



Пролин-специфичные пептидазы алкалофильных и алкалотолерантных грибов семейства Plectosphaerellaceae

Алкин Н.А.

Научные руководители:

Дунаевский Я.Е.

Белякова Г.А.

Москва, 2019

Грибы щелочных местообитаний

Алкалофильные

Алкалотолерантные

210 видов

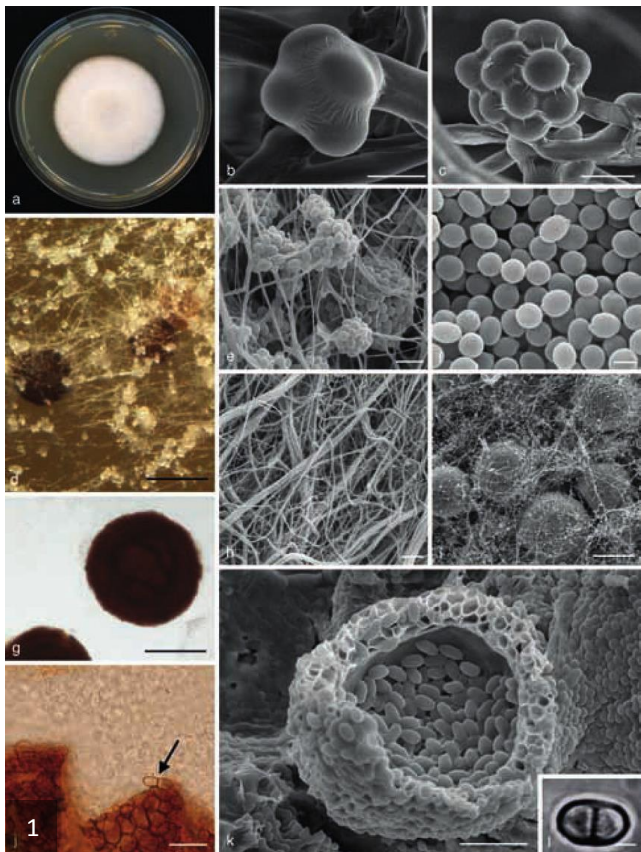
110 родов

47 семейств

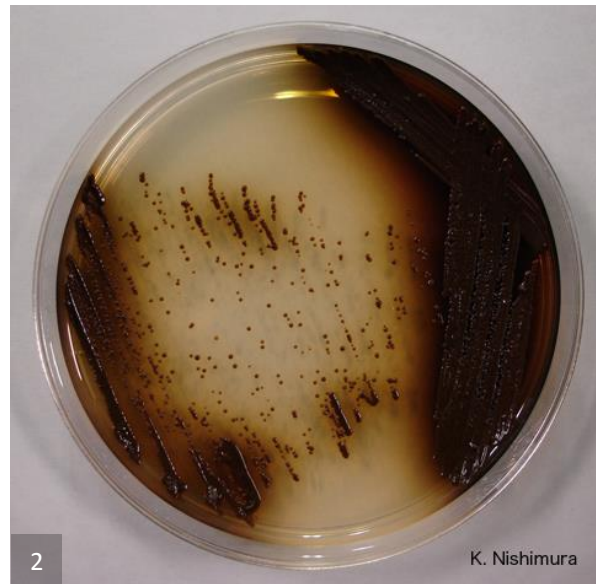
25 порядков

12 классов

4 отдела



Sodiomyces alkalinus



Exophiala alcalophila

Грибы щелочных местообитаний

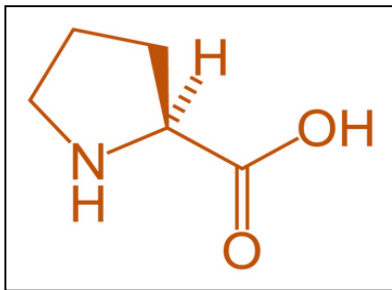


Содовые озёра

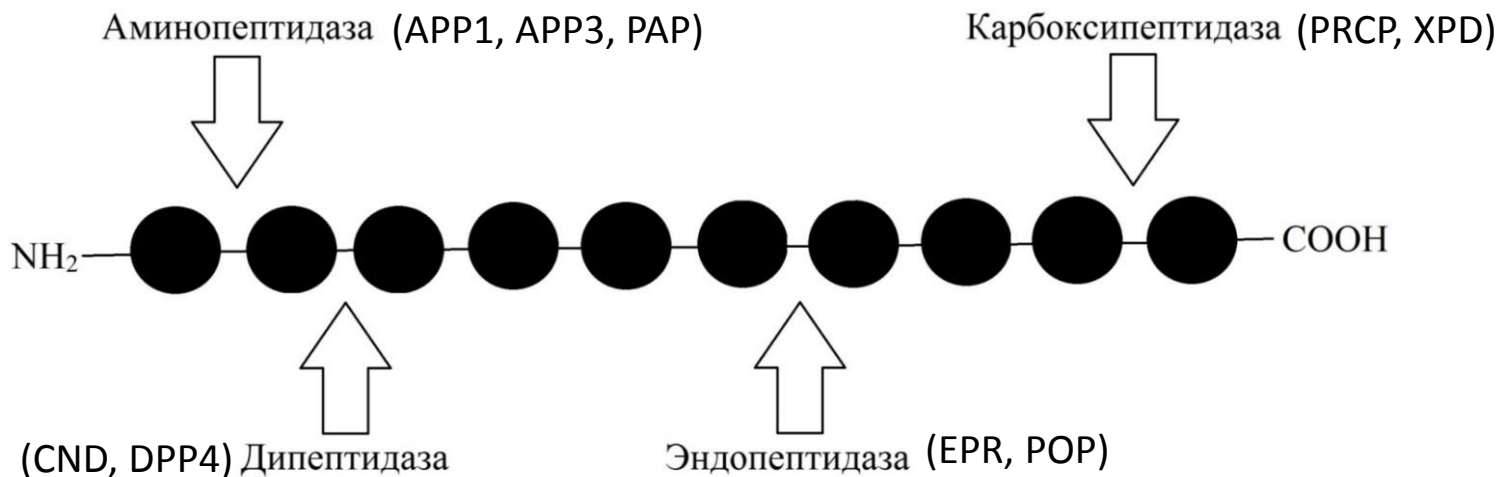


Содовые солончаки

Пролин-специфичные пептидазы (ПСП)



- питание
- процессинг белков и олигопептидов
- автолиз плодовых тел
- патогенность
- внутриклеточный сигналинг
- * накопление свободного пролина



Цели и задачи

Цель работы:

Характеристика пролин-специфичных пептидаз алкалофильных и алкалотолерантных представителей семейства Plectosphaerellaceae

Задачи:

1. Провести биоинформатический анализ гомологов ПСП в геноме *Sodiomyces alkalinus* и сравнить их с гомологами ПСП в геномах других высших грибов.
2. Установить биохимическими методами наличие и локализацию ПСП в жидких культурах алкалофильных и алкалотолерантных грибов.

3. Определить оптимальный pH работы грибных ПСП.
4. Определить стабильность грибных PSP в условиях повышенной солёности и экстремальной кислотности.
5. Установить чувствительность грибных PSP к набору как специфичных ингибиторов PSP, так и стандартных класс-специфичных ингибиторов пептидаз.

