

Maria Kołaczowska¹, Józefa Chrzanowska,² Jacek Bania¹

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu¹

Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych Akademii Rolniczej we Wrocławiu²

Enzymy hydrolityczne entomopatogennych grzybów i ich rola w patogenezie

Wstęp

Entomopatogeny to liczna grupa przedstawicieli wirusów, bakterii, grzybów oraz pierwotniaków pasożytujących na owadach. W grupie tej znaczącą rolę odgrywają grzyby, wśród których najlepiej poznane są dwa gatunki — *Beauveria bassiana* i *Metarhizium anisopliae* należące do klasy *Deuteromycetes*, w której występują również liczne patogeny roślin i ludzi.

Entomopatogenne grzyby, w przeciwieństwie do wirusów, bakterii i pierwotniaków, nie porażają owadów poprzez przewód pokarmowy. Ich kiełkujące zarodniki przedostają się do organizmu owada przez kutykulę (oskórek), stanowiącą jego zewnętrzną osłonę. Dalsze rozrastanie się strzępek grzyba powoduje zablokowanie światła przewodu pokarmowego owada i zahamowanie krążenia hemolimfy. Wytwarzane dodatkowo toksyny porażają jego układy i tkanki [18].

Czynnikami warunkującymi wirulencję grzybów są między innymi zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne: proteazy i chitynazy (tab. 1). Szczególnie enzymy proteolityczne spełniają ważną rolę w procesie patogenezy [5, 13, 23, 25]. Wyjaśnienie mechanizmów tego procesu ma bardzo duże znaczenie praktyczne. Czynniki patogenne mogą być bowiem wykorzystane jako naturalne biopestycydy, które częściowo mogą zastąpić toksyczne chemiczne środki owadobójcze [1, 31]. Dlatego prowadzone są intensywne badania nad wprowadzaniem genów warunkujących wytwarzanie enzymów degradujących białka kutykuli do różnych mikroorganizmów lub nawet do samych roślin, celem ograniczenia żerowania owadów na takich roślinach. Ponadto znajomość podstaw wirulencji grzybów może również pomóc w ochronie gatunków owadów o dużym znaczeniu gospodarczym.

Tabela 1. Charakterystyka niektórych hydrolaz uczestniczących w procesie degradacji kutykuli

Enzym	Źródło	Masa cząst. kDa	pI	Optimum pH	Substrat	Literatura
Proteaza serynowa Pr1	<i>M. anisopliae</i>	28,5–31,5	9,3–10,2	8,0	Suc-(Ala) ₂ ProPheNA	[23]
Proteaza serynowa Pr2	<i>M. anisopliae</i>	27,0; 30,0	4,4; 4,9	8,0	Bz-PheValArgNA	[23]
Proteaza cysteinowa Pr4	<i>M. anisopliae</i>	26,7	4,6	8,0	Bz-PheValArgNA	[9]
Aminopeptydaza metalozależna	<i>M. anisopliae</i>	45,0	4,51	7,0	Ala--naftylamid	[33]
Karboksypeptydaza serynowa	<i>M. anisopliae</i>	30,0	9,9	7,0	FAPP	[24]
Proteaza serynowa Pr1	<i>B. bassiana</i>	35,0	9,3	8,5	kazeina, żelatyna, elastyna	[1]
Endochitynaza	<i>M. anisopliae</i>	45,0	4,8	5,3	chityna	[30, 38]
Egzochitynaza	<i>M. anisopliae</i>	110,0	—	6,2	pNP-NAG	[30]

N-(2furyloakrylo)-L-Phe-Ala-L-Phe-Ala — FAPP; sukcylo — Suc; benzoilo — Bz; p-nitroanilina — NA;
 p-nitrofenylo-β-D-N-acetylo-glukozaminian — pNP-NAG

