

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шамрайчук Ирина Леонидовна

**ВНЕКЛЕТОЧНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗ САПРОТРОФНЫХ И
ФИТОПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ**

1.5.18 – Микология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе белков растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского и на кафедре микологии и альгологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научные руководители: *Дунаевский Яков Ефимович*
доктор биологических наук, профессор
Белякова Галина Алексеевна
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: *Терехова Вера Александровна*
доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры земельных ресурсов и оценки почв, зав. аккредитованной лабораторией экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Домаш Валентина Иосифовна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник института экспериментальной ботаники НАН Беларуси
Осмоловский Александр Андреевич
кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, заместитель декана по академической политике и развитию интернационализации биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита диссертации состоится «9» декабря 2022 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, аудитория 389.

E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/503751728/>

Автореферат разослан «__» ноября 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. В настоящее время актуальной проблемой, связанной с выявлением механизмов фитопатогенеза, остается идентификация и исследование молекулярных факторов вирулентности. Гидролитические ферменты, участвующие в деградации клеточных стенок, и некоторые другие соединения являются потенциальными кандидатами на роль таких факторов, определяющих способность патогена поражать растение-хозяина. Наименее изученный аспект их взаимодействия связан с адаптацией паразита к меняющимся условиям питания, так как особенностью факультативных патогенов является их способность существовать в паразитической и сапрофитной фазах.

Среди гидролитических ферментов, секретируемых микроорганизмами, значительную роль играют пептидазы. Микроорганизмы вырабатывают широкий спектр внутриклеточных и внеклеточных протеолитических ферментов (эндо- и экзопептидаз). Одна из главных ролей внеклеточных пептидаз заключается в расщеплении белков во внешней среде, что позволяет микроорганизмам абсорбировать и использовать гидролизованые субстраты роста.

Перспективным объектом для изучения и источником внеклеточных гидролаз являются грибы. Грибы способны менять свой образ жизни, чтобы адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Их экологическая стратегия связана с секрецией гидролитических ферментов в окружающую среду и поступлением питательных веществ в мицелий в виде расщепленных молекул субстрата.

Внеклеточные пептидазы грибов занимают особое место среди гидролитических ферментов микробного происхождения ввиду множества выполняемых ими функций, а также возможности их использования в различных отраслях промышленности. Полагают, что в некоторых взаимодействиях грибов-растения эти ферменты могут функционировать как факторы или маркеры патогенности.

Степень разработанности темы. Пептидазы рассматриваются многими авторами как потенциальные факторы вирулентности. Однако в группу специфических для патогенеза веществ пептидазы попали сравнительно недавно, во многом благодаря открытию большого разнообразия пептидаз у микромицетов. В эту группу включают, в первую очередь, сериновые и аспартатные пептидазы. Необходимо отметить, что в последнее время все чаще появляются сведения о совместном или взаимосвязанном действии факторов вирулентности. Однако в целом такие

данные не многочисленны, что определяет актуальность более подробного изучения этого вопроса.

Цель работы состояла в комплексном сравнительном изучении активности внеклеточных пептидаз различных видов и штаммов микромицетов, принадлежащих к определенным трофическим группам, ее участия в патогенезе, а также влияния на нее факторов внешней среды. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сравнить общую внеклеточную протеолитическую активность и спектры секретируемых пептидаз у представителей различных эколого-трофических групп мицелиальных микромицетов.
2. Оценить влияние некоторых факторов (возраста культуры, рН среды культивирования, концентрации кислорода, типа источника азота) на протеолитическую активность у мицелиальных микромицетов.
3. Выявить пептидазы, специфичные для фитопатогенов.
4. Оценить связь секреции пептидаз с некоторыми биологическими особенностями исследованных микромицетов.

Объект и предмет исследования. **Объект исследования** – сапротрофные и фитопатогенные мицелиальные микромицеты. **Предмет исследования** – их внеклеточная протеолитическая активность.

Степень научной новизны. В работе проведено комплексное изучение внеклеточных протеолитических ферментов мицелиальных микромицетов с учетом биологических свойств исследованных штаммов. Определены спектр и внеклеточная активность пептидаз у 26 штаммов некоторых видов микромицетов, в том числе фитопатогенных, при их росте на среде с белковым индуктором. Среди них выявлены перспективные продуценты с наибольшей активностью.

Для 2-х фитопатогенных видов – *Botrytis cinerea* Pers. и *Fusarium roseum* Link – впервые исследована зависимость секретируемой протеолитической активности от присутствия в среде растительных клеточных стенок.

Экспериментально доказана последовательная динамика появления в среде внеклеточной протеолитической активности, проявляемой различными группами пептидаз *B. cinerea*.

Впервые показана положительная корреляция между уровнями образования меланина и внеклеточной активностью пептидаз у агрессивных штаммов фитопатогенного вида *Alternaria linariae* (Neerg.) E.G.Simmons. Выявлено, что для данных штаммов также характерна и высокая активность трипсин-подобных ферментов, возможных маркеров фитопатогенного процесса.

Показано присутствие у мицелиальных грибов секретлируемых ингибиторов пептидаз, не связанных с регуляцией активности собственных протеолитических ферментов, а выполняющих, по-видимому, защитную функцию.

Теоретическая и практическая значимость. Получены данные, позволяющие предполагать участие трипсин-подобных пептидаз в процессе фитопатогенеза у грибов, что важно учитывать при создании устойчивых к грибным заболеваниям сортов растений. Оценено значение величин рН, создаваемых микромицетами, фаз роста, кислород-дефицитных условий, а также источника азота в среде для синтеза и активности определенных групп пептидаз. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти факторы играют немаловажную роль при протеолизе белковых субстратов, проводимом микромицетами в занимаемых ими экологических нишах. Установлена видоспецифичность элементов протеолитической системы грибов.

