

Charakterystyka enzymów proteo-, chityno- i lipolitycznych pasożytniczego grzyba *Conidiobolus coronatus*¹

Characterization of proteo-, chitino- and lipolytic enzymes of parasitic fungus *Conidiobolus coronatus*

Emilia Włóka

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 6 czerwca 2009 r.

Promotor: Prof. dr hab. Mieczysława I. Boguś

Recenzenci: Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz

Prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

ABSTRACT. The largest problem in limitation of insect pest population is increasing resistance of them to chemical pesticides. Alternative are entomopathogens, which regulate frequency of insect pests. Among them decisive role play entomopathogenic fungi, which possess the ability to active penetration through cuticle by mechanical pressure of invasive hypha and production of proteo-, chitino- (egzo- and endochitinases) as well as lipolytic enzymes, which provide nutrients for subsequent development of fungus. Entomopathogenic soil fungus *Conidiobolus coronatus* (*Entomophthorales*) is saprophyte fungus, which demonstrates a high efficiency in the paralysis of varied insects. Although leading investigations over mechanism of insect paralysis, we still do not know, what role fungal enzymes play in insect cuticle penetration. The main aim of research was establishment of optimal conditions for elastase, N-acetylglucosaminidase (NAGase), chitobiosidase as well as lipase. Optimal reaction parameters were determined: volume of reaction mixture, volume of homogenate, working pH and the substrate concentration. Having on aim a possible use of *C. coronatus* in pest control, two ranges of temperatures were chosen: 20°C – optimal temperature for the fungus growing and 30°C – optimal temperature for the cultivation of the great wax moth larvae, *Galleria mellonella*, on which examinations were performed. Also kinetic constants K_m and V_{max} were determined. Activity of elastase and N-acetylglucosaminidase of *C. coronatus* was measured spectrophotometrically at 410 nm (towards N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-Nitroanilide) and 405 nm (towards 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide), respectively. The following optimal conditions of elastase activity were established: the volume of reaction mixture 0.5 ml, volume of homogenate 1 μ l, temperature 30°C, pH 8, substrate concentration 40 mM. Optimal conditions of NAGase assay: the volume of reaction mixture 0.5 ml, dose of homogenate 12.5 μ l, temperature 30°C, pH neutral and 6 mM substrate concentration. The activities of chitobiosidase and lipase were measured spectrofluorometrically ($Ex=360$ nm, $Em=450$ nm) towards 4-Methylumbelliferyl β -D-N-N'-diacetylchitobioside and 4-Methylumbelliferyl oleate, respectively. Chitobiosidase showed the highest activity in dose of 30 μ l in 1 ml volume of reaction mixture, at the temperature of 30°C, pH 7 and substrate concentration equal to 2 mM. Lipase showed the highest catalytic activity in 1 ml volume of reaction mixture, in 30°C but 50 μ l of homogenate, pH 10 and 10 mM substrate concentration were needed. Higher activity investigated enzymes in 30°C than 20°C indicated that they can take part in pathogenesis. It was suggested that as first in perforation of coats of insects body elastase and lipase take part. Indicated of it, large thermoresistance of both enzymes (only 10.5% decrease of elastase activity at 20°C and 9.4% decrease of lipase activity in comparison with maximal activity at 30°C), alkalophilicity of both proteins (elastase shows the alkaline optimal pH equal to 8 at pH 9 preserves 97% activity, and at pH 10 94% activity, respectively while lipase prefers the pH 10 and at pH 8 and pH 9 enzyme keeps 57 and 60% activity, respectively) as well as lack of repression by suitable substrates.

