

УДК 577.152.34.042

## СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТРЕМЯ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООГАНИЗМАМИ

© 2013 г. Н. Н. Кудрявцева, А. В. Софьин, Т. А. Ревина, Е. Л. Гвоздева,  
Е. В. Иевлева, Т. А. Валужева

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071,

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 20.02.2013 г.

Изучены сериновые протеиназы, продуцируемые тремя фитопатогенными микроорганизмами, принадлежащими к различным семействам грибов и поражающими растения картофеля. Показано, что оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и грибы *Rhizoctonia solani* и *Fusarium culmorum* секретируют сериновые протеиназы. Анализ субстратной специфичности и чувствительности к действию синтетических и белковых ингибиторов позволил отнести их к трипсино- и субтилизиноподобным ферментам. Соотношение трипсиноподобных и субтилизиноподобных протеиназ зависело от состава культуральной среды, особенно от формы азотного питания. Филогенетический анализ показал, что, в отличие от базидиомицета *R. solani*, аскомицет *F. culmorum* и оомицет *P. infestans* продуцируют сходные по составу экзопротеиназы, несмотря на то что они являются более дальними родственниками. Это указывает на то, что секреция сериновых протеиназ различными фитопатогенными микроорганизмами зависит не только от условий окружающей среды, но и их филогенетического положения. Полученные данные позволяют предположить, что экзопротеиназы фитопатогенных грибов играют различную роль в патогенезе. С одной стороны, они могут способствовать адаптации гриба при увеличении диапазона растений-хозяев, а с другой — выполнять различные функции при его выживании в экологических местах обитания вне растения-хозяина.

DOI: 10.7868/S0555109913050073

Фитопатогенные грибы и оомицеты являются возбудителями многих самых разрушительных болезней растений, которые приводят каждый год к очень значительным потерям урожая во всем мире. В настоящее время описано примерно 100000 видов грибов и оомицетов, но только очень малая часть из них является патогенной [1]. Тем не менее филогенетические исследования показали, что болезнетворные патогены не обязательно тесно связаны друг с другом. На самом деле они распространены во всех таксономических группах грибов, часто показывая тесную эволюционную связь с непатогенными видами [2]. Весьма вероятно, что фитопатогенность изменялась много раз в течение эволюции грибов и оомицетов [2]. В последние годы проводятся интенсивные исследования генов, ответственных за патогенность микроорганизма и его внедрение в растение [3], которые отсутствуют у сапрофитов. Так, гены, которые необходимы для успешного завершения жизненного цикла патогенов, но не обязательны для роста сапрофитов, рассматриваются как патогенные факторы [3].

Было показано, что, несмотря на различное происхождение и разные положения на филогенетическом дереве истинных грибов и оомицетов [4], они секретируют ряд белков, известных как эффекторы, которые важны для инфицирования

растения-хозяина [2]. Эти белки могут блокировать защитную систему растения и повреждать его клеточные стенки, обеспечивая вторжение патогена. Они включают в себя ряд секретируемых протеиназ, транскрипционные факторы и компоненты каскада передачи сигналов. Экзопротеиназы, продуцируемые мицелием грибов, могут осуществлять как снабжение патогена питанием, так и играть специфическую роль в клеточном метаболизме. Гены, кодирующие протеиназы и пептидазы, обнаружены в геномах ряда фитопатогенов. Они могут определять патогенность или вирулентность микроорганизма [3].

Все известные протеиназы в соответствии с природой функциональных групп в активном центре распределены на шесть основных классов: сериновые, цистеиновые, треониновые, аспаргатные, глутаматные и металлопептидазы. Экстрацеллюлярные протеолитические ферменты грибов представлены в основном сериновыми пептидазами, которые включают семейство химотрипсина (S1) и субтилизина (S8) [5]. Семейство S1 включает химотрипсины из подсемейства S1A, которые распространены в основном у животных и реже в грибах, и трипсины, большинство из которых найдены у грибов. В ряде исследований было показано, что для патогенов растений характерна секреция трипсиноподобных ферментов, в то время как сапро-

фиты продуцируют преимущественно субтилизиноподобные ферменты [6–8]. В последствии только у фитопатогенных грибов были обнаружены гены, кодирующие трипсиноподобные протеиназы [9, 10].

Цель работы – сравнительный анализ сериновых протеиназ, продуцируемых мицелием трех патогенных микроорганизмов, которые вызывают заболевания картофеля: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Kuhn и *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.

### МЕТОДИКА

В работе использовали оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и грибы *Rhizoctonia solani* Kuhn (AG-3) 153 и *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., которые были любезно предоставлены Национальным практическим центром по картофелеводству и овощеводству Национальной Академии Наук Республики Беларусь. Культуры выращивали на овсяно-агаровой среде с добавлением термостабильных белков картофеля в течение 11–14 сут при комнатной температуре (21°C). Среди ряда культуральных сред были выбраны те, в которых наблюдался максимальный рост микроорганизмов, секретирующих протеолитические ферменты. Выбраны следующие среды: **среда I** содержала на 100 мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 г),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.025 г),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 мг), тиамин (1 мг), рибофлавин (1 мг) и термостабильные белки из клубней картофеля; **среда II** представляла собой среду I, в которую был добавлен дрожжевой экстракт (1 г).

