

УДК 576.893.195:577

### ОСОБЕННОСТИ КАТАБОЛИЗМА ТРЕГАЛОЗЫ В СПОРАХ МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA GRYLLI

© В. В. Долгих, П. Б. Семенов

У изученных к настоящему времени видов микроспоридий, обитающих в водных хозяевах, процесс экстрезии полярных трубок спор сопровождается превращением значительных количеств трегалозы в глюкозу под действием фермента трегалазы. Напротив, в спорах нескольких исследованных наземных видов микроспоридий в ходе экстрезии не наблюдается изменения состава углеводов. В данной работе с помощью методов энзиматического определения содержания глюкозы и бумажной хроматографии мы показали, что в спорах еще одного наземного вида микроспоридий *Nosema grylli* в ходе экстрезии ни образование глюкозы, ни гидролиз трегалозы не наблюдаются. Вместе с тем содержание трегалозы снижается в результате длительного хранения спор. Выявленная нами в спорах *N. grylli* активность  $\alpha, \alpha$ -трегалазы (КФ 3.2.1.28) имеет рН-оптимум в кислой области, что отличает ее от изученного другими авторами фермента из спор наземной микроспоридии *N. apis*, имеющего нейтральный рН-оптимум. В отношении зависимости активности от рН фермент *N. grylli* находится ближе к трегалазе из спор водной микроспоридии *N. algerae*, имеющей максимальную активность при рН 5.5. Все попытки обнаружить в спорах *N. grylli* активность другого потенциального фермента катаболизма трегалозы — фосфорилазы (синтазы) трегалозы (КФ 2.4.1.64) как по прямой, так и по обратной реакции не дали положительного результата. Отсутствие влияния экстрезии на содержание углеводов в спорах *N. grylli* и других наземных микроспоридий позволяет заключить, что для этих видов основной физиологической функцией гидролиза трегалозы под действием трегалазы является не резкое повышение внутриспорового осмотического давления с целью выброса полярной трубки, а постепенный катаболизм энергетических резервов для обеспечения выживания паразитов во внешней среде.

Микроспоридии являются группой облигатных внутриклеточных паразитических простейших, филогенетически близких к грибам (Van de Peer e. a., 2000; Weiss, 2001). Практический интерес к группе обусловлен чрезвычайно широким кругом хозяев микроспоридий, включающим представителей почти всех типов животного царства, а также возрастающим числом видов, описанных как патоген человека при различных формах иммунодефицита. Длительная адаптация микроспоридий к внутриклеточному паразитизму обусловила потерю паразитами ряда органелл (митохондрий, лизосом), различных метаболических путей и множества генов (Katinka e. a., 2001). Вместе с тем эволюция микроспоридий привела к формированию сложной споры, имеющей толстую оболочку и уникальный аппарат экстрезии (Vavra, Larsson, 1999; Cali, Takvorian, 1999).

Одной из интересных физиологических особенностей спор микроспоридий является очень высокое содержание в них трегалозы. В спорах микроспо-

ридии *Nosema algerae* концентрация этого дисахарида превышает 0.4 М (Undeen e. a., 1987). При этом было установлено, что у *N. algerae* экструзия полярной трубки и выброс инвазионного зародыша — спороплазмы сопровождаются снижением содержания трегалозы примерно в три раза и значительным повышением концентрации глюкозы внутри споры. Это позволило предположить, что гидролиз трегалозы под действием трегалазы непосредственно перед выбросом полярной трубки приводит к значительному повышению осмотического давления внутри споры, что и является движущей силой процесса экструзии (Undeen e. a., 1987; Undeen, 1990). Однако позднее было показано, что гидролиз трегалозы в ходе экструзии характерен только для микроспоридий, чьи хозяева обитают в водной среде. В спорах трех изученных наземных видов микроспоридий процесс экструзии не сопровождается какими-либо изменениями в углеводном составе (Undeen, Van der Meer, 1999).