¹Praca finansowana ze środków MNiSW projekt N303 027 31/0837

Sigmoid character of curve concerning pH influence on the activity of both enzymes, also indicates similarity between elastase and lipase. On minor part of NAGase and chitobiosidase of fungus *C. coronatus* in perforation of coats of host body showed high sensibility of both enzymes on hydrogen ions concentration: both enzymes prefer neutral pH, in pH 6 and 8 lose over 35% activity but subjection to substrate repression and 3–4-fold growth of activity followed only in 30°C. In the course of work it was found, that rich medium (LB) stimulates growth of mycelium and production of fungal lipases. So far nobody managed to isolate chitinolytic or lipolytic enzymes from *C. coronatus* homogenate. The majority of fungal enzymes were isolated from post incubation filtrates. In the literature of the subject lack of data about *C. coronatus* NAGase, therefore in examinations also the trial of isolation NAGase from *C. coronatus* homogenate was undertaken. Activity of NAGase showed only first fraction, which did not separate with none of used columns. Disappointing results of purification on cation exchanger CM, weak anion exchanger DEAE, and strong anion exchanger Q were obtained as well as after fractionation tests with the use of Microcon microcolumns. In aim of NAGase molecular mass estimation, two zymograms were made with Triton X-100 and casein and with the use of fluorescent substrate 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide. Molecular mass of NAGase from *C. coronatus* was established on ca. 60 kDa. This is the first report describing molecular weight of NAGase from *C. coronatus*. Examined NAGase has different properties than known NAGases from other entomopathogenic fungi. Although its molecular weight is equal to the *Metarhizium anisopliae* NAGase, optimal pH for both NAGases are different: neutral in the case of *C. coronatus* NAGase versus acidic in the case of *M. anisopliae* NAGase. Knowledge of molecular mass of the *C. coronatus* NAGase should allow to find a new method of this enzyme isolation from *C. coronatus* homogenate. Thanks to developed methods of assaying activities of elastase, NAGase, chitobiosidase and lipase, real becomes the understanding of mechanism of insects paralysis through *C. coronatus* fungus.

Key words: *Conidiobolus coronatus*, entomopathogenic fungi, *Galleria mellonella*, proteases, chitinases, lipases

Streszczenie

Największym problemem w ograniczeniu populacji owadów szkodliwych jest ich wzrastająca oporność na chemiczne pestycydy. Alternatywą są entomopatogeny, które regulują liczebność szkodliwych owadów. Wśród nich decydującą rolę odgrywają grzyby owadobójcze, które posiadają zdolność aktywnej penetracji kutikuli przez mechaniczne parcie strzępki inwazyjnej i wytwarzanie enzymów proteo-, chityno- (egzo- i endochitinazy) oraz lipolitycznych dostarczających składników odżywczych dla dalszego rozwoju grzyba.

Owadobójczy glebowy grzyb *Conidiobolus coronatus* (*Entomophthorales*) jest grzybem saprofitycznym, który wykazuje wysoką skuteczność w porażaniu różnorodnych gatunków owadów. Mimo, prowadzonych badań nad mechanizmem porażania owadów, nadal nie wiemy jaką rolę odgrywają enzymy grzybowe podczas penetracji kutikuli owadów.

Głównym celem badań było ustalenie optymalnych warunków działania elastazy, N-acetyloglukozaminidazy (NAGazy), chitobiozydazy oraz lipazy.

Ustalono optymalne parametry reakcji: objętość mieszaniny reakcyjnej, objętość homogenatu, pH działania i stężenie substratu. Mając na celu ewentualne wykorzystanie grzyba *C. coronatus* do walki z owadami szkodliwymi do oznaczeń wybrano dwa zakresy temperatur: 20°C – optymalna temperatura wzrostu grzyba i 30°C – optymalna temperatura ho-

dowli larw mola woskowego *Galleria mellonella*, na których wykonywano badania. Wyznaczono także stałe katalityczne K_m i V_{max} dla enzymów.

Aktywność elastazy i N-acetyloglukozaminidazy grzyba *C. coronatus* mierzono spektrofotometrycznie odpowiednio przy 410 nm (wobec N-sukcynylo-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilidu) i 405 nm (wobec 4-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-glukozaminidu). Ustalono następujące optymalne warunki oznaczania elastazy: objętość mieszaniny reakcyjnej 0,5 ml, homogenatu 1 μ l, temperatura 30°C, pH 8, stężenie substratu 40 mM. Optymalne warunki oznaczania dla NAGazy: objętość mieszaniny reakcyjnej 0,5 ml, dawka homogenatu 12,5 μ l, temperatura 30°C, pH obojętne i 6 mM stężenie substratu. Aktywność chitobiozydazy i lipazy mierzono spektrofotometrycznie ($Ex=360$ nm, $Em=450$ nm) odpowiednio wobec 4-metyloumbelliferylo- β -D-N-N'-diacetylochitobiozydu i oleinianu 4-metyloumbelliferylu. Chitobiozydaza wykazywała najwyższą aktywność w dawce 30 μ l w 1 ml objętości mieszaniny reakcyjnej, temperaturze 30°C, pH 7 i przy stężeniu substratu równym 2 mM. Lipaza również zachowywała najwyższą aktywność katalityczną w 1 ml objętości mieszaniny reakcyjnej i w 30°C, ale przy dawce homogenatu 50 μ l, w pH 10 i wobec 10 mM stężenia substratu.