Используемые культуры

Вид	Штамм	Место сбора	Отношение к рН
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	V205 (CBS 137625)	Кулундинская степь; озеро	Алкалотолерант
<i>Chordomyces antarcticus</i>	M27 (CBS 120045)	Кулундинская степь; озеро	Алкалотолерант
<i>Sodiomyces alkalinus</i>	F11 (CBS 110278)	Монголия; озеро	Алкалофил
<i>Sodiomyces magadiensis</i>	MAG5 (CBS 142933)	Кения, содовая почва на берегу оз. Магади	Алкалофил
	B39 (CBS 142937)	Россия; засоленная почва на берегу оз. Баскунчак	Алкалофил
<i>Sodiomyces tronii</i>	MAG3 (CBS 137620)	Кения, озеро Магади; берег озера	Алкалофил
<i>Verticillium zaregamsianum</i>	V201 (CBS 137621)	Забайкалье; озеро	Алкалотолерант

Материалы и методы

Биоинформатический анализ спектра ПСП

- **Базы данных** GenBank, SWISS-PROT, TrEMBL
- **Онлайн-сервисы** Protein BLAST, COBALT, TMHMM v. 2.0, SignalP 4.1, IPC, NCBI Batch CD-search
- **42** секвенированных **генома** дикариомицетов, в т.ч. *Sodiomyces alkalinus* F11

Материалы и методы

- рост культур на жидком щелочном мальт-агаре (ЩА)
- отделение мицелия и фильтрация культуральной жидкости
- заморозка мицелия жидким азотом, его измельчение и получение клеточного экстракта
- спектрофотометрическое измерение активности ПСП в культуральной жидкости и клеточном экстракте:
 - а) при различных pH
 - б) при различных концентрациях NaCl
 - в) в присутствии ингибиторов