Результаты работы вносят вклад в изучение взаимодействия патоген-растение и могут быть полезны как для биотехнологического получения различных целевых пептидаз, а также ингибиторов пептидаз, так и при чтении курсов лекций, связанных с биохимией грибов.

Методология исследования. В работе использованы методы микологических исследований (культивирование, поддержание чистых культур грибов), биохимические методы (определение общей и класс-специфической протеолитической активности, ингибиторный анализ, гель-фильтрация и ионообменная хроматография пептидаз), физико-химические методы (определение принадлежности пигментов к группе меланинов), анализ литературных данных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Фитопатогенным микромицетам свойственна значительная активность трипсин-подобных пептидаз.
2. Индукторами образования пептидаз могут быть как отдельные белки, так и растительные клеточные стенки, содержащие белок в своем составе.
3. Прослежена связь между агрессивностью некоторых фитопатогенных грибов и образованием пептидаз и меланинов у *A. linariae*.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на XXI и XXIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014, 2016), Международной конференции по биохимии и молекулярной биологии (Вена, 2014), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической

химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015).

Личный вклад автора. Автором проведены все описанные в работе исследования.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и 5 тезисов докладов. В 8 работах (включая 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI) вклад автора является определяющим. Автор принимал активное участие в постановке научных задач и их решений, анализе полученных результатов и предоставлении их в печати.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 123 страницах, содержит 53 иллюстрации (в том числе таблицы). Список литературы включает 192 источника.

Основное содержание работы

Материалы и методы

Штаммы микромицетов и условия их хранения. В работе были использованы 38 штаммов микромицетов из родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* и *Trichoderma*, полученных из коллекций ВИЗРа, кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и ВКПМ.

Эти микромицеты относились к различным эколого-трофическим группам.

Культуры хранили на стандартной агаризованной среде Чапека.

Для изучения протеолитической активности штаммы культивировали в жидкой среде Чапека, в которой NaNO_3 заменен на казеин (1%), добавляемый в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4. Секрецию и активность пептидаз *B. cinerea* и *F. roseum* исследовали также при росте на стандартной среде Чапека и среде Чапека без NaNO_3 , содержащей клеточные стенки растения *Vigna radiata* (3%). Культивирование проводили в качалочных колбах на 100 мл (180 об./мин) при 22° С в течение 7 суток, при исследовании динамики протеолитической секреции – в течение 2 – 20 суток на шейкере модели Excella E24R. В качестве источника внеклеточных пептидаз использовали культуральную жидкость.

Общую протеолитическую активность культуральной жидкости грибов определяли по азоказеину. Класс-специфическую протеолитическую

активность определяли по гидролизу специфических синтетических хромогенных субстратов. ВАРНА ($N\alpha$ -benzoyl-L-Arg-pNA) (в концентрации 20 мМ) использовали для измерения трипсин-подобной, GlpAALpNA (Glp-Ala-Ala-Leu-pNA) (20 мМ) – субтилизин-подобной, GlpFpNA (Glp-Phe-pNA) (10 мМ) – химотрипсин-подобной активности и GlpFApNA (Glp-Phe-Ala-pNA) (20 мМ) – активности цистеиновых пептидаз. Аминопептидазную активность определяли с L-pNA (L-Leu-pNA) (40 мМ) и F-pNA (L-Phe-pNA) (35 мМ).

Определение класс-специфической активности проводили с помощью ингибиторного анализа с PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) (ингибитора сериновых пептидаз), TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone HCl) (ингибитора трипсина), EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate) (ингибитора металлопротеаз), 1,10-фенантролина (ингибитора металлопротеаз) и E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane) (ингибитора цистеиновых пептидаз).

Молекулярные массы пептидаз определяли гель-фильтрацией на Superdex 200.

Препарат растительных клеточных стенок получали последовательной промывкой листовых пластинок маша *Vigna radiata* ацетоном, NaOH и HCl.

Влияние пониженных концентраций кислорода на протеолитическую активность исследовали частичным или полным вытеснением аргоном воздушной фазы над средой во флаконах с культурами грибов.

Внеклеточные пигменты штаммов вида *A. linariae* были отнесены к группе меланинов по физико-химическим свойствам (по методике, описанной Babitskaya et al., 2000).

Был проведен скрининг внеклеточных ингибиторов папаина, бромелаина, трипсина, химотрипсина и субтилизина среди некоторых штаммов грибов.

Все эксперименты были проведены в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

Сравнение общей внеклеточной протеолитической активности и спектров секретируемых пептидаз у разных штаммов мицелиальных грибов

Полученные данные по общей протеолитической активности микромицетов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Общая активность внеклеточных пептидаз и некоторые свойства культур микромицетов при росте в жидкой среде

№	Штамм	Период роста, сутки	Биомасса мицелия, г сух. миц./л	рН КЖ	Протеолитическая активность, ед./г сух. мицелия		
					рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0
1	<i>Alternaria alternata</i> 2n	7	13,56	6,5	9,34	10,87	10,96
2	<i>A. kulundii</i> M309	10	23,95	5,9	4,06	6,65	9,58
3	<i>A. kulundii</i> M310	10	11,32	6,1	2,94	8,07	8,07
4	<i>Alternaria</i> sp.	7	21,70	6,7	4,46	5,68	6,08
5	<i>A. linariae</i> MF-P580-141	10	21,66	6,4	0,95	1,11	0,92
6	<i>A. linariae</i> MF-P641-011	10	8,18	6,6	2,85	5,20	3,16
7	<i>A. linariae</i> MF-P645-011	10	5,03	6,1	1,06	2,12	0,8
8	<i>A. linariae</i> MF-P649-011	10	23,82	6,6	1,12	1,09	0,9
9	<i>A. linariae</i> MF-P658-021	10	14,01	6,1	2,19	7,14	6,72
10	<i>A. linariae</i> MF-P680-021	10	13,45	6,4	5,21	12,89	6,01
11	<i>Botrytis cinerea</i>	7	27,58	4,4	6,92	4,26	3,68
12	<i>Fusarium anguioides</i> MFG 103100	7	23,72	6,5	4,73	5,23	5,86
13	<i>F. anguioides</i> MFG 108802	7	15,62	6,5	11,42	15,16	22,63
14	<i>F. anguioides</i> MFG 111502	7	18,49	6,4	6,96	7,75	13,05