Enzymy jako główne czynniki wirulencji grzybów

Kutykula (oskórek) owadów zbudowana jest z mikrofibrili chityny, osłoniętych białkami, które stanowią 55–80% całkowitej jego masy [4, 41]. Skład białek w zależności od gatunku może być bardzo zróżnicowany. Najczęściej głównymi białkami oskórka są kolagen — bogaty w prolinę oraz resilina charakterystyczna tylko dla bezkręgowców [1]. W oskórku konika polnego (*Melanoplus sanguinipes*) wykazano techniką dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym obecność aż około 200 białek, które różniły się punktem izoelektrycznym, masą cząsteczkową i obecnością cukrów [5]. Potraktowanie kutykuli tego owada płynem pochodzącym z *M. anisopliae* i *B. bassiana*, zawierającym enzymy proteolityczne powodowało utratę od 41–83% jego suchej masy, w wyniku degradacji kwaśnych oraz zasadowych wysokocząsteczkowych białek oskórka. Obok białek, głównym składnikiem oskórka owadów, stanowiącym około 30% jego masy, jest chityna — homopolimer N-acetylo-D-glukozaminy. Ze względu na dominującą rolę białek w pokrywie owadów inicjującą rolę przy przenikaniu grzybów do wnętrza żywiciela przypisuje się zewnątrzkomórkowym enzymom proteolitycznym [1, 23]. Poza degradacją kutykuli proteazy mogą spełniać również inne funkcje w procesie infekcji, takie jak: aktywacja prekursorów toksyn grzybowych [3], destrukcja przeciwwgrzybowych białek wydzielanych przez zaatakowane owady i uwalnianie aminokwasów wykorzystywanych do produkcji amin oraz trawienie białek żywiciela wykorzystywanych przez grzyba jako pożywienie [34]. W wyniku enzymatycznej hydrolizy białek kutykuli ułatwione jest wnikanie strzępek grzyba do organizmu owada. Przed zapoczątkowaniem procesu proteolizy, enzymy produkowane przez grzyba są adsorbowane na powierzchni oskórka owada na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych [27]. Mogą one wiązać się z małymi ujemnie naładowanymi regionami zasadowych białek oskórka, powodując ich hydrolizę lub też mogą asocjować z zasadowymi produktami powstałymi w wyniku hydrolizy. Zewnątrzkomórkowe proteazy *M. anisopliae*, *B. bassiana* i *Verticillium lecanii* adsorbują się do kutykuli w przedziale pH od 4,0 do 7,0, przy czym ponad 50% z nich ulega dysocjacji już w obecności 10 mM buforu fosforanowo-potasowego o pH 7,0 [6].

Istotne znaczenie dla adsorpcji proteaz zasadowych entomopatogenów spełniają wolne grupy karboksylowe obecne na powierzchni kutykuli, a dla wiązania proteaz z *M. anisopliae* i *V. lecanii* dodatkowo jeszcze hydroksylowe grupy tyrozyny [6, 27]. Reszty kwasu asparaginowego i glutaminowego mają w pH obojętnym charakter kwaśny, dzięki czemu ułatwiona jest adsorpcja zasadowych proteaz grzybowych. Ładunki tych reszt zmieniają się pod wpływem zmiany pH środowiska. Adsorpcja proteaz z *M. anisopliae* i *V. lecanii* spada znacznie w pH od 2,0 do 4,0, gdyż odpowiada to wartościom stałych dysocjacji pK_{α} dla grup karboksylowych kwasu asparaginowego (pK_{α} grupy $-\text{COOH}_{\alpha}$ wynosi 2,1, pK_{α} grupy $-\text{COOH}_{\beta}$ wynosi 3,9) oraz kwasu glutaminowego (pK_{α} grupy $-\text{COOH}_{\alpha}$ wynosi 2,2, pK_{α} grupy $-\text{COOH}_{\chi}$

wynosi 4,2). Estryfikacja grup karboksylowych, jak również konwersja eksponowanych reszt aspartylowych i glutamyliwych do pochodnych amidowych, powoduje obniżenie zdolności wiązania się proteaz. Z kolei wprowadzenie nowych grup karboksylowych do kutykuli oraz zablokowanie grup aminowych poprzez fenyloglioksylację wzmacnia adsorpcję enzymów. Z drugiej strony modyfikacja białek kutykuli poprzez fenyloglioksylację zmniejsza ich podatność na hydrolizę przez zaadsorbowane enzymy. Acetylacja grupy OH tyrozyny zmniejsza również adsorpcję proteaz z *M. anisopliae* i *V. lecanii*.

Dodatek 10 mM kwasu asparaginowego i lizyny hamuje adsorpcję proteaz najprawdopodobniej na skutek interferencji spowodowanej ich interakcją z naładowanymi grupami w białkach kutykuli lub w cząsteczce enzymu. Obecność natomiast wolnych aminokwasów z niepolarnymi grupami alifatycznymi nie wpływa na adsorpcję proteaz. Proces ten jest również silnie hamowany przez wysokie stężenia KCl oraz kationowe detergenty, które blokują ujemnie naładowane grupy karboksylowe w białkach kutykuli. Oprócz oddziaływań elektrostatycznych na proces adsorpcji enzymów wpływają też inne czynniki, jak lokalizacja białek w oskórku owada, wzajemna interakcja białko–chityna lub stopień glikozylacji białek [5].

Kwaśne proteazy grzybowe nie ulegają adsorpcji do kutykuli. Nie jest to jednak związane z brakiem zasadowych aminokwasów, gdyż kutykula np. konika polnego zawiera porównywalną ilość aminokwasów zasadowych (7,9%) i kwaśnych (8,4%) [4], a wynika to najprawdopodobniej z rozmieszczenia reszt kwaśnych aminokwasów na powierzchni kutykuli i ich ujemnego ładunku.