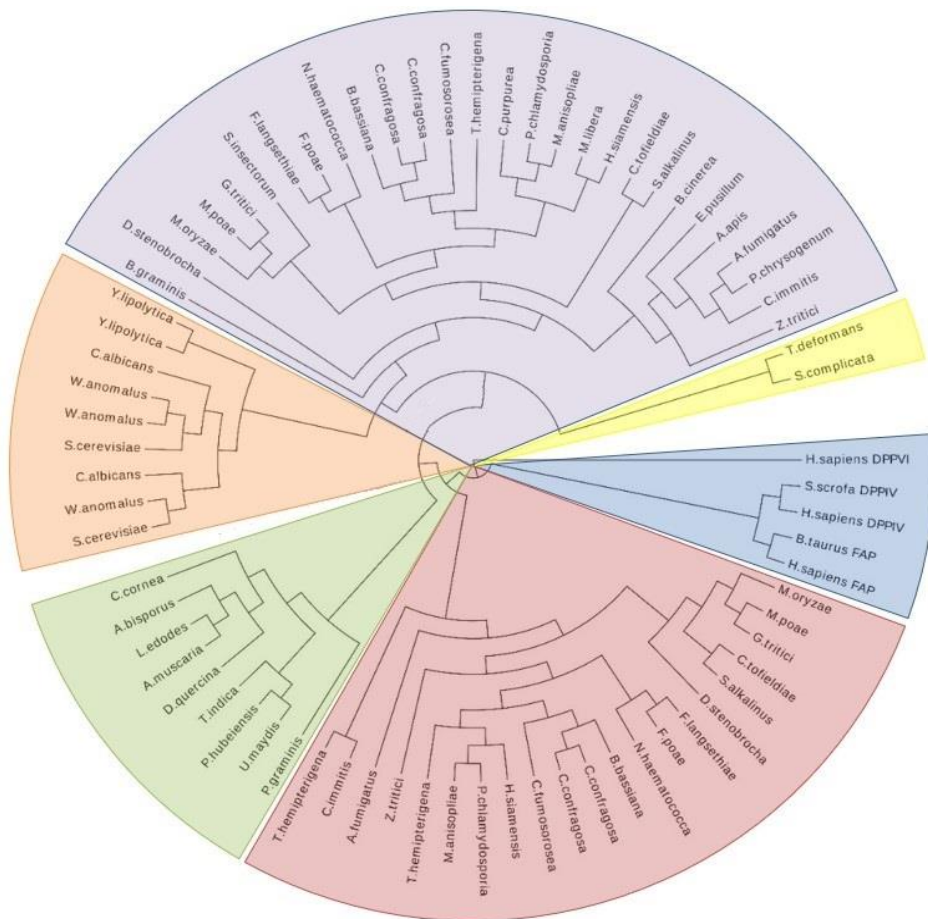
Гомологи ПСП *S. alkalinus in silico*

Белок	Семейство	Номер в GenBank	АО	M _r , Да	pI	SP	TM
DPP4	S9B	ROT37187.1	947	106022	4,80	-	+ (110-132)
DPP4	S9B	ROT38925.1	782	87461	4,66	+ (1-26)	-
EPR	S28	ROT41790.1	399	44752	4,62	-	-
APP1	M24	ROT40160.1	617	68557	5,56	-	-
CND	M20	ROT43826.1	907	100627	5,32	-	-
CND	M20	ROT41757.1	476	52267	5,21	-	-
XPD	M24	ROT42762.1	505	56881	5,69	-	-
XPD	M24	ROT38161.1	461	49592	5,56	-	-
APP3	M24	ROT34876.1	448	49592	5,56	-	-

АО – число аминокислотных остатков; M_r – молекулярная масса, pI – изоэлектрическая точка, SP – сигнальный пептид, TM – трансмембранный участок.

APP1, APP3 – аминопептидазы Р, CND – цитозольная неспецифическая дипептидаза, DPP4 – дипептидилпептидаза 4, EPR – кислая эндопептидаза, XPD – пролидаза.