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что особенности углеводного обмена спор отличаются у различных видов микроспоридий, и это может быть связано со средой обитания их хозяев. С этой точки зрения, интерес представляет изучение у разных видов микроспоридий свойств ключевых ферментов, непосредственно участвующих в катаболизме трегалозы. Активность такого фермента —  $\alpha, \alpha$ -трегалазы (КФ 3.2.1.28), гидролизующей молекулу трегалозы до двух молекул глюкозы, была изучена в спорах микроспоридии *N. apis* (наземная среда обитания хозяина) и *N. algerae* (водная среда обитания хозяина). В первом случае фермент имел рН-оптимум в нейтральной области (рН 7.0) (Vandermeer, Gochnauer, 1971), а во втором — в кислой (рН 5.5) (Undeen e. a., 1987). Более того, можно предположить, что удельная активность трегалазы в спорах наземного вида (*N. apis*) была значительно ниже, чем в спорах водного, так как авторы инкубировали реакционную смесь для тестирования активности трегалазы в течение 22 ч. при 38° (Vandermeer, Gochnauer, 1971), в то время как для определения достоверной активности фермента *N. algerae* было достаточно проведения реакции в течение 30 мин при 37° (Undeen e. a., 1987).

Данные о нейтральном рН-оптимуме гидролиза трегалозы в спорах *N. apis*, а также использование в вышеуказанных экспериментах по тестированию активности трегалазы фосфатного буфера в качестве реакционной среды позволили нам предположить, что у наземных видов микроспоридий первым ферментом катаболизма трегалозы может служить не трегалаза, а фосфорилаза (синтаза) трегалозы (КФ 2.4.1.64), превращающая при участии фосфат-иона молекулу трегалозы в молекулу глюкозы и молекулу глюкозо-1-фосфата. Этот фермент широко распространен у родственных микроспоридиям грибов и имеет рН-оптимум около 6.6 для прямой и около 6.2 для обратной реакции (Eis, Nidetzky, 1999). Кроме того, использование данного фермента являлось бы более выгодным для анаэробов-микроспоридий, так как позволило бы вовлекать в гликолиз глюкозо-1-фосфат без расходования АТФ в ходе реакции, катализируемой гексокиназой.

В настоящей работе показано, что в спорах еще одного наземного вида — микроспоридии *N. grylli* процесс экструзии также не сопровождается сколько-нибудь достоверным снижением концентрации трегалозы и образованием даже незначительных количеств глюкозы. Длительное хранение спор приводит к снижению содержания трегалозы в спорах. В гомогенатах спор выявлена активность трегалазы, имеющей рН-оптимум в кислой области. Тестирование активности фосфорилазы трегалозы в гомогенате спор как по прямой, так и по обратной реакции не дало положительного результата.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Споры *N. grylli*. Исследования выполнены на лабораторной популяции двупятнистых сверчков *Gryllus bimaculatus*, искусственно зараженных микроспоридией *N. grylli* (Соколова и др., 1994), развивающейся в жировом теле насекомых. Выделение и очистка спор были проведены согласно ранее описанным методикам (Seleznev e. a., 1995; Dolgikh e. a., 1997). Разрушение спор осуществляли либо в плотном ручном стеклянном гомогенизаторе в течение 30 мин, либо встряхиванием в течение 45 мин на микрошейкере в присутствии стеклянных бус (Bio-Rad, США). Процесс экструзии полярных трубок был стимулирован по методу, разработанному Курти и др. (Kurtti e. a., 1994). Очищенные споры были инкубированы в растворе 1 (1 мМ трис, 10 мМ ЭДТА- $\text{Na}_2$ ) в течение 30 мин при комнатной температуре, осаждены центрифугированием при 600 g 10 мин и ресуспендированы в 12 объемах раствора 2 (10 мМ КОН, 170 мМ КСl). После инкубации и центрифугирования при тех же условиях осадок был ресуспендирован в 6 объемах раствора 3 (25 мМ Tris, 10 мМ ЭДТА- $\text{Na}_2$ , 170 мМ КСl). В течение 15–20 мин после переноса спор в раствор 3 наблюдается выброс полярных трубок у 60–90 % спор.

Изучение влияния экструзии на содержание глюкозы и трегалозы в спорах. Очищенные споры (приблизительно 100 мкл осадка) были последовательно инкубированы в растворах 1, 2, 3 и после экструзии, наблюдавшейся у 80–90 % спор, суспензию спор дополнительно гомогенизировали в плотном стеклянном гомогенизаторе 15 мин в присутствии 5 %-ной хлорной кислоты и центрифугировали при 10 000 g 5 мин. Супернатант нейтрализовали добавлением 30 % КОН (конечный объем безбелкового экстракта составил около 900 мкл) и использовали для анализа содержания свободной глюкозы энзиматическим методом с использованием препаратов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гексокиназы. В качестве контроля использовали такое же количество интактных спор, разрушенных с помощью гомогенизатора в растворе 3. Депротеинизацию гомогената и нейтрализацию безбелкового экстракта проводили так же, как и в случае спор после экструзии.