Procesowi zakażenia towarzyszy trawienie oskórka owada, polegające na hydrolizie białek kutykuli do peptydów i aminokwasów. Enzymy proteolityczne uwalniają również małe ilości aminocukrów. Obserwacje te sugerują, że wewnątrz struktury białkowej istnieją krótkie łańcuchy chityny, nie związane ze strukturą fibrylarną. W wyniku działania proteaz zostają odsłonięte mikrofibryle chityny, które stają się dostępne dla enzymów chitynolitycznych [26]. Za pomocą przeciwciał monoklonalnych i technik immunocytochemicznych wykazano, że w początkowym stadium wnikania strzępek grzyba do organizmu owada chitynazy są produkowane w niewielkiej ilości przez infekcyjne struktury tzw. przycistki (appressorium) na powierzchni kutykuli. Znaczne ilości tych enzymów gromadziły się w strefie degradacji proteolitycznej w późniejszej fazie infekcji. Zazwyczaj najwyższe stężenia chitynaz wykazuje się w 40 godzin po infekcji patogenem [38]. Obserwacje te potwierdzają, że zwalnianie chitynaz jest zależne od dostępności chityny. Synteza enzymów chitynolitycznych jest regulowana przez mechanizm indukcji i katabolicznej represji [30]. Wysoką ich aktywność stwierdza się w hodowlach zawierających chitynę jako induktor, natomiast uwolniona z chityny N-acetyloglukozamina zmniejsza syntezę enzymów chitynolitycznych. Inne polimery takie jak pektyna, ksylan i celuloza pozostają bez wpływu na syntezę chitynaz.

Grupę enzymów chitynolitycznych scharakteryzowano wśród entomopatogennych grzybów u *B. bassiana*, *M. anisopliae* i *M. flavoviride* [14, 29, 32, 38]. Każdy z tych gatunków produkuje endochitynazy, N-acetylo- β -D-glukoaminidazy (egzochitynazy), a *M. flavoviride* dodatkowo jeszcze syntetyzuje 1,4- β -chitozydazę. Przeważająca ilościowo endochitynaza z *M. anisopliae* o masie cząsteczkowej 45 kDa i znanej sekwencji 23 aminokwasów, z N-końcową alaniną, wykazuje pI w pH 4,8 i hydrolizuje chitynę do oligomerów. Egzochitynazy degradują dalej oligomery chityny do chitobiozy i N-acetyloglukozy, która jest wykorzystywana przez grzyba jako składnik pokarmowy [38].

Obok proteaz i chitynaz entomopatogenne grzyby wytwarzają również inne zewnątrzkomórkowe enzymy: lipazy, amylazy [21], których rola w procesie patogenezy nie została jeszcze dotąd poznana. W hodowlach entomopatogennych grzybów obserwuje się późne pojawianie zewnątrzkomórkowych lipaz [15, 26]. Jest to związane ze zdecydowaną przewagą białek i chityny w strukturze kutykuli. Enzymy lipolityczne spełniają prawdopodobnie niewielką rolę w procesie degradacji kutykuli, gdyż w młodych strzępkach grzyba są one głównie enzymami wewnątrzkomórkowymi, a w dużych ilościach są uwalniane dopiero podczas autolizy komórek.

Enzymy proteolityczne entomopatogennych grzybów *Beauveria bassiana* i *Metarhizium anisopliae*

Grzyb *B. bassiana* jest pasożytem atakującym wiele różnych owadów. Do jego żywicieli należą między innymi mucha domowa (*Musca domestica*), barciak większy (*Galleria mellonella*), który jest szkodnikiem pszczoł i gąsienica kapustna (*Trichoplusia ni*). Z tego też powodu grzyb ten uważany jest za jeden z obiecujących naturalnych insektycydów. Poziom produkcji enzymów proteolitycznych degradujących kutykulę tego gatunku zależy zarówno od szczepu, jak i od rodzaju pożywki [2, 13, 40].

Bidochka i Khachatourians [1] wyizolowali z płynów pochodzących z hodowli *B. bassiana* GK2016 serynową proteazę [Pr1]. Największą wydajność biosyntezy enzymu uzyskano w pH 7,0. Proteaza ta, różniąc się od trypsyny specyficznością, ma masę cząsteczkową 35 kDa i działa optymalnie w pH 8,5, w temperaturze 37°C. Aktywność tego enzymu gwałtownie spada w pH poniżej 7,0 i powyżej 9,0 oraz powyżej 50°C. Dodatek CaCl₂ w niewielkim stopniu stabilizuje enzym przed termiczną denaturacją. Enzym ten hydrolizuje elastynę, kazeinę i żelatynę, a dużo mniejszą aktywność wykazuje wobec albuminy z surowicy wołu (BSA) i kolagenu. Wyizolowana zewnątrzkomórkowa alkaliczna proteaza z *B. bassiana* [Pr1] wykazuje wysoką aktywność wobec białek kutykuli, dzięki czemu ułatwia ona wnikanie grzyba do organizmu owada [3]. Enzym ten różni się od tego samego typu proteazy Pr1 z *M. anisopliae*

niższym punktem izoelektrycznym i większą aktywnością wobec syntetycznych substratów zawierających alaninę w pozycji P₂ i P₃. Analiza sekwencji cDNA proteazy Pr1 z *B. bassiana* [17] wykazała, że jest ona syntetyzowana jako prekursor o masie cząsteczkowej 37,4 kDa, zawierający peptyd sygnałowy, a wyliczona masa cząsteczkowa dojrzałego białka enzymatycznego wynosi 26,8 kDa. N-końcowa sekwencja białka prekursorowego jest następująca: Ala-Val-Val-Arg-Glu-Ala. Pierwszorzędowa struktura białka Pr1 z *B. bassiana* wykazuje 53% homologii w stosunku do enzymu Pr1 z *M. anisopliae* i 59% w stosunku do proteazy K z *Tritirachium album*. Wszystkie te trzy białka zawierają od N-końca hydrofobowy peptyd sygnałowy zbudowany z 18 aminokwasów, wśród których wykazano obecność argininy i proliny.