Кладодграмма гомологов DPP4



□ Секретируемые формы
(Ascomycota)

Basidiomycota

■ Taphrinomycotina

 Saccharomycotina

■ Pezizomycotina

□ Аутгруппа (Holozoa)

Алгоритм: Fast Minimal Evolution

Обнаруженные *in vitro* ПСП

		Штамм						
		V205	M27	F11	MAG5	B39	MAG3	V201
Фермент	DPP4							
	LAP/CND							
	PAP							
	APP	-	-	-	-	-	-	-
	POP	-	-	-	-	-	-	-
	PRCP	-	-	-	-	-	-	-



В культуральной жидкости



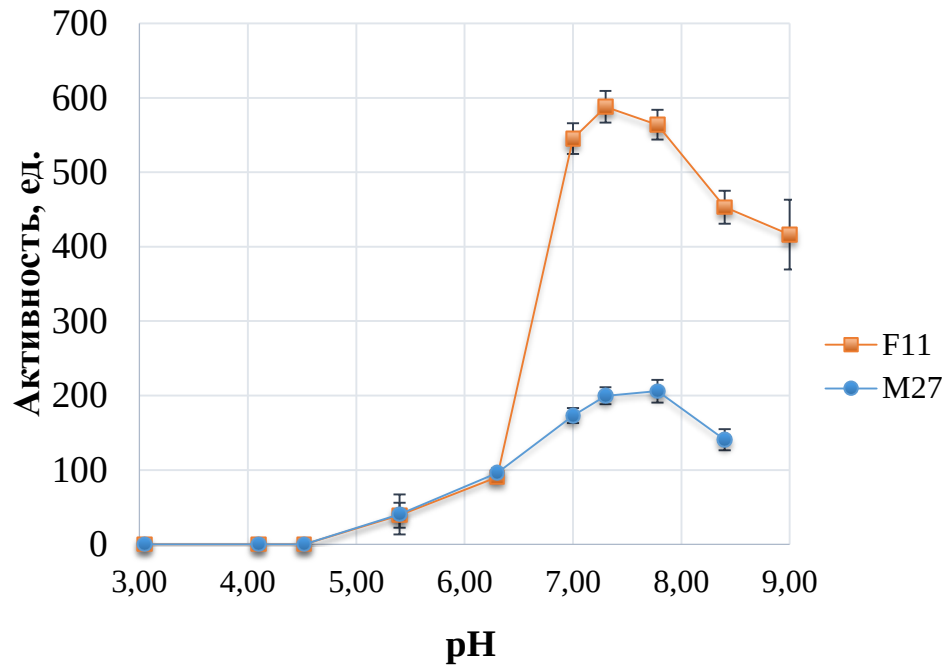
В культуральной жидкости и клеточном экстракте