15	<i>F. anguioides</i> MFG 119913	7	19,13	6,5	13,07	16,55	22,36
16	<i>F. chlamydosporum</i>	20	11,87	5,5	4,41	5,29	5,70
17	<i>F. oxysporum</i> F137	7	15,78	6,2	3,82	4,42	5,27
18	<i>F. roseum</i> ВКПМ F-900	7	7,19	5,5	16,60	18,82	17,43
19	<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 1)	7	25,33	4,6	8,11	5,92	4,12
20	<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 2)	7	21,28	4,6	9,15	7,11	3,64
21	<i>Trichoderma</i> sp. C16-05	20	1,49	7,1	18,31	28,09	28,79
22	<i>T. asperellum</i> K-1	7	17,08	6,8	3,12	2,30	3,47
23	<i>T. asperellum</i> Mg-6	7	19,03	6,9	3,36	2,14	2,31

Как видно из приведенной таблицы, среди активных продуцентов пептидаз – штаммы рода *Fusarium*: *F. anguioides* MFG 108802 и MFG 119913, *F. roseum* ВКПМ F-900. У более половины штаммов исследованных грибов оптимум активности явно сдвинут к более щелочному pH (pH 8,0). Результаты показали, что уровень протеолитической активности зависит не столько от видовой, сколько от штаммовой принадлежности микромицетов.

Изучение спектра специфической протеолитической активности у 26 штаммов мицелиальных грибов показало, что у большинства исследованных фитопатогенных штаммов и видов микромицетов (*B. cinerea*, *F. anguioides*, *F. oxysporum* и *F. roseum*) присутствует значительная трипсин-подобная активность (таблица 2).

Таблица 2. Спектр специфической протеолитической активности культур микромицетов при росте в жидкой среде

№	Штамм	Активность, ед./г сух. мицелия					
		Трипсин-подобная активность (субстрат BApNA)	Субтилизин-подобная активность (субстрат GlpAALpNa)	Химотрипсин-подобная активность (субстрат GlpFpNa)	Активность цистеиновых протеиназ (субстрат GlpFApNa)	Аминопептидазная активность	
						субстрат L-pNa	субстрат F-pNa
1	<i>Alternaria alternata</i> 2n	9,83	70,80	16,72	0	129,93	26,34
2	<i>A. kulundii</i> M309	18,22	23,53	0	0	18,30	68,06

3	<i>A. kulundii</i> M310	108,65	164,73	70,80	0	167,70	155,68
4	<i>Alternaria</i> sp.	78,66	47,32	23,35	0	131,68	46,64
5	<i>A. linariae</i> MF- P580-141	9,37	81,62	5,80	11,60	2,23	10,70
6	<i>A. linariae</i> MF- P641-011	33,98	43,49	0	36,70	0	0
7	<i>A. linariae</i> MF- P645-011	55,64	0	7,9	0	85,17	80,44
8	<i>A. linariae</i> MF- P649-011	4,48	62,69	2,80	0	16,99	20,49
9	<i>A. linariae</i> MF- P658-021	145,97	78,54	0	11,90	0	0
10	<i>A. linariae</i> MF- P680-021	89,67	0	0	16,53	24,06	19,68
11	<i>Botrytis cinerea</i>	210,87	31,97	0	0	4,73	7,78
12	<i>Fusarium</i> <i>anguioides</i> MFG 103100	281,08	374,77	0	0	67,67	102,02
13	<i>F. anguioides</i> MFG 108802	456,29	675,99	0	0	593,27	3070,41
14	<i>F. anguioides</i> MFG 111502	222,09	517,54	0	0	45,89	233,16
15	<i>F. anguioides</i> MFG 119913	675,34	1540,95	0	0	60,02	79,38
16	<i>F.</i> <i>chlamyosporu</i> <i>m</i>	239,55	803,81	0	0	24,33	37,43
17	<i>F. oxysporum</i> F137	1774,74	3884,50	54,33	36,22	178,83	312,39
18	<i>F. roseum</i> BKПМ F-900	1072,92	1311,35	0	0	228,49	337,77
19	<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 1)	78,95	0	0	0	0	0
20	<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 2)	100,70	0	21,63	0	0	0
21	<i>Trichoderma</i> sp. C16-05	0	0	0	0	275,80	216,17
22	<i>T. asperellum</i> K-1	0	112,87	22,76	295,08	372,07	188,12
23	<i>T. asperellum</i> Mg-6	0	99,47	0	0	298,40	527,36

Все исследованные штаммы грибов (*A. linariae* MF-P658-021, *B. cinerea*, *F. anguioides* MFG 108802, *F. chlamydosporum* и *Trichoderma* sp. (штамм 1)) по данным гель-фильтрации на Superdex 200 секретировали сходные небольшие трипсин-подобные пептидазы с молекулярной массой 16,2 кДа. Исключение составил штамм *F. roseum*, который секретировал пептидазу с несколько большей молекулярной массой (22,9 кДа).

Влияние факторов внешней среды на секрецию грибных пептидаз

Все штаммы грибов, у которых исследовали динамику изменения значений pH среды роста, характеризовались ее долговременным или кратковременным подкислением в ходе культивирования. Такое уменьшение значений pH среды начиналось уже на 2 – 4-е сутки роста культур. Этим, возможно, объясняются полученные данные о преобладании у некоторых грибов активности секретлируемых пептидаз, сдвинутой в сторону более кислого pH (таблица 1). У *B. cinerea* этот сдвиг явно связан с возрастанием активности аспартатных пептидаз, наблюдаемым после 4-х дней роста. Для ряда штаммов грибов (*F. anguioides* MFG 119913, *F. roseum* и *T. asperellum* Mg-6) было свойственно также подщелачивание среды, следующее за ее подкислением. Поэтому, видимо, у штаммов *F. anguioides* на 7-е сутки культивирования после подщелачивания среды наиболее активной группой пептидаз были щелочные пептидазы, а у *F. roseum* в тот же период обнаруживались наиболее активные нейтральные пептидазы (таблица 2).