Wyższa aktywność badanych enzymów w 30°C niż w 20°C wskazywała, iż mogą one brać udział w patogenezie. Zaszugerowano, iż jako pierwsze biorą udział w perforacji powłok ciała owadów elasta-

za i lipaza. Wskazywała na to duża termooporność obu enzymów (zaledwie 10,5% spadek aktywności elastazy w 20°C i 9,4% spadek aktywności lipazy w porównaniu do maksymalnej aktywności w 30°C), alkalofilność obu białek (elastaza wykazuje alkaliczne optymalne pH równe 8, w pH 9 zachowuje 97% aktywności, a w pH 10 94% aktywności, natomiast lipaza preferuje optymalne pH 10, a w pH 8 i 9 enzym zachowuje odpowiednio 57 i 60% aktywności) oraz brak represji ze strony odpowiednich substratów. Sigmoidalny charakter krzywej wpływu pH na aktywność obu enzymów, wskazywał również na podobieństwa między elastazą i lipazą pod względem katalizy.

Na drugorzędny udział NAGazy i chitobiozydazy grzyba *C. coronatus* w perforacji powłok ciała żywiciela wskazywała wysoka wrażliwość obu enzymów na stężenie jonów wodorowych: oba enzymy preferują obojętne pH, w pH 6 i 8 tracą ponad 35% aktywności, a podleganie represji ze strony hydrolizowanych substratów i 3–4-krotny wzrost aktywności tych enzymów następował dopiero w temperaturze 30°C.

W toku pracy stwierdzono również, że bogate podłoże LB wpływa na rozrost grzybni oraz stymuluje wytwarzanie lipaz grzybowych.

Jak dotąd nikomu nie udało się wyizolować enzymów chitynolitycznych czy lipolitycznych grzyba *C. coronatus* z homogenatu grzybowego. Większość enzymów grzybowych izolowanych była z filtratów pohodowlanych. W literaturze przedmiotu brak danych o NAGazie *C. coronatus*, stąd w bada-

niach podjęto także próbę izolacji NAGazy z homogenatu grzybowego. Jej aktywność wykazywała tylko frakcja pierwsza, która nie rozdzielała się na żadnej z zastosowanych kolumn. Zawiodło oczyszczenie na kationicie CM, słabym anionicie DEAE oraz mocnym anionicie Q. Nie powiodły się również próby frakcjonowania z wykorzystaniem mikrokolumienek Microcon.

W celu oszacowania masy cząsteczkowej NAGazy wykonano dwa zymogramy z Tritonem X-100 i kazeiną z zastosowaniem fluorescencyjnego substratu 4-metyloumbelliferylo-N-acetylo- β -D-glukozaminidu. Ustalono masę cząsteczkową NAGazy z grzyba *C. coronatus* na ok. 60 kDa. Jest to pierwsze doniesienie opisujące ciężar cząsteczkowy NAGazy z *C. coronatus*. Badana NAGaza ma odmienne właściwości niż poznane dotąd NAGazy z grzybów owadobójczych, pod względem ciężaru cząsteczkowego jest równa NAGazie z grzyba *Metarhizium anisopliae*, jednak enzym ten ma optymalne pH obojętne, podczas gdy enzym z *M. anisopliae* ma optymalne pH kwaśne.

Znajomość masy cząsteczkowej NAGazy powinna pozwolić na znalezienie nowego sposobu izolacji tego enzymu z homogenatu *C. coronatus*. Dzięki opracowaniu metod oznaczania aktywności elastazy, NAGazy, chitobiozydazy i lipazy realne staje się zrozumienie mechanizmu porażania owadów przez grzyb *C. coronatus*.

Wpłynęło 18 grudnia 2009

Zaakceptowano 28 stycznia 2010