С целью определения содержания трегалозы и глюкозы в спорах методом хроматографии на бумаге 50 мкл осадка свежeweделенных спор были последовательно инкубированы в растворах для стимуляции экструзии 1, 2 и ресуспендированы в 150 мкл раствора 3. После выброса полярных трубок (эффективность экструзии 70–80 %) споры были дополнительно разрушены встряхиванием со стеклянными бусами при 4°. Одновременно аналогичному разрушению были подвергнуты такие же объемы (50 мкл) осадков интактных (не подвергнутых стимуляции экструзии) свежeweделенных спор, а также интактных спор после различных сроков хранения, ресуспендированных в 150 мкл воды. Белки и нерастворимый дебрис удаляли кипячением на водяной бане в течение 10 мин с последующим центрифугированием при 16 000 g 10 мин. 6 мкл супернатанта наносили на хроматографическую бумагу. В качестве стандартов наносили 0.4 мкмоль глюкозы и 0.8 мкмоль трегалозы. Разделение проводили в течение ночи в системе изопропанол–вода (4:1), повторяя процедуру 3 раза после высушивания бумаги. Специфичную окраску на углеводы проводили с использованием нитрата серебра и гидроксида натрия (Досон и др., 1991).

Тестирование активности трегалазы и фосфорилазы трегалозы (прямая реакция). Очищенные споры (около 300 мкл осадка) ресуспендировали в 1.5 мл раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 1 мМ ЭДТА- $\text{Na}_2$ , 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ, и разрушали встряхиванием в присутствии стеклянных бус. Для сольюбилизации мембран к гомогенату добавляли до 0.5 % детергент

Тритон X-100, инкубировали в течение 10 мин и центрифугировали 10 мин при 16 000 g. С целью удаления нуклеиновых кислот и нуклеопротеиновых комплексов к супернатанту после центрифугирования добавляли сухой  $MnSO_4$  до конечной концентрации 60 мМ и после инкубации в течение 15 мин повторяли центрифугирование. К супернатанту после осаждения нуклеиновых кислот при постоянном перемешивании мелкими порциями добавляли сухой сульфат аммония (СА) до концентрации 35 %. После добавления последней порции СА инкубацию продолжали еще 15 мин. Белки осаждали центрифугированием при тех же условиях. Супернатант использовали для дальнейшего фракционирования высаливаемых белков, увеличивая концентрацию СА сначала до 75, а затем до 100 %. Реакцию среды контролировали с помощью лакмусовой бумажки и поддерживали добавлением 1 М раствора трис-аминометана (рН 7.2). Все вышеописанные операции и хранение осадков, полученных при фракционировании белков СА, осуществляли при 4°.

Активность трегалазы и фосфорилазы трегалозы (прямая реакция) тестировали в осадках после осаждения белков СА. Осадки ресуспендировали в 10 мМ Трис-НСI (рН 7.8) непосредственно перед добавлением в реакционную смесь, содержащую 50 мМ Na-фосфатного буфера и 100 мМ трегалозы (рН 7.0) или 50 мМ Na-ацетатного буфера, 50 мМ Na-фосфатного буфера и 100 мМ трегалозы (рН 5.0). Реакцию проводили в течение 20 ч при 30°, после чего белки удаляли кипячением проб на водяной бане в течение 10 мин с последующим центрифугированием.

Содержание глюкозы и глюкозо-1-фосфата в пробах определяли энзиматическим методом с использованием препаратов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы и фосфоглюкомутазы в качестве вспомогательных ферментов.