Микроорганизмы выращивали в колбах Эрленмейера (500 мл), в которые вносили по 150 мл культуральной среды. В среду вводили 15 мл суспензии каждой культуры. *P. infestans* было  $2 \times 10^5$  зооспор/мл, *F. culmorum* –  $2 \times 10^5$  макроконидий/мл и *R. solani* – 15 мл мицелия. После 12 сут роста мицелий собирали на фильтровальную бумагу ватман № 41, промывали небольшим количеством теплой дистиллированной воды, нагревали в течение ночи в духовом шкафу при температуре около 90°C, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. После более длительного периода сушки не наблюдали дополнительной потери веса. Фильтрат, полученный после сбора мицелия, использовали для анализа секретируемых ферментов.

Белки из фильтрата после 12 сут роста микроорганизмов осаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (80% насыщения). Осадок отделяли центрифугированием при 10000 г в течение 30 мин при 4°C, растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды, обессоливали гель-хроматографией на Сефадексе G-25 и лиофильно высушивали.

Протеолитическую активность ферментов определяли по методу Кунитца [11], используя в каче-

стве субстратов казеин (1%-ный раствор), гемоглобин (0.5%-ный раствор), а также азоказеин (0.5%-ный раствор) [12]. Время гидролиза азоказеина составляло 30 мин, а казеина и гемоглобина – 1 ч. Активность цистеиновых протеиназ оценивали после инкубации в присутствии 25 мМ L-цистеина и 1 мМ ЭДТА в течение 10 мин в соответствии с модифицированным методом Куница. За одну единицу протеолитической активности (Е) принимали то количество фермента, которое приводит к увеличению оптической плотности на 0.1 при 366 нм (для азоказеина) и 280 нм (для казеина и гемоглобина) в течение 1 мин.

Амидазную активность ферментов определяли по методу Эрлангера и соавт. [13] с использованием синтетических *n*-нитроанилидов:  $\text{N}\alpha$ -бензоил-L-аргинина (**БАПА**), *N*-сукцинил-глицил-глицил-L-фенилаланина (**СукГГФПА**), *N*-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцина (**КбзААЛПА**), лейцина (**ЛПА**) и ацетил-L-аланил-L-аланил-L-аланина (**АцАААПА**). Концентрация субстрата составляла 0.5 мМ. За одну единицу амидазной активности (АЕ) принимали количество фермента, которое расщепляло 1 нмоль субстрата в 1 мин.

Для проведения ингибиторного анализа были использованы следующие ингибиторы протеолитических ферментов: йодацетамид (**ИАА**, 1 мМ), хлорметилкетон тозил-L-лизина (**ХМКТЛ**, 1 мМ), хлорметилкетон тозил-L-фенилаланина (**ХМКТФ**, 1 мМ), диизопротилфторфосфат (**ДИПФФ**, 1 мМ); ЭДТА (4.0 мМ), дитиотриэтол (**ДТТ**, 1 мМ), фенилаланинметансульфонилфторид (**ПМСФ**, 1 мМ), *n*-хлормеркурийбензоат (**ПХМБ**, 0.2 мМ).

Электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na (ДДС-ПААГ) и  $\beta$ -меркаптоэтанола проводили по методу Лэммли [14]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором Кумасси R-250 в 20%-ном этаноле, содержащем 5% формальдегида.

ДДС-ПААГ-электрофорез проводили также в присутствии сополимеризованного субстрата (0.1%-ная желатина) по методу Хеуссен и Даудл [15]. На дорожку наносили 0.010–0.015 мг белков, выделенных из культуральной жидкости. После электрофоретического разделения белков гель инкубировали в 2.5%-ном растворе тритона X-100 в течение 2 ч при интенсивном перемешивании для удаления ДДС-Na и восстановления активности ферментов. Реакцию гидролиза желатинины разделенными фракциями осуществляли, инкубируя гель в 0.1 М глицин-HCl буфере, pH 8.3, в течение ночи при комнатной температуре. Затем гель окрашивали 0.1%-ным раствором амидочерного в течение 1 ч и избыток красителя отмывали смесью этанол–уксусная кислота–вода (3 : 1 : 6). Компоненты, обладающие протеолитической активностью, выявлялись как бесцветные зоны на голубом фоне окрашенной желатинины.

Содержание белка определяли по модифицированному методу Брэдфорд, используя в качестве стандарта БСА [16].

Все эксперименты и анализы проводились, по крайней мере, в трех повторностях, и результаты представлены в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения.