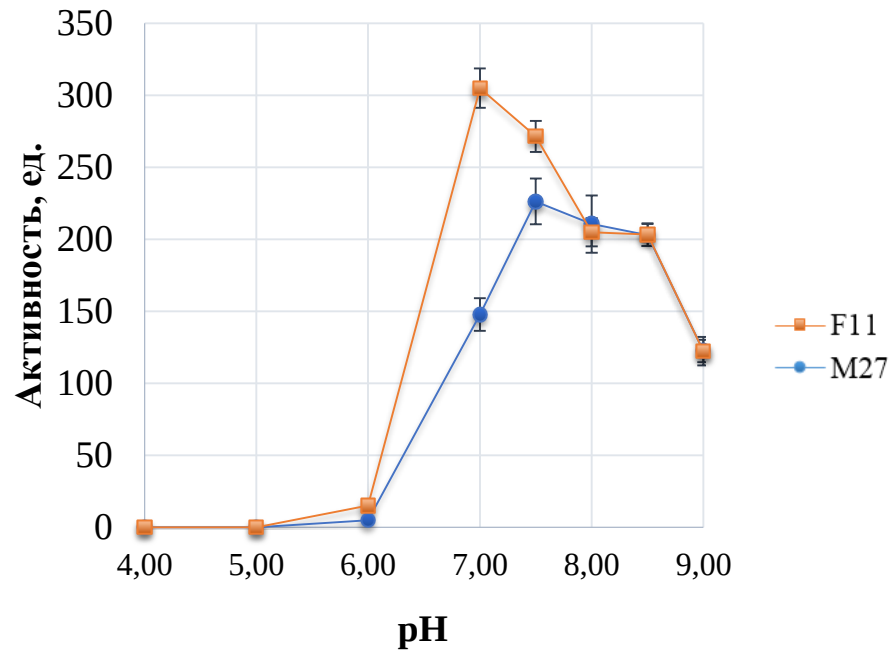
В клеточном экстракте

pH-оптимум работы ПСП

DPP4

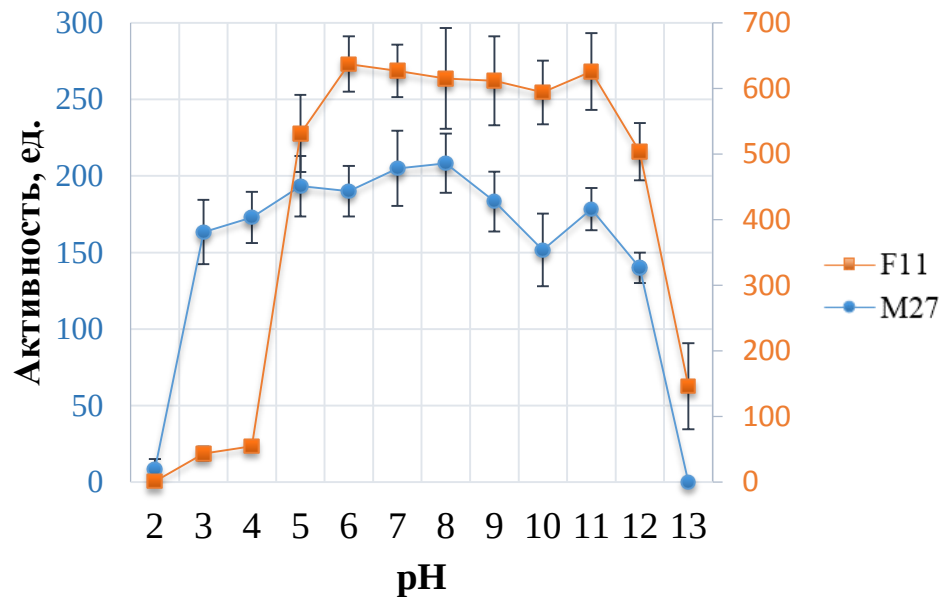


PAP

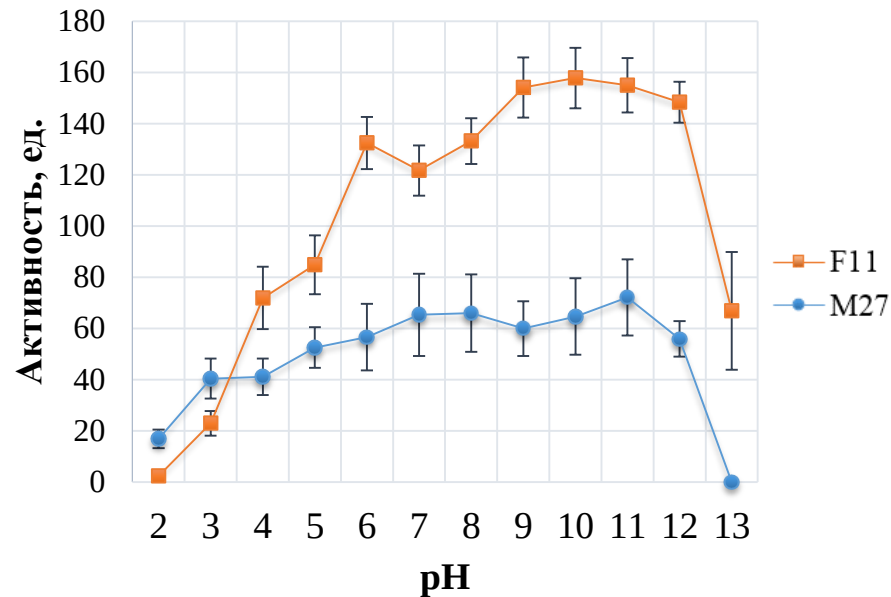


pH-стабильность ПСП

DPP4

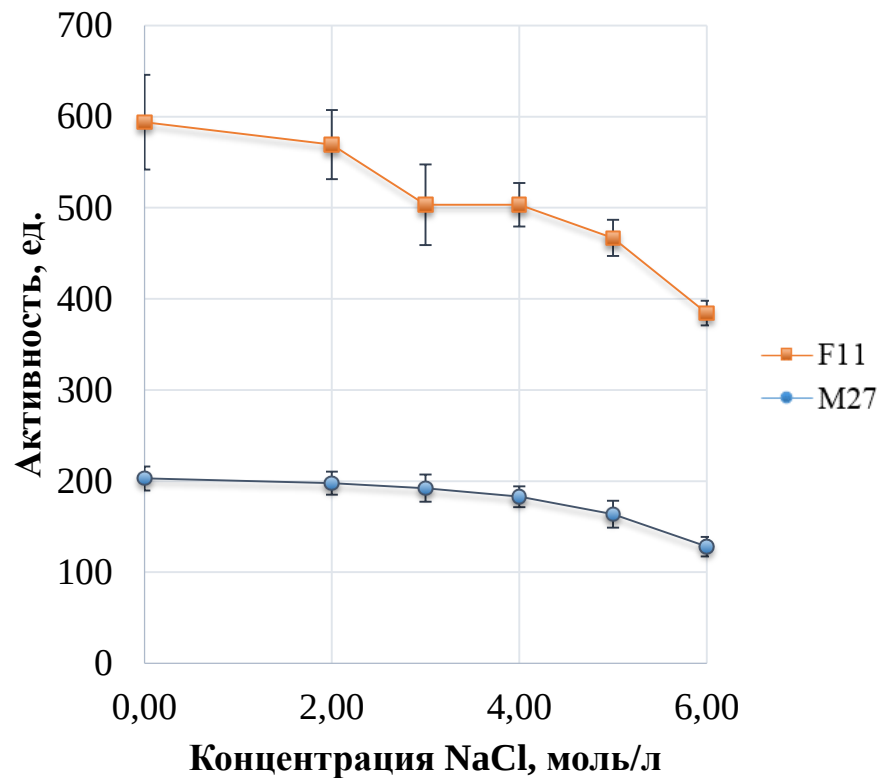


LAP/CND

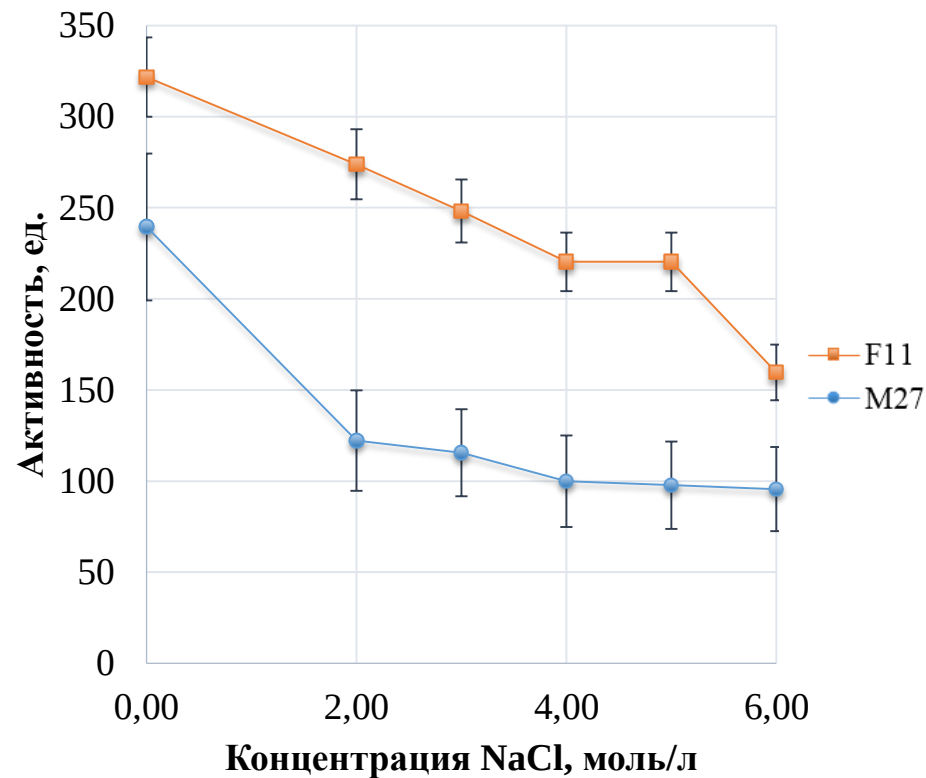


Солеустойчивость ПСП

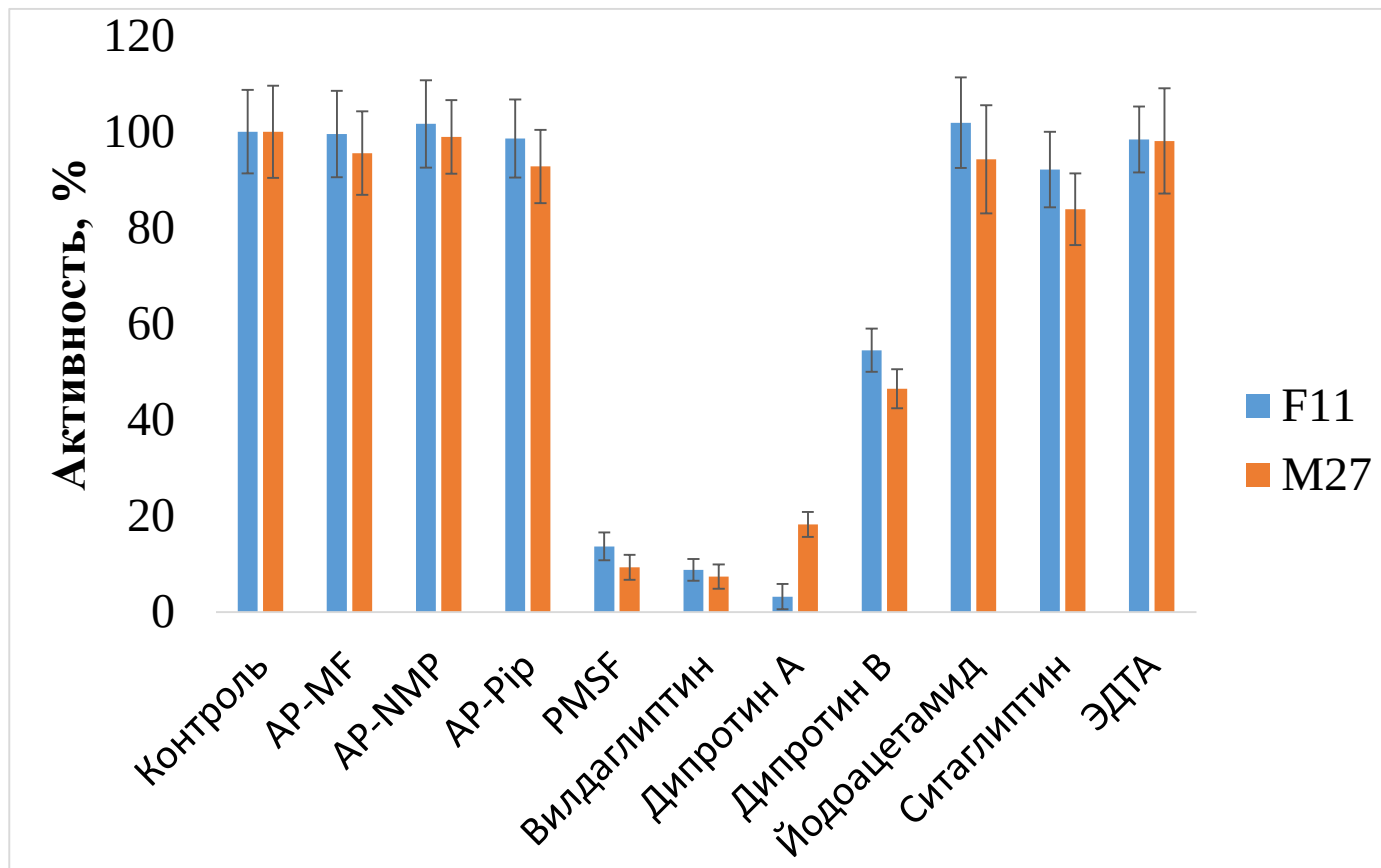
DPP4



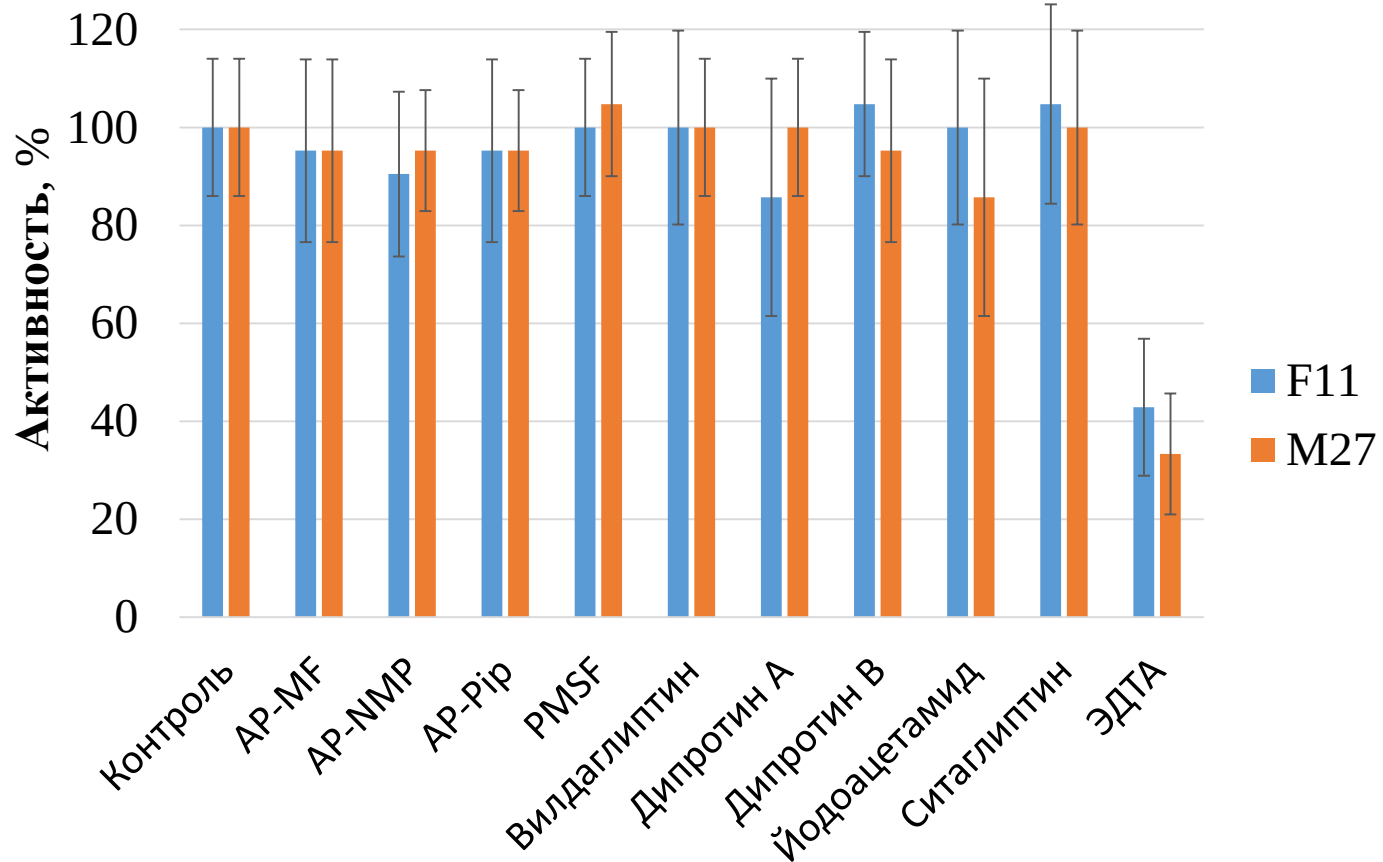
PAP



Воздействие ингибиторов на DPP4



Воздействие ингибиторов на PAR



Выводы

1. Проанализировано 42 секвенированных генома грибов, в которых обнаружены гомологи ПСП, показана таксоноспецифичность