Тестирование фосфорилазы трегалозы по обратной реакции. Очищенные споры были разрушены в плотном стеклянном гомогенизаторе в присутствии 50 мМ MOPS-NaOH, 4 мМ ЭДТА-Na и 2 мМ 2-меркаптоэтанола (рН 6.6). Гомогенат центрифугировали при 16 000 g 10 мин, часть супернатанта использовали для тестирования активности фосфорилазы трегалозы. Активность фермента измеряли и в супернатанте, и в осадке, ресуспендированном в объеме буфера для гомогенизации, равном объему супернатанта. Оставшийся супернатант тщательно диализовали против 10 мМ MOPS-NaOH (рН 6.6) и также использовали для измерения активности фосфорилазы трегалозы. Разрушение спор, хранение и центрифугирование гомогенатов, а также диализ осуществляли при 4°. Реакционная смесь содержала 50 мМ MOPS-NaOH (рН 6.6), 200 мМ глюкозы, 20 мМ глюкозо-1-фосфата и приблизительно 160 мкг белка супернатанта (или равный объем ресуспендированного осадка). Конечный объем реакционной смеси составлял 1 мл. Контроль не содержал глюкозу. Реакцию проводили в течение 2 ч. при 30°. Белки удаляли добавлением хлорной кислоты до 2.5 % с последующим центрифугированием и нейтрализацией супернатанта добавлением 30 %-ной КОН. Концентрацию неорганического фосфата определяли по методу Ратбуна и Бетлах с использованием молибдата аммония и хлористого олова (Практикум по биохимии, 1989).

Концентрацию белка во всех пробах определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

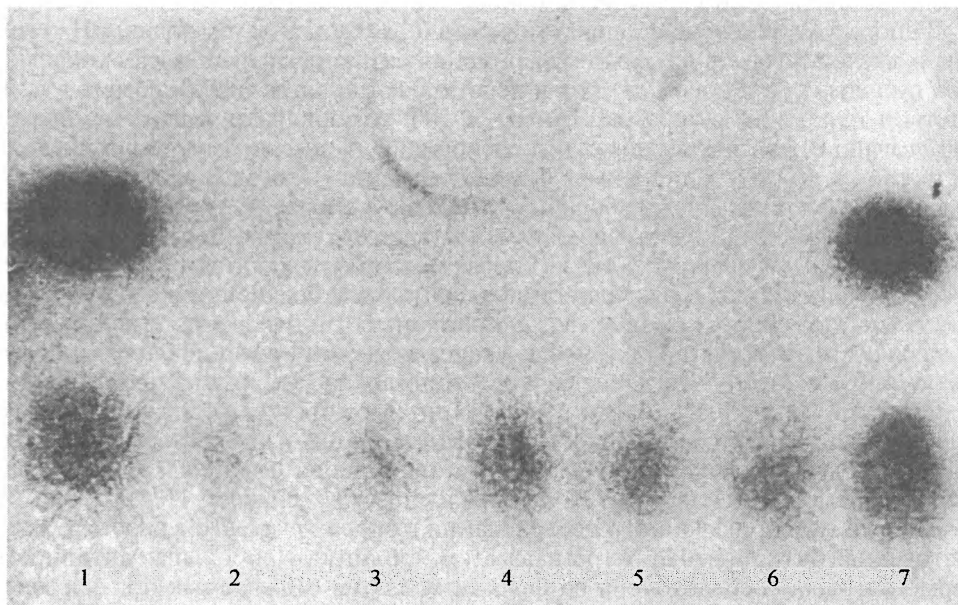
## РЕЗУЛЬТАТЫ

В спорах *N. grylli* процесс экстрезии не сопровождается образованием свободной глюкозы. Для изучения вопроса о том, происходит ли в спорах микроспоридии *N. grylli* гидролиз трегалозы в ходе экстрезии, был использован специ-

фичный высокочувствительный метод определения содержания глюкозы с помощью вспомогательных ферментов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Проведенное исследование показало, что в 100 мкл осадка спор после экструзии (эффективность экструзии составила около 80—90 %) общее количество свободной глюкозы было менее чем 4.75 нмоль. Таким образом, поскольку осадок после осаждения спор центрифугированием достаточно плотный и соответственно свободное пространство между спорами занимает незначительный объем, концентрация глюкозы в спорах после экструзии, рассчитанная на 1 л осадка, очевидно, не должна превышать 50 мкмоль. Исходя из данных, приведенных в литературе, нетрудно подсчитать, что у микроспоридии *N. algerae*, где имеет место быстрое превращение трегалозы в восстанавливающие сахара в ходе экструзии, концентрация глюкозы внутри споры возрастает до 0.15 М (Undeen e. a., 1987). Позднее эти данные были уточнены, согласно проведенным вновь измерениям, приблизительное содержание глюкозы в спорах после экструзии составило 37.6 мкг/3.75 · 10<sup>7</sup> спор (Undeen, Van der Meer, 1994). Если принять объем одной споры *N. algerae* равным 10.9 мкм<sup>3</sup> (Undeen, Frixione, 1990), то в 1 л спор содержится 91.8 г глюкозы, что соответствует концентрации 0.46 М.