В работе использовали казеин (НПО “Биолар”, Латвия), азоказеин, гемоглобин, синтетические субстраты и ингибиторы (“Sigma Chemicals Co”, США), сефадекс G-25 и набор низкомолекулярных белков-маркеров (LMW Calibration Kit) фирмы “Pharmacia” (Швеция).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов было изучено влияние нескольких факторов (рН среды, концентрация неорганического азота) на секрецию внеклеточных протеиназ фитопатогенами *P. infestans* (Mont.) de Bary, *R. solani*, и *F. culmorum*, которые на филогенетическом дереве, представленном на рис. 1, I, занимают различные ветви. Так, истинные грибы, относящиеся к семействам базидиомицетов (*R. solani*) и аскомицетов (*F. culmorum*), филогенетически далеки от *P. infestans*, который принадлежит к семейству оомицетов (Oomycota) (рис. 1, I). Традиционно, в связи с нитевидными особенностями роста оомицеты были классифицированы в царстве грибов. Тем не менее современные молекулярные и биохимические анализы показывают, что оомицеты таксономически менее сходны с нитчатými грибами, но более тесно связаны с бурными водорослями (heterokonts), относящимися к царству эукариот [17–19].

При росте на полусинтетической культуральной среде, содержащей  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , тиамин и рибофлавин, наблюдали низкую секрецию протеиназ всеми указанными микроорганизмами, хотя все они поддерживали довольно хороший рост.

Поскольку изучаемые микроорганизмы являются возбудителями самых разрушительных болезней картофеля, в культуральную среду были добавлены термостабильные белки из клубней картофеля. Это инициировало секрецию протеиназ грибами *R. solani* and *F. culmorum* (рис. 1, IIa и IIIa, кривые 2). Однако в среде выращивания *P. infestans* активность экзопротеиназ оставалась на низком уровне и не изменялась практически в течение всего роста культуры, хотя и наблюдался значительный прирост биомассы (рис. 1, IVa, кривые 1 и 2).

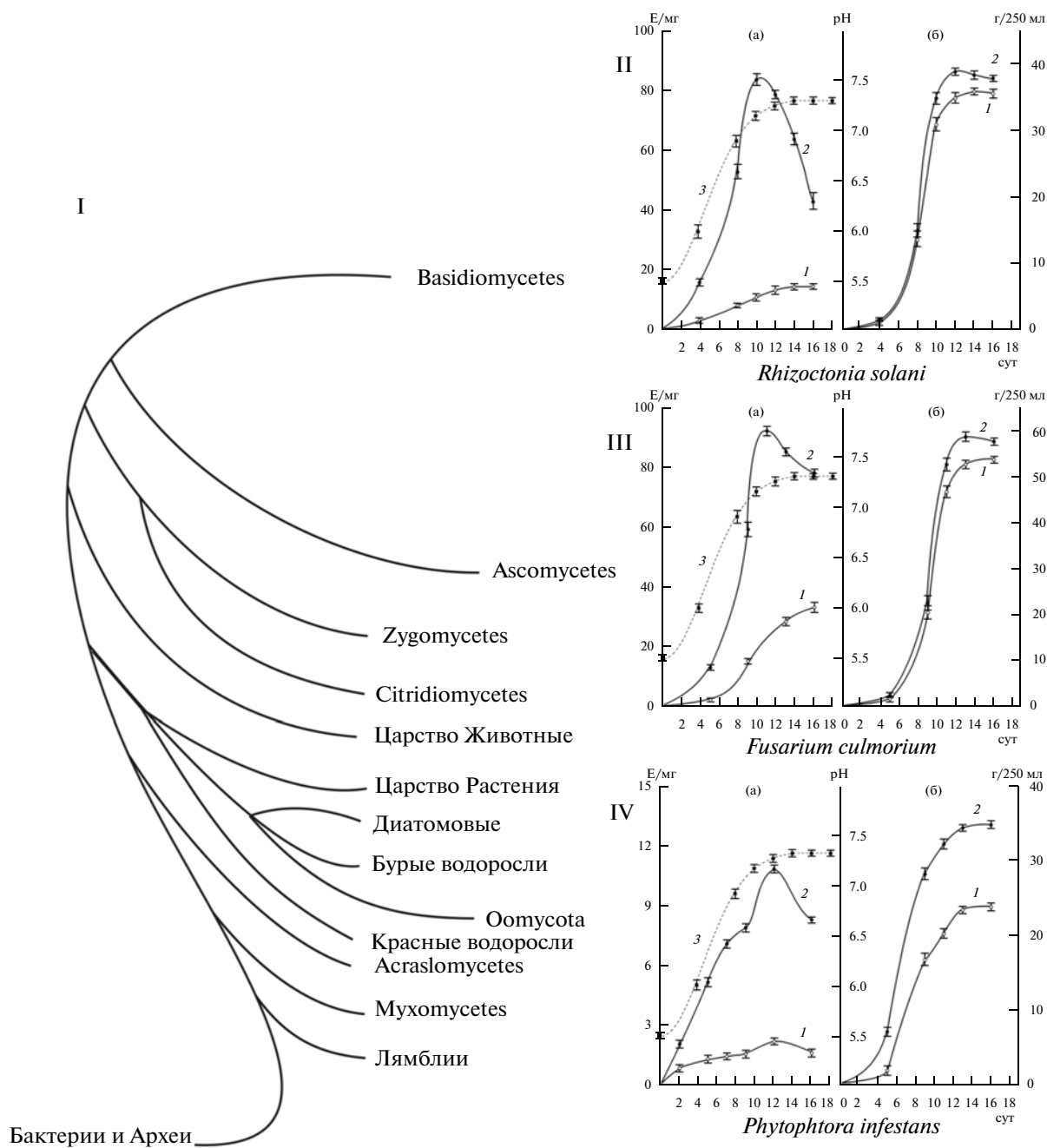
Оказалось, что значение рН культуральной среды изменялось в процессе роста всех трех микроорганизмов от слегка кислого до нейтрального. Постоянное значение рН (7.2–7.4) достигалось после 12 сут инкубации (рис. 1, IIa–IVa, кривые 3).