Z płynów pochodzących z *Beauveria bassiana* 278 [7] natomiast wyizolowano dwie serynowe, chymotrypsynopodobne proteazy, które różniły się między sobą właściwościami biologicznymi i fizykochemicznymi. Oba enzymy I i II są hamowane przez fluorek fenylometylosulfonowy (PMSF), a proteazę II hamuje dodatkowo jeszcze owomukoid z indyka oraz inhibitor z hemolimfy pszczoł *Apis mellifera*. Różnią się one natomiast składem aminokwasowym, optimum pH, stałą Michaelisa oraz powinowactwem do różnych substratów białkowych i syntetycznych peptydów. Z tych samych hodowli wyizolowano również aminopeptydazę [8]. Jest ona całkowicie hamowana przez 1,10-fenantrolinę i inne związki chelatujące jony metali, jak również przez odczynniki redukujące grupy S-S: dithiotreitol (DTT) i β-merkaptoetanol. Enzym nie jest inaktywowany przez PMSF. Posiada on najwyższą aktywność w stosunku do Leu-pNA i Leu-β-naftylamidu. Hydrolizuje również peptydy, w których leucyna jest aminokwasem N-końcowym, a stopień hydrolizy tych substratów wzrasta wraz z wydłużaniem peptydu. Optimum pH dla hydrolizy Leu-pNA przypada w przedziale 8,5–9,0.

Wśród entomopatogennych grzybów najlepiej poznany i scharakteryzowany jest system proteolityczny *M. anisopliae* [11, 23, 26, 28, 34]. Grzyb ten produkuje szereg proteaz, które zostały rozdzielone techniką izoelektrycznego ogniskowania i scharakteryzowane jako:

- Pr1 — proteaza subtylizynopodobna o specyficzności chymoelastazowej (mająca cztery izoformy o punkcie izoelektrycznym (pI) w przedziale pH 9,3–10,2)
- Pr2 — proteaza trypsynopodobna (występująca w dwóch izoformach o pI 4,4 i 4,9).
- Pr4 — proteaza cysteinowa
- metaloproteaza termolizynopodobna (pI 7,3)

Pr1 jest najlepiej poznany i scharakteryzowany enzymem entomopatogennych grzybów, który pełni kluczową rolę w procesie infekcji. Stosując królicze przeciwciała znakowane złotem wykazano, że enzym ten jest uwalniany przez przyciski grzyba na powierzchni kutykuli lub przez penetrujące strzępki wewnątrz oskórka owada [11, 25, 42]. Enzym ten wykazuje szczególnie wysoką aktywność proteolityczną wobec białek kutykuli i hydrolizuje także kazeinę, elastynę i kolagen. Potra-

ktowanie kutykuli króliczymi przeciwciałami anty-Pr1 lub specyficznymi inhibitorami Pr1 powoduje znaczną redukcję infekcyjności *M. anisopliae*. Powyższe obserwacje potwierdzają znaczącą rolę tego enzymu w procesie patogenezy.

Masa cząsteczkowa izoform Pr1 mieści się w przedziale 28,5–31,5 kDa. Właściwości kinetyczne izoform Pr1 zależą od podstawienia reszty P₁ w substracie. W badaniach specyficzności tego enzymu zastosowano do testów enzymatycznych trzy tetrapeptydy Suc-Ala-Ala-Pro-X-pNA, w których X = fenyloalanina, metionina lub leucyna. Izoformy o pI 10,2, 9,8 i 9,3 wykazywały podobną specyficzność w stosunku do fenyloalaniny w pozycji P₁ i były od 10 do 16 razy bardziej reaktywne w stosunku do substratu zawierającego ten aminokwas niż wobec substratu zawierającego w pozycji P₁ leucynę. Peptyd zawierający metioninę w tej pozycji był również dobrym substratem dla każdej z izoform, co świadczy o niskiej specyficzności ich kieszeni substratowej [23]. Porównywalna aktywność izoform białka Pr1 wobec różnych substratów wskazuje na to, że nie są to enzymy wysoko wyspecjalizowane. Ich rola polega przede wszystkim na niespecyficznej degradacji białek kutykuli podczas procesu patogenezy. Duża liczba proteaz wydzielanych przez *M. anisopliae* świadczy o dużych zdolnościach adaptacyjnych grzyba do zmieniających się warunków środowiska.