Таким образом, в спорах *N. grylli* после экструзии концентрация свободной глюкозы более чем на 3 порядка ниже, чем в спорах *N. algerae*. Даже если учесть, что споры в осадке не занимают 100 % объема, общий вывод об отсутствии превращения значительных количеств трегалозы в глюкозу в ходе экструзии полярных трубок у микроспоридии *N. grylli* очевиден.

Содержание трегалозы в спорах *N. grylli* не изменяется в ходе экструзии, но снижается в ходе их длительного хранения. Изучение влияния экструзии на содержание трегалозы в спорах *N. grylli* было проведено с помощью метода хроматографии на бумаге (см. рисунок, 1—7). При этом было показано, что



Разделение сахаров спор микроспоридии *Nosema grylli* методом бумажной хроматографии. 1, 7 — стандарт (0.8 мкмоль трегалозы и 0.4 мкмоль глюкозы); 2 — споры, хранившиеся в течение 2.5 лет в водном растворе 0.01 %-го азиды натрия; 3 — споры, хранившиеся в воде в течение 4 лет при 4°; 4 — споры, хранившиеся в воде в течение 1 года при 4°; 5 — свежевыделенные интактные (не подвергнутые экструзии) споры; 6 — свежевыделенные споры после экструзии.

Separation of sugars from microsporidia *Nosema grylli* spores.

использованный метод разделения и специфичной окраски сахаров позволяет четко разделить и идентифицировать трегалозу и глюкозу. В качестве стандартов на крайние дорожки (1, 7) нами были нанесены 0.8 мкмоль трегалозы и 0.4 мкмоль глюкозы. Более яркая окраска глюкозы, несмотря на более низкое содержание в пробе, объясняется тем, что этот моносахарид, в отличие от трегалозы, является восстанавливающим.

Если допустить, что окраска пятна, соответствующего трегалозе в свежeweделенных интактных спорах, (5) приблизительно в 2—4 раза менее интенсивна по сравнению со стандартом, то содержание трегалозы в спорах при эффективности разрушения около 80 % будет составлять 0.08—0.16 М. При этом процесс экструзии в тех же самых спорах не вызывает достоверного изменения концентрации трегалозы и появления какого-либо количества глюкозы (6). Последний результат согласуется с приведенными выше данными о низкой концентрации свободной глюкозы в спорах после экструзии. Вместе с тем хранение спор при 4° в течение 4 лет приводит к значительному снижению в них содержания трегалозы (3), что может быть связано с постепенным использованием дисахарида в качестве источника энергии. Вероятно, интенсивность расходования трегалозы в спорах зависит от температуры их хранения, поскольку интенсивность окраски пятен в пробах спор, хранившихся в течение 2.5 лет при комнатной температуре в водном растворе 0.01 %-го азидата натрия, была еще ниже (2), чем при хранении спор при 4° в течение 4 лет. Содержание трегалозы в спорах, хранившихся в течение года при 4°, не снижалось по сравнению со свежeweделенными спорами. Окраска пятна в этом случае была даже несколько интенсивнее (4), что, по-видимому, связано с более эффективным разрушением старых спор (около 100 %) по сравнению со свежими (75—80 %). Эти данные позволяют предположить, что интенсивность катаболизма трегалозы в спорах *N. grylli* относительно невысока.

В спорах *N. grylli* обнаружена активность  $\alpha$ ,  $\alpha$ -трегалазы, имеющей рН-оптимум в кислой области. С целью обнаружения активности трегалазы в спорах *N. grylli* суспензия разрушенных спор в первую очередь была инкубирована в присутствии неионного детергента Тритон X-100, солюбилизирующего мембраны. Это связано с тем, что в спорах микроспоридии *N. algerae* были выявлены как растворимая, так и нерастворимая формы фермента (Undeen e. a., 1987). Исходя из данных об отсутствии катаболизма трегалозы в спорах *N. grylli* в момент экструзии и о его низкой интенсивности в покоящихся спорах, мы предположили, что удельная активность трегалазы в спорах может быть достаточно низкой. С целью увеличения удельной активности фермента была предпринята его частичная очистка, включающая удаление нуклеиновых кислот и нуклеопротеиновых комплексов сульфатом марганца, и последующее фракционирование белков с помощью СА. Кроме того, осаждение белков СА позволило удалить из проб эндогенную трегалозу, присутствующую в достаточно высоких количествах в спорах. С целью повышения чувствительности метода тестирования активности трегалазы мы значительно увеличили (до 20 ч) время проведения реакции, как это имело место в случае микроспоридии *N. apis* (Vandermeer, Gochbauer, 1971).