Способность патогенных грибов поддерживать рН не зависела от состава питательной среды. Следует отметить, что зависимость синтеза и секреции экзопротеиназ от рН среды также была обнаружена у некоторых микроорганизмов [20]. Тем не менее грибы обычно избегают естественной среды обитания с неподходящим значением рН, возможно, из-за метаболических затрат на его коррекцию и не конкурируют с микроорганизмами, более адаптированными к изменениям рН. Наконец, протеолитическая активность фермента, как известно, сильно зависит от рН, поэтому для того чтобы эффективно расщеплять белки, оптимум рН протеиназ в идеале должен соответствовать рН среды обитания микроорганизма. Можно заметить, что значения рН среды влияло на рост биомассы (рис. 1, IIa–IVa, кривые 1).

Добавление в среду  $\text{KNO}_3$  приводило к значительному снижению активности экзопротеиназ, что указывало на подавление их секреции и, возможно, синтеза. Поскольку секреция экзоферментов подавляется в присутствии нитратов, имеются основания полагать, что минеральный азот регулирует адаптацию патогена к окружающей среде по механизму, который можно отнести к каталитической репрессии [21].

Для изучения влияния органического азота на секрецию экзопротеиназ патогенов в питательную среду были дополнительно добавлены белки из экстракта дрожжей. При этом для всех микроорганизмов наблюдали заметное увеличение секреции экзопротеиназ, которое сопровождалось ускорением роста их мицелия (рис. 1, IIb–IVb, кривые 1 и 2). Можно предположить, что белки дрожжевого экстракта, являясь дополнительным источником пищевых субстратов для микроорганизмов, по-видимому, действуют также в качестве индуктора [22]. Важно отметить, что оомицет начинал эффективно продуцировать экзоферменты только в присутствии белков дрожжевого экстракта (рис. 1, IVb, кривая 2). Таким образом, можно заключить, что *P. infestans* более необходима белки для секреции ферментов, чем для роста.

Оказалось, что секреция протеиназ всеми исследуемыми микроорганизмами зависит от температуры культивирования. Когда культуры росли при 28°C, наблюдалось уменьшение секретиремой протеолитической активности в культуральной среде. При 21°C продукция экзопротеиназ была максимальной. Это, очевидно, соответствовало температурному режиму обитания микроорганизмов в естественной среде. Можно предположить, что температура 21°C оптимальна для исследуемых возбудителей болезней картофеля. Их неспособность расти при более высоких температурах, возможно, отражает распределение в естественной среде обитания, защищающей от действия высоких температур. Действительно, в работе [23] бы-



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево грибов [4] (I) и динамика изменения активности экзопротеиназ (а) и влажной биомассы (б) в процессе роста *R. solani* (II), *F. culmorum* (III) и *P. infestans* (IV) в культуральной среде без (1) и при добавлении дрожжевого экстракта (2); изменение pH среды в течение роста микроорганизма (3).

ло показано, что несколько штаммов *Pythium at-trantheridium*, выделенных из мест повреждения корнеплодов моркови, плодов яблок и саженцев вишни, росли при 20–25°C. В то же время рост гриба *Pythium splendens*, вызывающего болезнь корней карамболы (южная Флорида), уменьшался при температуре выше 30°C [24].

Экзоферменты, секретируемые изучаемыми микроорганизмами, проявляли активность при

нейтральных и слабо щелочных значениях pH. Так, экзопротеиназы *F. culmorum* характеризовались максимальной протеолитической активностью при pH 8.0, а *R. solani* – при pH 8.5. Самый высокий уровень активности экзопротеиназ *P. infestans* наблюдался при нейтральных значениях pH и характеризовался максимумом при pH 7.0. Следует отметить, что активность ферментов *P. infestans* увеличивалась в слабо щелочной области

**Таблица 1.** Влияние синтетических ингибиторов на активность внеклеточных протеиназ, секретируемых *P. infestans*, *F. culmorum* и *R. solani* (концентрация ДИПФФ – 0.2 мМ, ЭДТА – 4.0 мМ и остальных ингибиторов – 1.0 мМ)