Внеклеточная протеолитическая активность *F. roseum* обусловлена функционированием конститутивных (синтезируемых без индуктора) и индуцибельных (синтезируемых в присутствии индуктора) ферментов (таблица 3). При росте без индуктора (с нитратом натрия в среде Чапека) культура способна постоянно секретировать сравнительно низкие количества трипсин-, субтилизин-, химотрипсин-подобных ферментов, цистеиновых протеаз и аминопептидаз. Казеин и клеточные стенки стимулировали резкий рост образования трипсин-, субтилизин-подобных протеаз и экзопептидаз.

Таблица 3. Субстрат-специфичная протеолитическая активность *F. roseum* при культивировании в течение 7 суток в жидкой стандартной среде Чапека и модифицированной различными источниками азота

Субстрат	Активность, ед. / г сух. миц. · мин		
	NaNO ₃	Казеин	Клеточные стенки <i>Vigna radiata</i>
BApNA	232,15	1072,92	870,49
GlpAALpNa	263,88	1311,35	780,26
GlpFApNa	3,26	0	0
GlpFpNa	20,88	0	0
L-pNa	65,97	228,49	483,27
F-pNa	41,75	337,77	252,76

В основном отмечено довольно значительное падение активностей исследованных пептидаз штаммов *Aspergillus terreus* и *F. roseum* при пониженных концентрациях кислорода по сравнению с аэробными условиями. Однако при этом заметная индукция/секреция пептидаз для этих штаммов сохранялась и при некотором дефиците кислорода.

Особенности внеклеточных пептидаз различных представителей микромицетов

Внеклеточные пептидазы исследованных видов рода *Alternaria*. Спектр пептидаз, секретируемых штаммами *A. linariae*, включает сериновые, некоторое количество цистеиновых пептидаз, металлопептидазы и представителей экзопептидаз – аминопептидазы (таблица 4). Цистеиновые пептидазы были представлены у небольшого числа штаммов и, чаще всего, в незначительных количествах. Чаще встречаются у всех *A. linariae* трипсин-подобные ферменты, и их активность у 4-х из 6-ти штаммов была высокой. У штаммов с низкой активностью трипсин-подобных ферментов наблюдались относительно высокие активности субтилизин-подобных пептидаз и аминопептидаз (таблица 4). Высокая активность трипсин-подобных пептидаз, являющихся у грибов возможными маркерами патогенности (Dubovenko et al., 2010), служит подтверждением патогенности исследованных штаммов.

У *A. linariae* исследовалась связь секреции протеолитических ферментов с образованием таких вторичных метаболитов, как меланины, которые, по мнению ряда авторов (Henson et al., 1999, Calvo et al., 2002), являются факторами вирулентности у некоторых грибов. Среди исследованных нами штаммов представители рода *Alternaria* наиболее активно образуют меланины. Штаммы *A. linariae* MF-P641-011, MF-P658-021 и MF-P680-021, имеющие наиболее высокую общую протеолитическую активность, образовывали в большем количестве меланины (таблица 4). Именно эти штаммы более интенсивно секретировали трипсин-подобные пептидазы (рисунок 1), причем два из них с наиболее высоким содержанием меланина – MF-P641-011 и MF-P680-021 – являются агрессивными патогенами растений.

Таблица 4. Общая протеолитическая активность, образование меланинов и агрессивность штаммов *A. linariae*

Группа	Штамм	Активность, ед./мин·г сух. мицелия			Концентрация меланина, г/л	Агрессивность*
		pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0		
I	MF-P641-011	2,85	5,20	3,16	0,086	41
	MF-P680-021	5,21	12,89	6,01	0,291	32,5
	MF-P658-021	2,19	7,14	6,72	0,076	4,3
II	MF-P649-011	1,12	1,09	0,9	0,035	31,6
	MF-P580-141	0,95	1,11	0,92	0,034	4,6
	MF-P645-011	1,06	2,12	0,8	0,023	5,9