В результате проведенного исследования в спорах *N. grylli* была обнаружена достоверная активность  $\alpha$ ,  $\alpha$ -трегалазы (см. таблицу). Наибольшая активность фермента была сосредоточена во фракции белков, осаждаемых при насыщении СА от 35 до 75 %. В этой фракции также наблюдалась и максимальная удельная активность трегалазы. Обнаруженный фермент имеет рН-оптимум в кислой области, поскольку активность при рН 5.0 во всех фракциях была в 1.8 раз выше, чем при рН 7.0. Исходя из приведенных в таблице значений можно подсчитать, что фермент имеет относительно низкую удельную активность в супернатанте гомогената спор *N. grylli*, которая составляет около 73.8 и



Активность трегалазы во фракциях после осаждения сульфатом аммония растворимых белков спор (нм глюкозы/час)

Trehalase activity in fractions after precipitation of *N. grylli* spore proteins by ammonium sulfate (nmol of glucose/hour)

Фракция, полученная при насыщении СА	Объем фракции, мл	Концентрация белка, мг/мл	Активность при pH 5.0		Активность при pH 7.0	
			общая	удельная	общая	удельная
0—35 %	0.26	1.9	13.4	27.1	7.5	15.2
35—75 %	0.33	3.52	163.2	140.5	90.1	77.5
75—100 %	0.24	1.4	6.8	20.1	3.5	10.5
Супернатант после 100 %	2.9	0.17	Активность не обнаружена			

40.7 нмоль/ч/мг белка соответственно при pH 5.0 и 7.0. Однако эти данные носят лишь предварительный характер, и для их уточнения необходимо проведение измерений активности на более коротких отрезках времени.

Активность фосфорилазы трегалозы не была обнаружена в спорах *N. grylli*. Тестирование фосфорилазы трегалозы в гомогенатах спор *N. grylli* первоначально было проведено с использованием метода измерения активности по обратной реакции синтеза трегалозы из глюкозы и глюкозо-1-фосфата с образованием неорганического фосфата. При этом среда для разрушения спор и реакционная смесь для тестирования активности были идентичны используемым при изучении фосфорилазы трегалозы гриба *Schizophyllum commune* (Eis, Nidetzky, 1999). Однако достоверной активности фермента нами обнаружено не было. Поскольку активность фермента при использовании данного метода определяется по образованию неорганического фосфата, в некоторых экспериментах было проведено удаление эндогенного фосфата путем диализа супернатанта после центрифугирования гомогената спор. Эта процедура способствовала увеличению чувствительности метода, но также не позволила обнаружить активность фосфорилазы трегалозы.

Еще одна попытка обнаружить активность этого фермента была предпринята при проведении вышеописанных экспериментов по тестированию активности трегалазы в осадках после фракционирования белков спор сульфатом аммония. При этом использовалась одна и та же реакционная смесь как для трегалозы, так и для фосфорилазы трегалозы, содержащая 100 мМ трегалозу и 50 мМ Na-фосфатный буфер. Если активность трегалазы оценивали измерением количества образовавшейся глюкозы с помощью вспомогательных ферментов гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, то активность фосфорилазы трегалозы оценивали измерением образовавшегося глюкозо-1-фосфата с помощью фосфоглюкомутазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При этом в отличие от трегалазы активность фосфорилазы трегалозы была ниже предела чувствительности использованного метода определения активности (1—2 нмоль глюкозы/час/мг белка).