Ингибитор	Активность протеиназ <i>P. infestans</i> , %			Активность протеиназ <i>R. solani</i> , %		Активность протеиназ <i>F. culmorum</i> , %		
	Азоказеин, БАПА, Кбз-ААЛПА			Азоказеин, БАПА		Азоказеин, БАПА, Кбз-ААЛПА		
Без реагента	100	100	100	100	100	100	100	100
ДИПФФ	н.о.*	42.0	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ПМСФ	100	100	0	61.1	96.0	35.0	17.4	78.0
ХМТЛК	н.о.	4.0	95.0	95.0	70.0	84.0	50.0	52.0
ХМТФК	н.о.	52.0	91.0	82.0	84.0	80.0	46.0	100
ЭДТА	20.3	41.0	0	89.0	93.0	112.0	99.0	99.0
ПХМБ	95.1	69.0	100	76.0	95.0	61.0	100	100
ИАА	100	90.1	100	100	93.0	97.0	101.6	101.2
ДТТ	100	93.4	84.2	66.0	129.1	82.0	98.4	99.2
Сулема	65.4	57.2	27.4	79.0	95.0	53.0	34.0	55.2

\* н.о. – не определяли

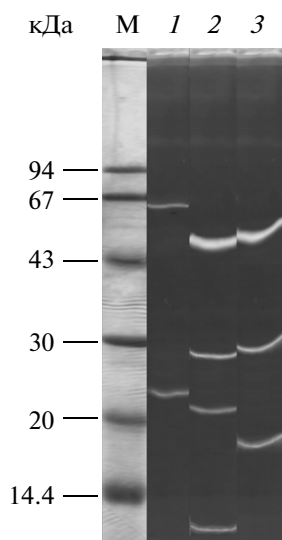
pH, что указывало на наличие, по крайней мере, второй протеиназы с оптимумом pH действия в области от 8.0 до 9.0.

Экзопротеиназы всех трех микроорганизмов проявляли низкую активность по отношению к казеину и гемоглобину, в то же время активность по отношению к азоказеину была на порядок выше. Это послужило основанием для использования азоказеина в качестве белкового субстрата при изучении их свойств. Способность экзоферментов, хотя и очень слабо, гидролизовать гемоглобин могла свидетельствовать о присутствии среди них аспартильных протеиназ, характеризующихся оптимумом действия в области кислых значений pH, и некоторых цистеиновых протеиназ, которые могли бы проявлять активность при этих же значениях pH. Однако ни у одного из грибов не наблюдали изменения протеолитической активности экзопротеиназ по отношению к азоказеину при добавлении восстанавливающих агентов (L-цистеин, ЭДТА). Это с большой степенью вероятности указывало на отсутствие в их культуральных жидкостях цистеиновых протеиназ, активность которых в присутствии восстанавливающих агентов должна была бы увеличиваться.

В табл. 1 представлены результаты изучения взаимодействия различных синтетических ингибиторов с экзопротеиназами, секретируемыми тремя микроорганизмами. ЭДТА, который подавляет активность металлопротеиназ, действовал только на экзоферменты оомицета. Таким образом, в составе экзоферментов, секретируемых истинными грибами, отсутствовали металлопротеиназы. При введении восстанавливающих агентов (L-цистеин, ЭДТА) в случае определения протео-

литической активности экзопротеиназ *P. infestans* наблюдали не увеличение, а почти двукратное ее снижение. Это свидетельствовало не только об отсутствии цистеиновых протеиназ, но указывало на присутствие в культуральной жидкости оомицета металлопротеиназ, активность которых подавлялась ЭДТА (табл. 1). ПМСФ эффективно подавлял активность экзоферментов все трех патогенов. Это свидетельствует о том, что все они секретируют в основном сериновые протеиназы. Ферменты, принадлежащие к этому классу, значительно различаются по субстратной специфичности. Результаты обработки хлорметилкетонами указывают на то, что среди них присутствуют трипсино-и субтилизиноподобные ферменты (табл. 1). Таким образом, в составе белков, секретируемых *R. solani*, присутствуют в основном трипсиноподобные ферменты. Ферменты, секретируемые *F. culmorum*, представлены субтилизиноподобными протеиназами, в то время как в культуральной жидкости оомицета дополнительно обнаруживались металлопротеиназы.

Результаты ДДС-ПААГ-электорофореза в присутствии желатины показали, что все исследованные штаммы секретируют три или более белков, обладающих протеолитической активностью (рис. 2). Все штаммы содержали высокомолекулярный белок, который оставался на старте геля. Остальные белки имели молекулярную массу в пределах от 12 до 65 кДа. Так, *P. infestans* секретирует протеиназы 17, 29 и 50 кДа, *F. culmorum* – 21, 29 и 50 кДа, а *R. solani* – 25 и 65 кДа. Наиболее высокой желатинолитической активностью обладали компоненты с молекулярной массой 29 и 50 кДа.



**Рис. 2.** Зимограмма, полученная при ДДС-Na-ПААГ-электрофорезе в присутствии желатины, частично очищенных культуральных сред после 12 сут роста *R. solani* (полоса 1), *P. infestans* (полоса 2) и *F. culmorum* (полоса 3). М – белки-маркеры молекулярных масс (кДа): фосфорилаза b – 94, бычий сывороточный альбумин – 67, яичный альбумин – 43, карбоангидраза – 30, соевый ингибитор трипсина Кунитца – 20.1 и лактальбумин – 14.4. Около 50 мкг белка было нанесено на полосы 1–3.