*Данные предоставлены Ф.Б. Ганнибалом

Доля (%) некроза на листовом диске диаметром 10 мм, 5 dpi

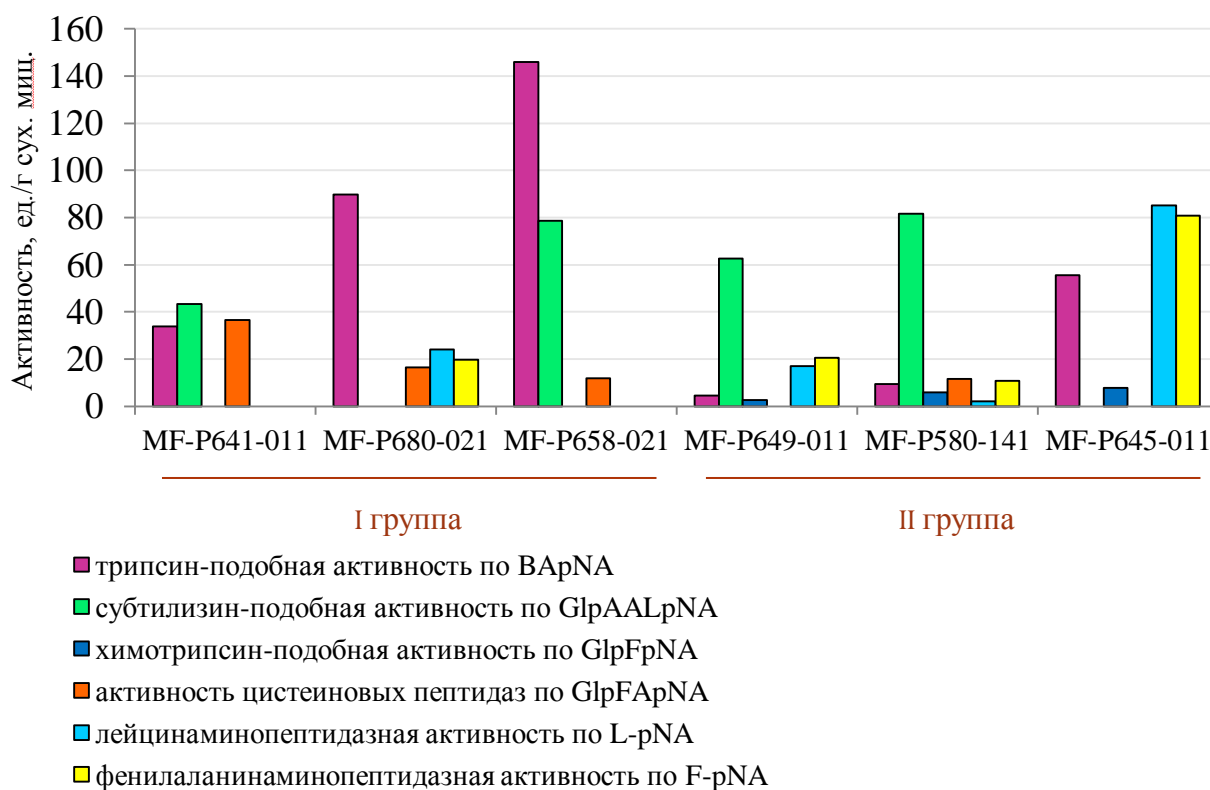


Рисунок 1. Субстрат-специфичная активность штаммов *Alternaria linariae*

Внеклеточные пептидазы *Botrytis cinerea*. *B. cinerea* вызывает серую гниль у широкого спектра растений, поэтому важны данные о его ферментативной активности как компонента низкоспецифичной адаптации.

Как показали результаты, секреция пептидаз *B. cinerea* большей частью индуцибельная и ее уровень зависит от типа источника азота, присутствующего в среде культивирования. Наиболее высокая общая протеолитическая активность обнаруживалась в среде, содержащей казеин в качестве индуктора синтеза/секреции пептидаз. Активность 7-суточной культуры, растущей как в присутствии казеина, так и растительных клеточных стенок в среде роста, была наиболее высокой в слабокислых условиях (рН 6,0) и уменьшалась при росте значения рН испытательной среды, достигая наиболее низкого уровня при рН 8,0. Максимальный уровень протеолитической секреции (в среде с казеином) был достигнут на 4-е сутки роста (начало экспоненциальной фазы роста). В этом периоде роста протеолитическая активность культуры была практически сходной при кислых и нейтральных условиях испытательной среды.

В забуференной среде (рН исходной среды устанавливался 7,0 и поддерживался продолжительное время в процессе роста) общая кислая протеолитическая активность (определяемая при рН 5,0) *B. cinerea* была намного ниже, чем в среде на основе дистиллированной воды (рН исходной

среды также 7,0) (таблица 5). При этом следует отметить, что биомасса и рН (рН 4,9 в опытном варианте и рН 4,8 в контрольном) обеих культур штамма к 10-м суткам роста выравнивались, хотя их кислые протеолитические активности продолжали значительно различаться, что может указывать на зависимость появления определенной протеолитической активности гриба от его стадии роста.

Таблица 5. Общая протеолитическая активность *B. cinerea* при рН 5,0 при росте штамма в среде на основе дистиллированной воды и фосфатного буфера

Основа среды	рН КЖ*	Биомасса, г сух. миц./л	Общая протеолитическая активность при рН 5,0, ед. / г сух. миц. · мин
Дистиллированная вода (рН 7,0)	4,8	39,29	8,70
0,1 М фосфатный буфер, рН 7,0	4,9	37,26	1,48

* - данные приведены на 10 сут. роста штамма

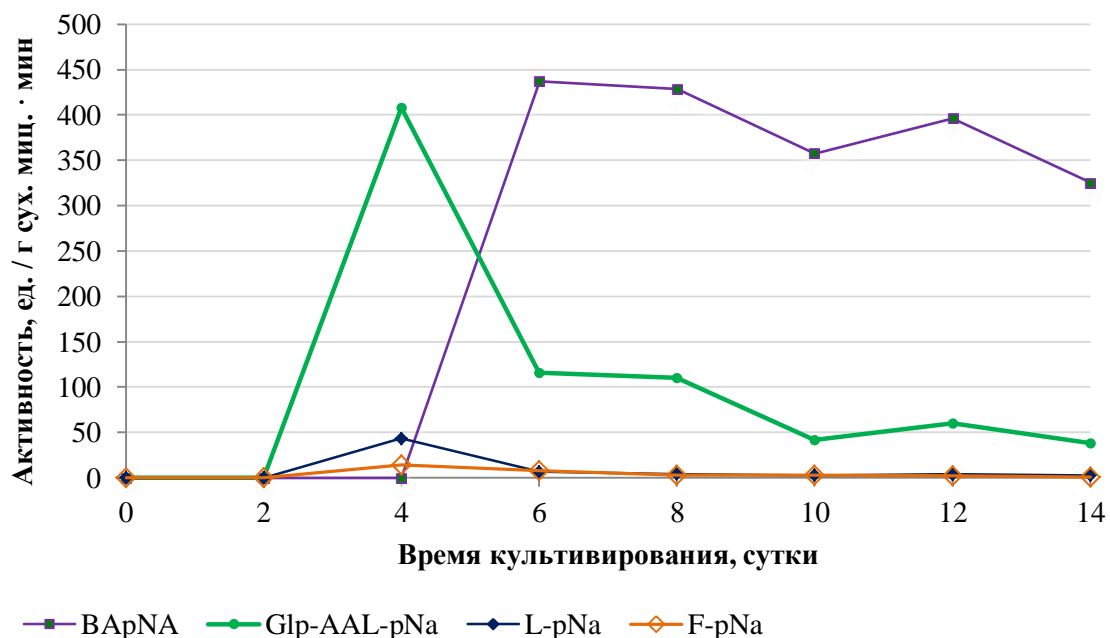


Рисунок 2. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *B. cinerea* в жидкой среде

