some *P. grylli* spore proteins are highly-glycosylated. The major polar tube protein (PTP1) of 56 kDa was shown as the most intensively decorated band. The experiments with N-glycosidase F and WGA lectin did not reveal any N-glycosylated proteins in *P. grylli* spores. At the same time, incubation of major spore wall protein of 40 kDa (p40) with mannose specific lectin GNA resulted in specific binding that was reduced by pretreatment of the protein with mannosidases. Interestingly, in spite of PTP1 glycosylation, polar tube proteins extracted from *P. grylli* spores were not precipitated by GNA-agarose. Since *P. grylli* and *E. cuniculi* are distantly related, our data suggest that dramatic reduction of protein glycosylation machinery is a common feature of microsporidia.

Key words: microsporidia, spores, protein glycosylation, glycoproteins.