Результаты определения амидазной активности экзоферментов, секретируемых *P. infestans* и *F. culmorum*, при гидролизе *n*-нироанилидов аминокислот и трипептидов представлены в табл. 2. Существуют четкие различия между специфичностью действия на синтетические субстраты трипсина и субтилизинов, которые позволяют различать эти ферменты. Видно, что экзопротеиназы *P. infestans* наиболее эффективно гидролизуют БАПА (субстрат для трипсиноподобных протеиназ) и в меньшей степени Кбз-ААЛПА (субстрат для субтилизиноподобных протеиназ). В то же время они не действовали на субстраты для химотрипсина и эластазаподобных протеиназ (СукГГФПА и Ац-АААПА соответственно), а также для аминоксипептидаз (ЛПА). Ферменты, сек-

**Таблица 2.** Амидазная активность (АЕ) ферментов, секретируемых *P. infestans* и *F. culmorum* (концентрация субстратов 0.5 мМ)

Субстрат	Экзопротеиназы <i>P. infestans</i>	Экзопротеиназы <i>F. culmorum</i>
БАПНА	4.2 ± 0.17	1.9 ± 0.06
Кбз-ААЛПА	2.1 ± 0.08	6.7 ± 0.23
СукГГФПА	0 ± 0.00	0.5 ± 0.01
ЛПА	0 ± 0.00	1.1 ± 0.03
АцАААПА	0 ± 0.00	1.0 ± 0.02

ретируемые *F. culmorum*, эффективно расщепляли Кбз-ААЛПА и в меньшей степени БАПА. Они проявляли низкую активность по отношению к субстратам для химотрипсина, эластазаподобных протеиназ и аминоксипептидаз. Состав экзоферментов *P. infestans* и *F. culmorum* не зависел от состава культуральной среды.

Амидазная активность экзоферментов, секретируемых *R. solani*, зависела от состава питательной среды (табл. 3). При культивировании гриба на среде, не содержащей дрожжевого экстракта, секретируемые им протеиназы гидролизуют азоказеин и БАПА, но на Кбз-ААЛПА действовали слабее. Эти ферменты не действовали на специфические субстраты для химотрипсина, эластазаподобных протеиназ и аминоксипептидаз. Добавление в культуральную среду дрожжевого экстракта приводило к изменению состава протеиназ, секретируемых *R. solani*. Из табл. 3 видно, что экзопротеиназы начинали эффективнее гидролизовать азоказеин и субстрат для субтилизина (Кбз-ААЛПА), а их активность по отношению к БАПА была существенно ниже. Таким образом, при добавлении дрожжевого экстракта состав ферментов, секретируемых *R. solani*, изменялся. Гриб начинал продуцировать в основном субтилизиноподобные ферменты, при этом в культуральной среде значительно уменьшалось содержание трипсиноподобных протеиназ.

Было изучено взаимодействие экзопротеиназ, секретируемых *R. solani* и *F. culmorum*, с природными белками, выделенными из клубней картофеля и семян бобовых растений, которые действуют как ингибиторы сериновых протеиназ (рис. 3). Активность экзопротеиназ *R. solani* эффективно подавлялась специфическими ингибиторами трипсина из картофеля, сои (SKTI, Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor) и гледичии (рис. 3а, кривые 1, 3 и 4), но картофельный ингибитор химотрипсина I ингибировал их значительно слабее (рис. 3а, кривая 2). Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что трипсиноподобные экзопротеиназы секретируются *R. solani* при культивировании без дрожжевого экстракта. Белки SKTI и SBVI (Soybean Bowman-Birk Inhibitor) менее эффективно подавляли активность экзопротеиназ, секретируемых *F. culmorum* (рис. 3б, кривые 3 и 6). Однако специфический ингибитор субтилизина из клубней картофеля эффективно действовал на них, подавляя их активность более чем на 60% (рис. 3б, кривая 5). Это указывает на то, что субтилизиноподобные ферменты составляют значительную часть протеиназ, секретируемых *F. culmorum*. Аналогичные результаты были получены при изучении действия белковых ингибиторов на экзопротеиназы *P. infestans*. Полученные данные подтверждают, что экзопротеиназы

грибов и оомицета принадлежат к протеолитическим ферментам клана химотрипсина [5]. Следует отметить, что ингибитор субтилизина из клубней картофеля подавлял *in vitro* рост и развитие макроконидий *F. culmorum* и зооспор *P. infestans* [28]. Можно предположить, что экзопротеиназы, секретируемые фитопатогенными микроорганизмами, являются фактором их патогенности.