В среде с казеином гриб образовывал вначале (на 4-е сутки роста) субтилизин-подобные пептидазы и аминопептидазы (лейциновые и фенилаланиновые) и позже (на 6-е сутки) трипсин-подобные ферменты (рисунок 2). После достижения пика активности субтилизин-подобные пептидазы быстро теряли свою активность, составляя 28 % от максимальной активности на 6-е сутки культивирования. Далее активность постепенно снижалась на протяжении роста культуры (до 9 % от максимальной активности на 14-е сутки роста). В отличие от субтилизин-подобных ферментов, активность трипсин-подобных пептидаз поддерживалась на значительном уровне до конца периода культивирования. Возможно, появление быстро исчезающей субтилизин-подобной активности необходимо для последующей активации трипсин-подобных ферментов, но не исключена также ее роль в предварительной подготовке субстрата для дальнейшего расщепления. Субтилизин- и трипсин-подобные пептидазы были более активны при значениях pH, близких к нейтральному, по сравнению с щелочным значением pH (pH 8,0), при котором терялось приблизительно 48 и 94 % максимальной активности по GlpAALpNA и BApNA, соответственно.

Полученные результаты показали, что общая протеолитическая активность 4-суточной культуры *B. cinerea* приблизительно на 83 % ингибировалась PMSF. Это указывает на то, что сериновые пептидазы могут быть наиболее представленным классом пептидаз, секретируемых в течение экспоненциальной фазы роста *B. cinerea*. Их значительный уровень активности был отмечен на протяжении всего периода культивирования гриба. Данные по ингибированию пептидаз пепстатином показали, что аспартатные пептидазы представляют собой другую группу внеклеточных пептидаз *B. cinerea*, активность которых выявляется наряду с активностью сериновых пептидаз в течение стационарной фазы роста. ЭДТА, 1,10-фенантролин и E-64 не действовали или слабо ингибировали протеолитическую активность *B. cinerea*, которая при этом ингибировалась DTT на 36 – 37 % (в зависимости от возраста гриба).

Внеклеточные пептидазы исследованных видов рода *Fusarium*. Представителями грибов, у которых актуально изучение специфики секретируемых пептидаз, являются фитопатогенные виды рода *Fusarium*. Они часто являются возбудителями болезней хвойных деревьев и зерновых культур, вызывают гнили корней и клубней, полегание сеянцев.

На рисунках 3 и 4 видно, что активность сериновых протеаз у исследованных *F. anguoides* MFG 119913 впервые детектировалась на 4-е сутки, у *F. roseum* – на 2-е сутки и достигала максимума к концу периода культивирования, к 8 – 10-м суткам роста штаммов. Возможно, образование

трипсин-подобных ферментов у фитопатогенов, наблюдаемое на 4 – 6-е сутки роста, происходит в ответ на изменения значения рН в процессе культивирования, резкое уменьшение которого было отмечено на 4-е сутки роста культур. Значительная активность экзопептидаз у обеих культур обнаруживалась уже на 2-е сутки культивирования.

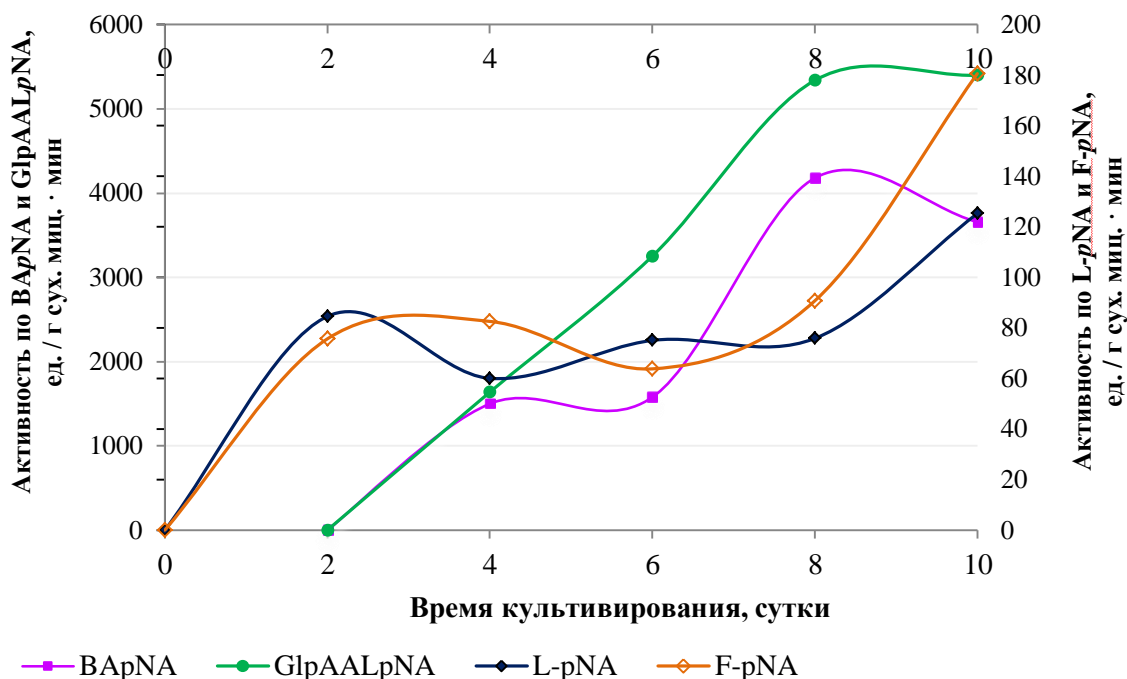


Рисунок 3. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *F. anguoides* MFG 119913 в жидкой среде