Z analizy sekwencji cDNA enzymu Pr1 [36] wynika, że jest on syntetyzowany w postaci prekursora (proenzymu), o masie cząsteczkowej 40,3 kDa, który zawiera peptyd sygnałny, zbudowany z 18 reszt aminokwasowych o strukturze α helisy. Proenzym następnie ulega proteolitycznej aktywacji do białka o masie około 29 kDa. Hydrofobowy trzon proenzymu zbudowany jest z ośmiu aminokwasów, wśród których występuje histydyna i prolina zaburzająca strukturę helisy. Struktura proenzymu jest typową dla prosekrecyjnych sekwencji zdolnych do pokonania membrany komórkowej. Istnieje wiele dowodów pozwalających przypuszczać, że enzymy Pr2 i Pr4 pełnią funkcję regulacyjną poprzez ułatwianie szybkiej aktywacji proenzymu Pr1 [22]. Struktura pierwszorzędowa białka Pr1 wykazuje duże podobieństwo do subtilizyny (30% homologii) i proteazy K z *Tritirachium album* (61% homologii) [12]. Wszystkie te enzymy mają w centrum katalitycznym aminokwasy: serynę, histydynę i kwas asparaginowy. Jednak proteaza Pr1 wykazuje znacznie wyższą aktywność wobec białek kutykuli, niż proteaza K, co wskazuje na znaczną specjalizację patogena. Izoforma enzymu o pI 9,3 różni się od innych obecnością glicyny na N-końcu, podczas gdy u pozostałych izoform stwierdzono obecność asparaginy. Takie podstawienie sugeruje możliwość różnicowania się izoform w procesach potranslacyjnych oraz regulację ich aktywności. Obecność kilku form enzymu Pr1 różniących się pI jest prawdopodobnie związana z obecnością przynajmniej dwóch różnych genów powstałych przez duplikację i mutację pojedynczego genu macierzystego. Nie wiadomo, czy izoformy o pI 9,8 i pI 9,3 są kodowane przez jeden czy też dwa różne geny. Białka te są immunologicznie bardzo blisko spokrewnione i mają bardzo podobną, jeżeli nie identyczną specyficzność.

Obecnie prowadzone są badania nad zwiększeniem poziomu biosyntezy tego enzymu z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Planuje się również w przyszłości wprowadzanie genów Pr1 do innych mikroorganizmów lub do komórek roślinnych.

Metarhizium anisopliae wytwarza również zewnątrzkomórkowe metaloproteazy, które nie występują u grzybów tak powszechnie jak serynowe enzymy. Metaloproteaza z *M. anisopliae* (pI 7,3) preferuje w pozycji P₁ substratu fenyloalaninę i jest hamowana przez 1,10-fenantrolinę — typowy inhibitor enzymów zawierających jon cynku w centrum katalitycznym oraz przez inhibitor neutralnych metaloproteaz-fosforamidon. Właściwości tego enzymu wskazują na jego pokrewieństwo z termolizyną [23].

Inne enzymy wytwarzane przez *M. anisopliae* — Pr2 należą do klasy proteaz serynowych i wykazują trypsynopodobną specyficzność substratową [37]. Występują one w trzech formach molekularnych, ale tylko dwie z nich zostały dokładnie scharakteryzowane. Są to enzymy o pI 4,4 i masie cząsteczkowej 30 kDa oraz o pI 4,9 i masie 27 kDa. Obie izoformy trawią wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie aminokwasów naładowanych dodatnio, szczególnie argininy. Izoforma Pr2 o pI 4,4 wykazuje również silną aktywność wobec substratów zawierających lizynę w pozycji P₁. Enzymy Pr2 nie trawią nierozpuszczalnych białek oskórka owadów, jednak hydrolizują one większość rozpuszczalnych, wysokocząsteczkowych zasadowych białek kutykuli. Zastosowane do badań przeciwciała anti-Pr2 wykazały, że izoformy Pr2, podobnie jak Pr1, są uwalniane przez struktury infekcyjne grzyba na powierzchni kutykuli lub w obrębie oskórka owadów przez rozrastające się strzępki grzyba.

Synteza obu enzymów Pr1 i Pr2, podobnie jak wielu innych proteaz grzybowych, jest kontrolowana przez złożony cykl regulacyjny, który obejmuje mechanizm indukcji i derepresji [19, 35]. Badania wykazały, że mRNA Pr1 jest nieobecny w szybko rosnących komórkach, natomiast ulega transkrypcji w pierwszych dwóch godzinach głodu pokarmowego [36]. Podczas braku w środowisku źródła azotu i węgla Pr2 jest indukowany przez liczne białkowe substraty, podczas gdy Pr1 ulega indukcji tylko przez białka kutykuli [20]. Specyficzność indukcji Pr1 odzwierciedla przystosowanie się *M. anisopliae* do procesu patogenezy.