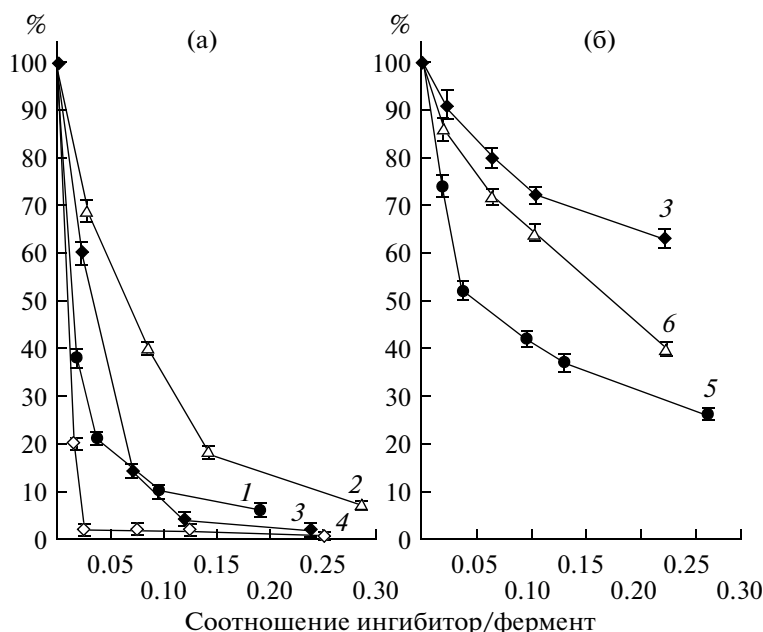
Таким образом, ингибиторный анализ основных экстрацеллюлярных ферментов патогенных грибов *R. solani* и *F. culmorum*, также оомицета *P. infestans*, показал, что они принадлежат к группе сериновых протеиназ. На основании их субстратной специфичности и чувствительности к синтетическим и природным ингибиторам можно сделать заключение, что ферменты *F. culmorum* и *P. infestans* секретируют трипсино- и субтилизиноподобные протеиназы. Состав экзоферментов, секретируемых *R. solani*, зависел от состава культуральной среды, особенно от формы азотного питания. В условиях избытка белкового питания гриб *R. solani* секретировал преимущественно субтилизиноподобные ферменты и рос как сапрофит. При недостатке азотного питания гриб начинал секретировать трипсиноподобные протеиназы, которые способствовали инфицированию растительной ткани. Несмотря на то, что гриб *R. solani* был выделен из ткани картофеля, можно предположить, что он сохранял свойства сапрофита, который живет на рас-

**Таблица 3.** Активность экзопротеиназ гриба *R. solani*, выращенного на среде с добавлением дрожжевого экстракта и без него

Субстрат	Удельная активность, (Е)АЕ/мг белка	
	С дрожжевым экстрактом, 1%	Без дрожжевого экстракта
Azocasein, 0.5%-ный раствор	83.3 ± 2.34	15.0 ± 0.56
БАПНА (0.5 мМ)	26.0 ± 0.88	10.0 ± 0.31
Кбз-ААЛПНА (0.5 мМ)	40.0 ± 1.38	1.8 ± 0.06

тительных остатках. Весьма вероятно, что экзопротеиназы позволяют аскомицету *R. solani* расти на большом разнообразии живых и неживых растительных субстратов.

Полученные данные показывают, что различные источники питания для микроорганизмов могут быть важны для дифференциальной продукции ими сериновых протеиназ. Как секреция субтилизинов, так и трипсинов индуцируется сигналами окружающей среды [7, 29]. Субтилизины патогенных грибов могут играть разные роли в патогенезе. С одной стороны, они повышают адаптацию микроорганизма к растению-хозяину, а с другой — выполняют различные функции при



**Рис. 3.** Влияние белков-ингибиторов протеиназ на амидазную активность (%) экзоферментов *R. solani* (а) и *F. culmorum* (б) 1 – ингибитор трипсина из клубней картофеля [25], 2 – ингибитор химотрипсина I [26], 3 – SKTI, 4 – ингибитор трипсина из семян гледичии [27], 5 – ингибитор субтилизина из клубней картофеля [28], 6 – SBVI. В качестве субстратов использовали БАПНА и Кбз-ААЛПНА.

его выживании в разных экологических местах обитания вне хозяина. Известно, что не все микроорганизмы, поражающие растения, секретируют трипсины [30, 31]. Их секреция возрастает со степенью эволюционного “возраста” гриба. В связи с этим высказывается предположение, что филогенетическое распределение штаммов древних грибов является более широким, чем современных [30]. Такое распределение может являться отражением конвергентной эволюции, в результате которой филогенетически различные микроорганизмы приобрели способность секретировать близкие по свойствам протеолитические ферменты, действующие на одни и те же субстраты.