На основании приведенных данных можно сделать вывод об отсутствии данного фермента в спорах микроспоридии *N. grylli*.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Приведенные в работе результаты о том, что в спорах *N. grylli* экструзия не влияет на содержание трегалозы и свободной глюкозы, полностью согласуются с данными, полученными для других видов микроспоридий, обитающих в на-

земных хозяевах (Undeen, Van der Meer, 1999). При этом в спорах *N. grylli* обнаружен фермент трегалаза, имеющий рН-оптимум в кислой области, что отличает его от аналогичного фермента другой наземной микроспоридии *N. apis*, имеющего рН-оптимум около 7.0. В этом отношении трегалаза *N. grylli* ближе к ферменту микроспоридии *N. algerae*, для которой характерны развитие в водных хозяевах и быстрое превращение трегалозы в восстанавливающие сахара в ходе экструзии. Отсутствие гидролиза трегалозы в ходе экструзии у части изученных видов микроспоридий не означает, что ее высокая концентрация внутри спор не играет важной роли в создании осмотического давления. Однако главной физиологической функцией фермента трегалазы у таких видов, очевидно, является не быстрый гидролиз трегалозы для создания осмотического давления, а медленное расходование внутриспоровых энергетических запасов в ходе длительного сохранения спор во внешней среде. Это подтверждается результатами нашего исследования и данными других авторов (Undeen, Solter, 1996) о снижении содержания сахаров в ходе хранения спор микроспоридий. С этим, вероятно, связана и более низкая активность фермента в спорах *N. grylli* и *N. apis* по сравнению со спорами *N. algerae*. Вместе с тем остается невыясненным вопрос, почему в отношении зависимости от рН фермент *N. grylli* находится ближе к трегалазе *N. algerae*, а не другого наземного вида *N. apis*.

Участие трегалазы в энергетическом обмене спор было подтверждено в результате полной расшифровки генома микроспоридии *Encephalitozoon cuniculi*. Компьютерный анализ позволил обнаружить в его составе последовательность гена, кодирующего гексокиназу — фермент, участвующий в фосфорилировании образующейся под действием трегалазы глюкозы, что является необходимым условием ее дальнейшего превращения в реакциях гликолиза. Были обнаружены и гены, кодирующие трегалазу и гликолитические ферменты (Katinka e. a., 2001).

Следует отметить, что ферменты гликолиза были обнаружены нами ранее и в спорах *N. grylli* (Dolgikh e. a., 1997). Однако активность гексокиназы в этом случае была ниже предела чувствительности использованной методики тестирования. Это позволило нам предположить, что по крайней мере у части видов микроспоридий катаболизм трегалозы может проходить под действием фермента фосфорилазы (синтазы) трегалозы. Глюкозо-1-фосфат, образующийся в ходе реакции, может превращаться под действием присутствующей у микроспоридий фосфоглюкомутазы в глюкозо-6-фосфат и поступать в гликолиз без расходования АТФ в ходе реакции, катализируемой гексокиназой. Последнее заключение является особенно важным, поскольку единственным ферментом гликолиза, участвующим в реокислении НАДН, у микроспоридий является глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (Dolgikh e. a., 1997; Katinka e. a., 2001). Таким образом, поступающая в гликолиз молекула глюкозы, вероятнее всего, превращается в молекулу пирувата и молекулу глицерол-3-фосфата (глицеролкиназа у микроспоридий не обнаружена). В этом случае чистый выход АТФ в ходе гликолиза возможен только при отсутствии реакции, катализируемой гексокиназой. Однако данные об отсутствии гена, кодирующего фосфорилазу трегалозы у микроспоридии *E. cuniculi* (Katinka e. a., 2001) и одновременное наличие в геноме последовательностей, кодирующих трегалазу и гексокиназу, свидетельствовали против данной гипотезы. Приведенные в нашей работе данные об отсутствии активности фосфорилазы трегалозы и наличии трегалазы в спорах *N. grylli* позволяют заключить, что именно трегалаза является первым ключевым ферментом энергетического катаболизма в спорах различных видов микроспоридий. В этом случае вопрос об обеспечении чистого выхода АТФ при катаболизме трегалозы и состав конечных продуктов энергетиче-



ческого обмена в спорах микроспоридий требуют своего дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, № 01.04.49123а).