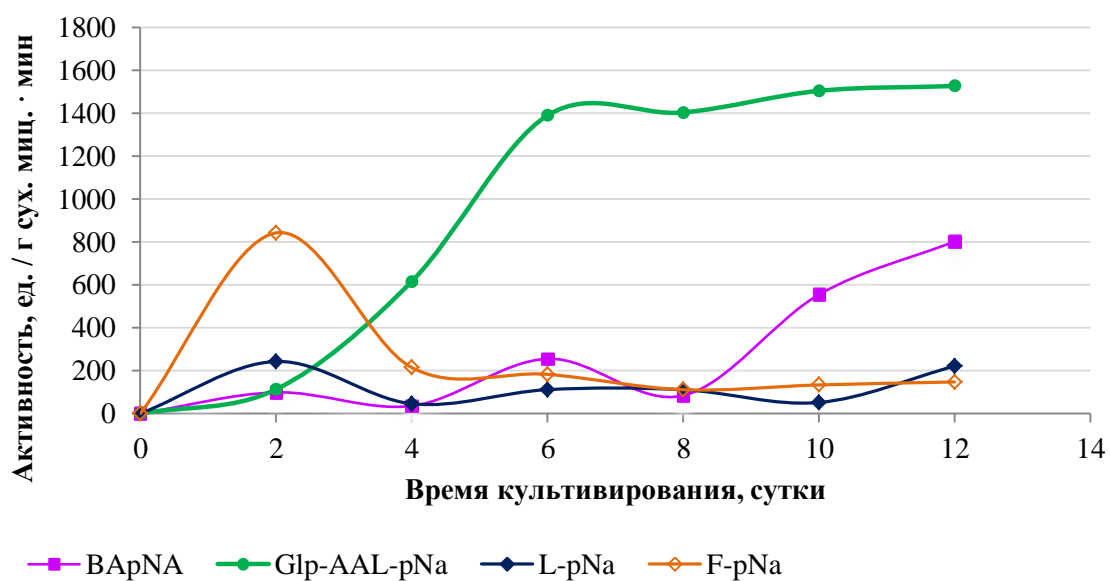


Рисунок 4. Динамика субстрат-специфичной протеолитической секреции *F. roseum* в жидкой среде

Секретируемые пептидазы у штаммов характеризовались неодинаковыми уровнями активности (рисунки 3, 4), величина которых зависела от вида гриба и от фазы роста.

Для исследованных представителей рода *Fusarium* характерна значительная (и в большинстве случаев преобладающая) общая активность пептидаз при щелочных значениях рН. Имеются данные, что у видов, принадлежащих к роду *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. poae*), образование щелочных пептидаз коррелирует с более высокой их степенью патогенности (Pekkarinen et al., 2003). В связи с этим, можно полагать, что при инфицировании растений щелочные трипсин-подобные пептидазы у фитопатогенных грибов рода *Fusarium* имеют особую функциональную значимость.

Внеклеточные пептидазы исследованных представителей рода *Trichoderma*. Штаммы *Trichoderma* sp. (штамм 1 и 2) при кислом значении культуральной жидкости (рН 4,6, таблица 1) секретировали трипсин-подобные пептидазы (таблица 2), способные сохранять активность при низких значениях рН среды. Субтилизин-подобные пептидазы у этих штаммов выявлены не были. Штаммы же вида *T. asperellum* не секретировали трипсин-подобные пептидазы, но образовывали внеклеточные субтилизин-подобные ферменты при значениях рН культуральной жидкости, близких к нейтральному (таблицы 1, 2).

По данным ингибиторного анализа с пепстатином, исследованные штаммы микромицетов образовывали также аспартатные пептидазы, выявленные при рН 4,0. Их вклад в общую протеолитическую активность при данном значении рН был различным у разных штаммов.

Среди исследованных представителей рода *Trichoderma* выявлены продуценты внеклеточных ингибиторов цистеиновых пептидаз (папаина и бромелаина) и трипсина (таблица 6). Интересно отметить, что ингибиторы (различного уровня активности) папаина секретировали все исследованные штаммы данного рода, тогда как продуцентов ингибиторов химотрипсина и субтилизина среди них отмечено не было. Полученные результаты указывают на возможность участия выявленных ингибиторов как в регуляции активности некоторых пептидаз (например, трипсин-подобных), так и в защите пищевых источников и гриба от действия пептидаз конкурирующих микроорганизмов.

Таблица 6. Ингибиторная активность культуральной жидкости некоторых штаммов рода *Trichoderma* по отношению к папаину, бромелаину, трипсину, химотрипсину и субтилизину

Штамм микромицета	Степень ингибирования, %				
	папаина	бромелаина	трипсина	химотрипсина	субтилизина
<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 1)	70	0	59	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. (штамм 2)	17	0	80	6	0
<i>T. asperellum</i> sp. Mg-6	82	0	65	0	0
<i>T. asperellum</i> K-1	87	0	71	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. (верх. т.)	100	100	0	0	0
<i>T. longibrachiatum</i>	95	100	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. Gt-2	100	89	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp. ТВ 4-1	100	78	0	0	0

Результаты работы показали, что на секрецию пептидаз мицелиальными микромицетами влияют такие факторы, как возраст культуры, значение рН среды культивирования, концентрация кислорода, источник азота и штаммовая принадлежность. При исследовании секреции и активности протеолитических ферментов у различных представителей нескольких распространенных родов мицелиальных микромицетов – *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* и *Trichoderma* – отмечен ряд их особенностей. Среди них – положительная корреляция между секрецией трипсин-подобных пептидаз и образованием меланинов у *A. linariae*; разделенная во времени секреция отдельных групп пептидаз у *B. cinerea*; наиболее высокая протеолитическая активность при щелочных условиях у большинства представителей рода *Fusarium*; секреция всеми изученными штаммами *Trichoderma* ингибиторов цистеиновых пептидаз.