Oprócz enzymów trypsynopodobnych Pr2, *M. anisopliae* produkuje również proteazę o masie 26,7 kDa i pI 4,6, która chociaż wykazuje specyficzność substratową zbliżoną do trypsyny, to jednak należy do klasy proteaz cysteinowych [9]. Hamowana jest ona przez specyficzne inhibitory tej klasy enzymów, takie jak kwas jodoctowy i N-etylomaleimid (NEM). Została nazwana Pr4 i jest pierwszą proteazą cysteinową odkrytą u grzybów. Enzym ten wykazuje preferencje do reszty argininy w pozycji P₁, podobnie jak roślinne proteazy cysteinowe. Proteaza Pr4 wykazuje wyższą niż Pr2 aktywność wobec białek kutykuli, ale niższą niż aktywność Pr1. Jednak rola enzymu Pr4 w procesie patogenezy nie jest dotychczas wyjaśniona.

Oprócz endoproteaz poznano również u *M. anisopliae* kilka egzopeptydaz [24, 33, 39], które degradują peptydy do wolnych aminokwasów wykorzystywanych w metabolizmie grzyba. Z płynów pohodowlanych wyizolowano karboksypeptydazę [24]. Enzym ten, hamowany przez diizopropylodifluorofosforan sodu (DFP), można zaliczyć do klasy enzymów serynowych. Karboksypeptydaza z *M. anisopliae* różni się od typowych grzybowych karboksypeptydaz serynowych, przede wszystkim masą cząsteczkową, punktem izoelektrycznym oraz wrażliwością na inhibitory. Enzym ten jest małym (30 kDa), zasadowym (pI 9,97) białkiem o optimum aktywności w pH obojętnym i jest hamowany przez związek chelatujący metale — 1,10-fenantrolinę. Proteaza z *M. anisopliae* nie jest natomiast hamowana przez Ca^{2+} , tak jak typowe metaloproteazy, a po zahamowaniu aktywności przez 1,10-fenantrolinę nie ulega reaktywacji przez dodatek jonów Zn^{2+} lub Co^{2+} . Sekwencja N-końcowa tego enzymu złożona z 22 reszt aminokwasowych nie wykazuje podobieństwa do sekwencji innych białek. W przeciwieństwie do innych karboksypeptydaz grzybowych, proteaza z *M. anisopliae* jest całkowicie hamowana przez inhibitor karboksypeptydazy z ziemniaka. Karboksypeptydazy serynowe, szeroko rozpowszechnione wśród grzybów spełniają funkcję enzymów trawiennych, dostarczając aminokwasów z zewnątrzkomórkowych białek pokarmowych. Odmienne właściwości karboksypeptydazy z *M. anisopliae* mogą mieć duże znaczenie w procesie patogenezy. Szczególnie niska masa cząsteczkowa tego enzymu może ułatwiać dyfuzję białka przez tkanki owada, a jego maksimum aktywności w pH około 7,0 zbliżone jest do pH kutykuli.

Podobną rolę pełni najprawdopodobniej też aminopeptydaza wytwarzana przez *M. anisopliae*. Jej obecność stwierdzono histochemicznie w dojrzałych przyciskach grzyba. Spośród pięciu kwaśnych aminopeptydaz najlepiej została poznana izoforma o pI 4,51, masie cząsteczkowej 45 kDa i optimum pH 7,0 [33]. Jest to metaloproteaza, o szerokiej specyficzności substratowej, jednak najlepiej hydrolizuje ala- β -naftylamid. Dalszy rozkład peptydów uwalnianych przez proteazę Pr1 czy też Pr2 i Pr4 może prowadzić też prolylodipeptydylo-peptydaza [33]. Jest to enzym hamowany przez DFP o masie 74 kDa i pI 4,0 oraz optimum pH 8,0. Wykazuje on silne powinowactwo wobec peptydów zawierających resztę proliny w przedostatniej pozycji. Ponieważ prolina stanowi około 10% całkowitej ilości aminokwasów w kutykuli owada [29], stąd obecność tego enzymu w środowisku ułatwia jej hydrolizę.

W procesie patogenezy współdziałają ze sobą endo- i egzopeptydazy. Jednak kluczową rolę w trawieniu białek przypisuje się subtylizynopodobnej proteazie Pr1, która hydrolizuje 25–30% białek. Synteza enzymów, a szczególnie proteazy Pr1 i karboksypeptydazy, wzrasta w warunkach głodu, a ich aktywność jest indukowana przez obecność kutykuli.