#### Список литературы

- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
- Практикум по биохимии. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.
- Соколова Ю. Я., Селезнев К. В., Долгих В. В., Исси И. В. Микроспоридия *Nosema grylli* n. sp. из сверчков *Gryllus bimaculatus* // Паразитология. 1994. Т. 28, вып. 6. С. 488—493.
- Cali A., Takvorian P. M. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia // The Microsporidia and Microsporidiosis. M. Amer. Soc. Microbiol. Washington, D.C., 1999. P. 85—128.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248—254.
- Dolgikh V., Sokolova J., Issi I. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian, *Nosema grylli* // Journ. Euk. Microbiol. 1997. Vol. 44. P. 246—249.
- Eis C., Nidetzky B. Characterization of trehalose phosphorylase from *Schizophyllum commune* // Biochem. Journ. 1999. Vol. 341. P. 385—393.
- Katinka M. D. e. a. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi* // Nature. 2001. Vol. 414. P. 450—453.
- Kurtti T. J., Ross S. E., Liu Y., Munderloh U. G. In vitro developmental biology and spore production in *Nosema furnacalis* (Microspora: Nosematidae) // Journ. Invertebr. Pathol. 1994. Vol. 63. P. 188—196.
- Sелезнев К., Исси И., Долгих В., Белостотская Г., Антонова О., Соколова Ж. 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. 1995. Vol. 42. P. 288—292.
- Undeen A. H. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores // Journ. Theor. Biol. 1990. Vol. 142. P. 223—235.
- Undeen A. H., ElGazzar L. M., Van der Meer R. K., Narang S. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae) // Journ. Invertebr. Pathol. 1987. Vol. 50. P. 230—237.
- Undeen A. H., Frixione E. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores // Journ. Protozool. 1990. Vol. 37. P. 561—567.
- Undeen A. H., Solter L. F. The sugar content and density of living and dead microsporidian (Protozoa; Microspora) spores // Journ. Invertebr. Pathol. 1996. Vol. 67. P. 80—91.
- Undeen A. H., Van der Meer R. K. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: a quantitative study // Journ. Euk. Microbiol. 1994. Vol. 41. P. 129—132.
- Undeen A. H., Van der Meer R. K. Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination // Journ. Invertebr. Pathol. 1999. Vol. 73. P. 294—302.
- Van de Peer Y., Ben Ali A., Meyer A. Microsporidia accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi // Gene. 2000. Vol. 246. P. 1—8.
- Vandermeer J. W., Gochnauer T. A. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis* // Journ. Invertebr. Pathol. 1971. Vol. 17. P. 38—41.
- Vavra J., Larsson J. I. R. 1999. Structure of the microsporidia // The Microsporidia and Microsporidiosis. Amer. Soc. Microbiol. Washington: D.C., 7—84.
- Weiss L. M. Microsporidia: emerging pathogenic protists // Acta Trop. 2001. Vol. 78. P. 89—102.

ВИЗР, СПб.—Пушкин-8, 196608

Поступила 20.02.2003

#### PECULIARITIES OF THE TREHALOSE CATABOLISM IN MICROSPORIDIA NOSEMA GRYLLI SPORES.

V.V. Dolgikh, P.B. Semenov

*Key words:* microsporidia, spores, trehalose, glucose, catabolism.

## SUMMARY

Some differences in trehalose catabolism were found for terrestrial and aquatic microsporidian species (Undeen, Van der Meer, 1999). In microsporidia species from aquatic hosts, the spore extrusion causes the intrasporal trehalose hydrolysis by trehalase that is followed by the drastic rise of reducing sugars (glucose) concentration. On the contrary, in tested terrestrial microsporidian species, total and reducing sugars remain unchanged through the germination. In this study we demonstrate by means of the enzymatic and paper chromatography methods, that in spores of microsporidia *Nosema grylli*, infecting fat bodies of crickets *Gryllus bimaculatus*, neither an increase of glucose concentration nor a reduction in intrasporal trehalose content takes place during the spore discharge. In this respect *N. grylli* is close to other terrestrial species. However, we have revealed in *N. grylli* spores activity of  $\alpha,\alpha$ -trehalase (EC 3.2.1.28) with acid pH-optimum like it was found by other authors in spores of aquatic microsporidia *N. algerae*. This result differs from the neutral pH-optimum (7.0) of trehalase of other terrestrial microsporidia *N. apis*. Concentration of trehalose in *N. grylli* spores reduces during long-term storage. All attempts to detect an activity of trehalose phosphorylase (synthase) (KФ 2.4.1.64), other potential key enzyme for trehalose catabolism in *N. grylli* spores have failed. The absence of changes of the sugar content in terrestrial microsporidian spores during the extrusion indicates, that the main physiological role of trehalose hydrolysis by trehalase in these species is catabolism of energy reserves for providing the long-term survival in the environment.