Заключение

Полученные результаты показали, что различные штаммы грибов секретируют внеклеточные пептидазы различного уровня активности при использовании белкового субстрата в качестве индуктора их секреции. Скрининг пептидаз, секретируемых в жидкой среде с казеином, отразил потенциал штаммов образовывать внеклеточные протеолитические ферменты. При этом некоторые их важнейшие особенности, такие как оптимум рН и динамика секреции, раскрывают их свойства, присущие им и в природных условиях. Использование модельной системы гриб – растительные клеточные стенки, являющиеся главным барьером при грибном поражении растений, показало, что смена индуктора приводит к количественным, но не качественным изменениям в спектре протеолитических ферментов, который при росте грибов как в среде с клеточными стенками, так и с казеином, одинаков; различия же касаются только уровней их активности. При этом отмечена особая роль трипсин-подобных пептидаз в модельной системе фитопатогенеза.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что некоторые пептидазы мицелиальных грибов могут выступать в качестве факторов патогенности и участвовать в развитии этого процесса на определенных этапах патогенеза, таких как проникновение в ткани организма-хозяина и выживание в новых условиях.

Выводы

1. Спектр пептидаз, секретируемых мицелиальными грибами, относящимися к различным таксонам и эколого-трофическим группам, в основном, видоспецифичен, тогда как количественные характеристики секретируемых ферментов – штаммоспецифичны.
2. Синтез и секреция пептидаз связаны с определенными фазами развития гриба. Индуктором их появления может выступать изменение рН среды в процессе культивирования.
3. Появление и уровень пептидаз в среде культивирования зависят от наличия в ней белкового субстрата либо в виде отдельного белка, либо сложной структуры, содержащей белок в своем составе (клеточные стенки).
4. Для исследованных фитопатогенов характерно присутствие в среде трипсин-подобных пептидаз, которые могут рассматриваться как маркеры и участники патогенного процесса.
5. У сильных патогенов, кроме пептидаз, в качестве факторов вирулентности могут использоваться и другие метаболиты – меланины и ингибиторы пептидаз.

Благодарности

Выражаю благодарность научным руководителям – Я.Е. Дунаевскому и Г.А. Беляковой – за всегда внимательное отношение к проводимым мной исследованиям и диссертационной работе в целом. Хотела бы поблагодарить М.А. Белозерского за помощь в организации экспериментов и предоставленную возможность их проводить. За предоставленные штаммы благодарна Ф.Б. Ганнибалу, Т.Ю. Гагкаевой, Е.Н. Биланенко и А.Н. Лихачеву. Также выражаю благодарность А.В. Куракову за научные консультации и предоставленные штаммы грибов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI

1. **Шамрайчук И.Л.**, Лавренова В.Н., Белозерский М.А., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е., 2016. Активность и спектр внеклеточных пептидаз у фитопатогенных микромицетов *Fusarium anguioides* и *F. sambucinum*. Микология и фитопатология, **50**, вып. 4, 250 – 256.
2. **Шамрайчук И.Л.**, Кураков А.В., Белозерский М.А., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е., 2017. Протеолитическая активность и образование меланина фитопатогенным грибом *Alternaria tomatophila*. Микология и фитопатология, **51**, вып. 6, 390 – 393.
3. Semenova T.A., Dunaevsky Y.E., Beljakova G.A., Borisov V.A., **Shamraichuk I.L.**, Belozersky M.A., 2017. Extracellular peptidases as possible markers of fungal ecology. Applied Soil Ecology, 113, pp.1 – 10.
4. **Шамрайчук И.Л.**, Белякова Г.А., Еремина И.М., Кураков А.В., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е., 2020. Протеолитические ферменты грибов и их ингибиторы как перспективные биоцидные средства антифунгального действия. Вестн. моск. ун-та, **75**, № 3, 123 – 130.

Прочие публикации

1. Семенова Т.А., Белякова Г.А., Белозерский М.А., **Шамрайчук И.Л.**, Дунаевский Я.Е., 2013. Внеклеточные пептидазы грибов, образующих различные биотические связи. VI Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума. 11 – 15 июня 2013 г, Уфа: ИСЭИ УНЦ РАН, с. 276.

2. **Shamraychuk I.L.**, Dunaevsky Y. E., Belozersky M.A., and Belyakova G.A., 2014. Extracellular proteases of *Botrytis cinerea* and peculiarities of their secretion. International Scientific Journal. Journal of Medical and Biological Sciences. V. 1, pp. 30 – 35.
3. **Шамрайчук И.Л.**, Белозерский А.М., Дунаевский Я.Е., 2014. Характеристика протеолитических ферментов, секретируемых микромицетами *Fusarium anguioides*. Acta Naturae, спецвыпуск № 1, с. 51. Российская академия наук, Российский фонд фундаментальных исследований, Российское Биохимическое общество, ООО «Парк-Медиа». Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова. 15 – 19 сентября 2014 г., Москва, ИБХ РАН.
4. **Шамрайчук И.Л.**, Белозерский М.А., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е., 2014. Особенности секреции протеаз фитопатогеном *Fusarium sambucinum*. VII Всероссийская конференция «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция». Тезисы докладов. 30 июня – 4 июля 2014 г., Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с. 92.
5. **Шамрайчук И.Л.**, 2014. Секретируемые протеазы микромицетов рода *Trichoderma*. Ломоносов–2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология». 7 – 11 апреля 2014 г. Тезисы докладов. Сост. Ворцепнева Е.В. М.: Издательство Московского университета, 2014, с. 66.
6. **Шамрайчук И.Л.**, Белозерский А.М., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е., 2015. Образование субтилизин- и трипсин-подобных пептидаз микромицетами из рода *Fusarium*. VII Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума. 12 – 17 июля 2015 г., Новосибирск: РАН, с. 362.