Inne gatunki grzybów entomopatogennych wytwarzają podobne do *B. bassiana* lub *M. anisopliae* enzymy hydrolityczne. Najlepiej poznano również ich systemy proteolityczne, przy czym stwierdzono, że w obrębie gatunku mogą występować czasami znaczne różnice w poziomie syntetyzowanych proteaz. Gatunki: *Verticillium*

lecanii, *Nomuraea rileyi*, *Aschersonia aleyrodinis* i *Beauveria bassiana* produkują serynowe proteazy wrażliwe na PMSF, przy czym niektóre z nich wykazują pI w alkalicznym (pI 7,0), inne natomiast w kwaśnym środowisku [31]. Te ostatnie były aktywne wobec estrowych i amidowych substratów chymotrypsyny, ale w przeciwieństwie do tych pierwszych nie wykazywały aktywności elastazowej. Enzymy zasadowe intensywniej hydrolizowały syntetyczne substraty elastazy, np. Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, ale zarówno one, jak i kwaśne proteazy jednakowo rozkładają białka kutykuli i substrat białkowy (proszek) ze skóry cielęcej (HPA) [31]. Niektóre proteazy produkowane przez entomopatogenne grzyby wykazują aktywność kolagenazową. Hurion i in. [16] wykryli u *Entomophora coronata* obecność kolagenazy, która występowała w kompleksie z karboksypeptydazą. Proteaza ta hydrolizowała w utlenionym łańcuchu B insuliny dwa wiązania pomiędzy Leu15-Tyr16 i Leu11-Val12, a w syntetycznym substracie Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg degradowała wiązanie pomiędzy Leu-Gly. Enzym ten nie był hamowany przez wersenian dwusodowy (EDTA), natomiast DFP całkowicie znosił jego aktywność. Również gatunek *Lagenidium giganteum* [10] wytwarza trypsynopodobną proteazę przejawiającą aktywność kolagenazową, a także słabą elastazową. Wykazywała ona optimum aktywności wobec Azocollu w pH 8,4 i ulegała denaturacji w temp. 60°C.

Podsumowanie

Wirulentność entomopatogennych grzybów w dużym stopniu zależy od poziomu biosyntezy i aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych. Wysoki poziom produkcji proteaz i chitynaz podczas infekcji wskazuje na duże znaczenie tych enzymów w procesie patogenezy. Porażenie owada przez entomopatogena następuje na skutek oddziaływania zarówno nacisku mechanicznego, jak i hydrolitycznego rozkładu składników kutykuli. Koniecznym warunkiem do rozpoczęcia proteolizy białek jest adsorpcja enzymu na powierzchni kutykuli, która zachodzi na zasadzie elektrostatycznych oddziaływań. Istotną rolę w tych oddziaływaniach odgrywa proteaza Pr1 o znanej już sekwencji. Fragment tego białka zawierający His17, Arg18, Liz20 i Arg26 wykazuje szczególnie duże powinowactwo do ujemnie naładowanych grup w białkach kutykuli. Enzymy, które początkowo wykrywano są w bezpośrednim sąsiedztwie struktur grzybowych, dyfundują w głąb oskórka w trakcie dalszych etapów infekcji. Hamowanie aktywności proteaz przez inhibitory i przeciwciała w znacznym stopniu obniża produkcję enzymów i zmniejsza patogenność grzyba. Również mutanty grzybów pozbawione genów kodujących proteazy nie są patogene. Dotychczas najlepiej poznanym enzymem odgrywającym kluczową rolę w procesie patogenezy jest chymoelastazowa proteaza Pr1 produkowana przez *M. anisopliae*. Enzym ten występuje w kilku izoformach o szerokiej specyficzności substratowej. Przyczyną produkcji różnorodnych form tego enzymu są modyfikacje potranslacyjne

takie jak: proteolityczna degradacja, glikozylacja, deamidacja asparaginy czy też fosforylacja. Poznanie struktury genu Pr1 może wyjaśnić wiele zagadnień związanych z procesem patogenezy. Geny homologiczne do Pr1 są obecne u innych patogenów: *B. bassiana*, *V. lecanii*, *Aspergillus flavus*. Ekspresja i regulacja tego genu w dużym stopniu decydują o patogenności grzyba. Ze względu na powszechność występowania proteazy Pr1 i jej wysoką aktywność wobec białek kutykuli wyizolowany gen Pr1 jest najlepszym obiektem modelowym w badaniach wirulentności entomopatogennych grzybów.

W procesie patogenezy dużą rolę odgrywają też enzymy chitynolityczne. Podczas wzrostu na kutykuli owada entomopatogenne grzyby produkują również kompleks tych enzymów. Ich synteza wynika przypuszczalnie z ekspresji jednego genu, a potranslacyjna modyfikacja, głównie glikozylacja, daje w efekcie różnorodne formy tych enzymów. Indukcja chitynaz następuje dopiero w 20–40 godzin po infekcji patogenem i po strawieniu białek przez proteazy, które ułatwiają dostęp do chityny.

Enzymy hydrolityczne: proteazy i chitynazy działają synergistycznie w procesie trawienia kutykuli ułatwiając tym samym wnikanie i rozprzestrzenianie się grzyba w organizmie owada.