и приуроченность к определённым эколого-трофическим группам некоторых из найденных ПСП.
2. В геноме *Sodiomyces alkalinus* F11 обнаружено 9 гомологов PSP, согласующихся с их систематическим положением.
3. В культуральной жидкости и клеточном экстракте алкалофильных и алкалотолерантных грибов из семейства Plectosphaerellaceae, а также алкалотолерантного вида *Acrostalagmus luteoalbus* обнаружена активность, соответствующая ферментам CND, DPP4 и PAP; ферментативной активности APP, POP и PRCP обнаружено не было.
4. Оптимальный pH действия всех обнаруженных ферментов лежит в нейтральной и слабощелочной области (pH 7.0-7.7).

Выводы

5. CND и DPP4 штаммов *S. alkalinus* F11 и *C. antarcticus* M27 стабильны в широком диапазоне pH (5.0-12.0), PAP стабильна в диапазоне pH 5.0-10.0. Все обнаруженные ферменты сохраняют от 40 до 60% активности в условиях экстремальной солёности (6M NaCl).
6. Ингибиторный анализ показал, что DPP4 и CND *S. alkalinus* F11 и *C. antarcticus* M27 являются сериновыми пептидазами, тогда как PAP чувствительна к действию ЭДТА и является металлопротеазой.
7. Исследованные алкалофильные и алкалотолерантные грибы обладают сходным набором ПСП, наблюдаемые различия касаются, главным образом, количественных значений активности и устойчивости изученных ферментов. Алкалофильные штаммы рода *Sodiomyces*, в отличие от алкалотолерантных, обладают двумя формами DPP4.

Спасибо за внимание!



ALCO-



ALKALO-

Источники иллюстраций

- 1 – https://www.researchgate.net/figure/Sodiomyces-alkalinus-CBS-110278-a-Ten-day-old-colony-on-alkaline-agar-9-cm-Petri_fig1_261841033
- 2 – http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/e/Exophiala_alcalophila_colonies.htm
- 3 – https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Lake_Assal_3-Djibouti.jpg
- 4 – <https://www.laspilitas.com/plants/help/alkali.htm>