Оказалось, что оомицет *P. infestans* и аскомицет *F. culmorum* секретируют близкие по составу экзопротеиназы, несмотря на то, что они более удалены на филогенетическом дереве, чем аскомицет и базидиомицет *R. solani* (рис. 1, I). Таким образом, существует несколько механизмов адаптации различных штаммов микроорганизмов, которые секретируют протеолитические ферменты различных классов в зависимости как от их конкретных потребностей, так и природы их конкретных хозяев. Наши исследования также показали, что *in vitro* поведение исследуемых видов микроорганизмов не связано напрямую с экологическими нишами, из которых они были выделены. Различие состава протеиназ, секретлируемых микроорганизмами, поражающими растения, может отражать физиологические различия сапрофитов и фитопатогенов [10].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tunlid A., Talbot N.J. // Current Opinion Microbiol. 2000. V. 5. № 7. P. 513–519.
2. Oliver R., Osbourn A. // Microbiology. 1995. V. 141. № 1. P. 1–9.
3. St. Leger R.J., Joshi L., Roberts D.W. // Microbiology. 1997. V. 143. № 6. P. 1983–1992.
4. Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G. // BMC Evolut. Biol. 2006. V. 22. № 6. P. 99.
5. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 1. P. D160–D164.
6. Дунаевский Я.Е., Белякова Г.А., Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 2. С. 327–330.
7. Дунаевский Я.Е., Грубань Т.Н., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 6. С. 848–853.
8. Дунаевский Я.Е., Голубева Е.А., Грубань Е.Т., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Журн. Росс. фитопатол. общ. 2001. Т. 2. С. 39–44.
9. Soanes D.M., Alam I., Cornell M., Wong H.M., Hedeler C., Paton N.W., Rattray M., Hubbard S.J., Oliver S.G., Talbot N.J. // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 6. e2300. doi:10.1371/journal.pone.0002300.
10. Dubovenko A.G., Dunaevskii Ya.E., Belozerskii M.A., Oppert B., Lord G.C., Elpidina E.N. // Fungal Biol. 2010. V. 20. № 1. P. 1–9.
11. Kunitz M. // J. Gen. Physiol. 1947. V. 30. № 4. P. 291–310.
12. Charney J., Toarelli R.M. // J. Biol. Chem. 1947. V. 171. № 3. P. 501–505.
13. Erlanger D.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
15. Heussen C., Dowdle E.B. // Anal. Biochem. 1980. V. 102. № 1. P. 196–202.
16. Appenroth K.J., Augsten H. // Biochem. Physiol. Pflanz. 1987. B. 182. № 1. S. 85–89.
17. Kamoun S. // Eukaryotic Cell. 2003. V. 2. № 2. P. 191–199.
18. Rossman A.Y., Palm M.E. // Inoculum. 2007. V. 58. № 1. P. 1–3.
19. Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert I., Doolittle W.F. // Science. 2000. V. 290. № 5493. P. 972–977.
20. St. Leger R.J., Screen S.E., Shams-Pirzadeh B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 1. P. 320–324.
21. Cohen B. // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 79. № 2. P. 311–320.
22. Fortelius C., Markkanen P. // J. Indust. Microbiol. Biotech. 2000. V. 24. № 3. P. 369–373.
23. Allain-Boulé N., Lévesque C.A., Martinez C., Bélanger R.R., Tweddell R.J. // Can. J. Plant Pathol. 2004. V. 26. № 3. P. 365–370.
24. Ploetz C. // Mycopathologia. 2004. V. 157. № 2. P. 225–231.
25. Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–51.
26. Ревина Т.А., Валуева Т.А., Ромашкин В.И., Мосолов В.В. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 4. С. 683–689.
27. Мосолов В.В., Колосова Г.В., Валуева Т.А., Дронова Л.А. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 5. С. 787–802.
28. Ревина Т.А., Сперанская А.С., Кладницкая Г.В., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1345–1352.
29. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 292. № 2. P. 405–419.
30. Hu G., St. Leger R.J. // J. Evol. Biol. 2004. V. 17. № 10. P. 1204–1214.
31. St. Leger R.J., Bidochka M.J., Roberts D.W. // Arch. Biochem. Biophys. 1994. V. 313. № 1. P. 1–7.



## Secretion of Proteolytic Enzymes by Three Phytopathogenic Microorganisms

N. N. Kudryavtseva, A. V. Sofyin, T. A. Revina, E. L. Gvozdeva, E. V. Ievleva, and T. A. Valueva

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: valueva@inbi.ras.ru*

Received February 20, 2013

**Abstract**—Serine proteinases from three phytopathogenic microorganisms that belong to different fungal families and cause diseases in potatoes were studied and characterized. The oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and the fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium culmorum* were shown to secrete serine proteinases. An analysis of the substrate specificity of these enzymes and their sensitivity to synthetic and protein inhibitors allowed us to refer them to trypsin- and subtilisin-like proteinases. The correlation between the trypsin- and subtilisin-like proteinases depended on the composition of the culture medium, particularly on the form of the nitrogen source. A phylogenetic analysis was carried out. In contrast to basidiomycetes *R. solani*, ascomycetes *F. culmorum* and oomycetes *P. infestans* produced a similar set of exoproteinases, although they had more distant phylogenetic positions. This indicated that the secretion of serine proteinases by various phytopathogenic microorganisms also depended on their phylogenetic position. These results allowed us to suggest that exoproteinases from phytopathogenic fungi play a different role in pathogenesis. They may promote the adaptation of fungi if the range of hosts is enlarged. On the other hand, they may play an important role in the survival of microorganisms in hostile environments outside their hosts.