Literatura

- [1] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1679–1684.
- [2] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1988. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* 12: 161–168.
- [3] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1990. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.* 56: 362–370.
- [4] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.* 59: 165–173.
- [5] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *J. Invert. Pathol.* 63: 7–13.
- [6] Bidochka M.J., Khachatourians G.G. 1994. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *J. Invert. Pathol.* 64: 26–32.
- [7] Chrzanowska J., Banaś J., Bania J., Kołaczowska M. 1996. Pozakomórkowe enzymy proteolityczne entomopatogennego grzyba *Beauveria bassiana*. Materiały XXXII Zjazdu PTBioch. Kraków: 199.
- [8] Chrzanowska J., Blom H. 1993. Aminopeptidase activity of *Beauveria bassiana*. Materiały XXIX Zjazdu PTBioch. Wrocław: 503.
- [9] Cole S.C., Charnley A.K., Cooper R.M. 1993. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Letters* 113: 189–196.
- [10] Dean D.D., Domnas A.J. 1983. The extracellular proteolytic enzymes of the mosquito-parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.* 7: 31–39.

- [11] Goettel M. SW., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C., Roberts D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2233–2239.
- [12] Gunkel F.A., Gassen H.G. 1989. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Characterization of the chromosomal gene and expression of the cDNA in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 179: 185–194.
- [13] Gupta S.C., Leathers T.D. El-Sayed G.N., Ignoffo C.M. 1992. Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Exp. Mycol.* 16: 132–137.
- [14] Havukkala I., Mitamura C., Hara S., Hiragae K., Nishizawa Y., Hibi T. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J. Invert. Pathol.* 61: 97–102.
- [15] Hegedus D.D., Khachatourians G.G. 1988. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotech. Letters* 10: 637–642.
- [16] Hurion R., Fromentin H., Keil B. 1979. Specificity of the collagenolytic enzyme from the fungus *Entomophthora coronata*: Comparison with the bacterial collagenase from *Achromobacter iophagus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 192: 438–445.
- [17] Joshi K., St Leger R.J., Bidochka M.J. 1995. Cloning of the cuticle -degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Letters* 125: 211–218.
- [18] Mollier P., Lagnel J., Fournet B., Aioun A., Riba G. 1994. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* Larvae secreted by the entomopathogenic fungus, *Beauveria sulfurescens*. *J. Invert. Pathol.* 64: 200–207.
- [19] Paterson I.C., Charnley A.K., Cooper R.M., Clarkson J.M. 1993. Regulation of production of a trypsin-like protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Letters* 109: 323–328.
- [20] Paterson I.C., Cooper R.M., Charnley A.K., Clarkson J.M. 1994. Partial characterization of specific inducers of a cuticle degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology* 140: 3153–3159.
- [21] Robert A., Messing-Al-Aidroos K. 1985. Acid production by *Metarhizium anisopliae*: effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease and lipase activity. *J. Invert. Pathol.* 45: 9–15.
- [22] Samuels R.I., Paterson I.C. 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.* 110: 661–669.
- [23] St Leger R.J., Bidochka M.J., Roberts D.W. 1994. Isoforms of the cuticle degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 313: 1–7.
- [24] St Leger R.J., Bidochka M.J., Roberts D.W. 1994. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 314: 392–398.
- [25] St Leger R.J., Butt T.M., Goettel M.S., Roberts D.W., Staples R.C. 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* 13: 253–262.
- [26] St Leger R.J., Charnley A.K., Cooper R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invert. Pathol.* 48: 85–95.
- [27] St Leger R.J., Charnley A.K., Cooper R.M. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invert. Pathol.* 47: 295–302.
- [28] St Leger R.J., Charnley A.K., Cooper R.M. 1987. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 253: 221–232.
- [29] St Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invert. Pathol.* 47: 167–177.

- [30] St Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1509–1517.
- [31] St Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1987. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 123–131.
- [32] St Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1987. Production of a cuticle degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1371–1382.
- [33] St Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. 1993. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 237–243.
- [34] St Leger R.J., Durrands P.K., Charnley A.K., Cooper R.M. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invert. Pathol.* 52: 285–294.
- [35] St Leger R.J., Durrands P.K., Charnley A.K., Cooper R.M. 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Microbiol.* 150: 413–416.
- [36] St Leger R.J., Frank R.J., Roberts D.C., Staples R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.* 204: 991–1001.
- [37] St Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Rizzo N.W., Roberts D.W. 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1257–1264.
- [38] St Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Rizzo N.W., Roberts D.W. 1996. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 907–912.
- [39] St Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Roberts D.W. 1995. Multiple aminopeptidases produced by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.* 65: 313–314.
- [40] Thomas K.C., Khachatourians G.G., Ingledew W.M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 33: 12–20.
- [41] Willis J.H. 1987. Cuticular proteins. The neglected components. *Arch. Insect. Biochem Physiol.* 6: 203–215.
- [42] Zacharuk R.Y. 1970. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. *J. Invert. Pathol.* 15: 372–396.

Hydrolytic enzymes of entomopathogenic fungi and their role in pathogenesis

Summary

Entomopathogenic fungi attack the host insect and therefore may be potentially used for insect control. Penetration of cuticle is achieved by a combination of mechanical pressure and enzymatic degradation. The entomopathogenic fungi produce a variety of exocellular hydrolytic enzymes: proteases, chitinases and lipases, which are capable to digest the major components of insect cuticle. This review describes the characteristics of these enzymes and their role in pathogenesis.