

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

На правах рукописи

Синельников Игорь Геннадьевич

«Функциональная и биохимическая характеристика хитиназы растения
Drosera capensis»

03.01.06 – биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Рожкова А.М.

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
II. ВВЕДЕНИЕ.....	6
2.1 Актуальность работы и степень разработанность тематики.....	6
2.2 Цели и задачи исследования.....	7
2.3 Научная новизна и теоретическая значимость работы.....	8
2.4 Практическая значимость работы.....	8
2.5 Методология и методы исследования.....	8
2.6 Положения, выносимые на защиту.....	9
2.7 Личный вклад диссертанта.....	9
2.8 Степень достоверности.....	9
2.9 Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	9
2.10 Апробация работы.....	10
2.11 Публикации.....	10
2.12 Связь работы с государственными программами.....	10
2.13 Объем и структура работы.....	10
III. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
3.1 Грибные патогены растений, механизмы заражения растений и методы защиты.....	11
3.1.1 Грибные патогены в сельском хозяйстве.....	11
3.1.2 Методы борьбы с патогенами, биологические средства защиты растений.....	13
3.1.3 Клеточная стенка грибов-фитопатогенов и ее роль в процессе патогенеза.....	15
3.1.4 Хитин-индуцируемый иммунитет растений.....	17
3.1.5 Механизмы защиты клеточной стенки патогена.....	20
3.2 Хитинолитические ферменты.....	25
3.2.1 Первичная классификация хитиназ.....	25
3.3 Хитиназы 19-ого семейства гликозил-гидролаз (GH19).....	26
3.3.1 Разнообразие хитиназ GH19.....	26
3.3.2 Особенности строения и свойств хитиназ различных классов.....	27
3.3.3 Дуализм свойств растительных хитиназ.....	29
3.3.4 Классификация хитиназ 18-ого семейства гликозил-гидролаз (хитиназ GH18).....	30
3.3.5 Хитиназы GH18 как эффекторы патогенеза.....	31
3.3.6 Топология каталитических сайтов хитиназ GH18 и GH19.....	32
3.3.7 Вспомогательные хитин-связывающие домены.....	34
3.3.8 Каталитические механизмы действия хитиназ.....	35
3.3.9 Применение хитиназ в сельском хозяйстве.....	36
IV. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
4.1 Материалы.....	39

4.1.1 Штаммы микроорганизмов.....	39
4.1.2 Реагенты.....	39
4.1.3 Среды для культивирования.....	40
4.2 Методы.....	42
4.2.1 Получение биоматериала растений	42
4.2.2 Выделение геномной ДНК из <i>D.capensis</i>	42
4.2.3 Выделение геномной ДНК дрожжей	43
4.2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	43
4.2.5 Дизайн олигонуклеотидов для ПЦР.....	44
4.2.6 Проведение полуколичественной ПЦР	44
4.2.7 TAIL-ПЦР	44
4.2.8 Биоинформатический анализ.....	47
4.2.9 Масс-спектрометрический анализ	47
4.2.10 Синтез кДНК и амплификация гена <i>chit19</i>	48
4.2.11 Создание мутантных форм хитиназ.....	48
4.2.12 Получение экспрессионных плазмид pNIC_Chit19 и pNIC_Chit19ΔChBD.....	49
4.2.13 Трансформация и экспрессия рекомбинантных белков в <i>E. coli</i>	50
4.2.14 Выделение телец включения из биомассы <i>E.coli</i>	51
4.2.15 Рефолдинг хитиназы GH19.....	51
4.2.15.1 Рефолдинг диализом.....	51
4.2.15.2 Рефолдинг быстрым разбавлением.....	52
4.2.15.3 Рефолдинг на Ni-NTA-сефарозе.....	52
4.2.16 Получение коллоидного хитина и определение хитиназной активности.....	52
4.2.17 Определение кинетических параметров ферментов	53
4.2.18 Трансформация <i>P.pastoris</i>	54
4.2.19 Культивирование <i>P.pastoris</i> в ферментере объемом 1 литр.....	55
4.2.20 Выделение и очистка ферментов	55
4.2.20.1 Очистка рекомбинантной Chit19 выделенной из клеток <i>E.coli</i>	56
4.2.20.2 Очистка рекомбинантной Chit19 из культуральной жидкости <i>P.pastoris</i>	56
4.2.20.3 Очистка рекомбинантной хитиназы 18 семейства (Chit18)	56
4.2.21 Определение концентрации белка	57
4.2.22 Проведение SDS-PAGE-электрофореза.....	57
4.2.23 Изучение термостабильности рекомбинантных хитиназ	57
4.2.24 Определение температурного и pH-оптимумов активности хитиназ	57
4.2.25 Нарботка биомассы <i>Penicillium canescens</i>	57
4.2.26 Определение фунгицидных свойств хитиназ	58
V. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	59

5.1 Клонирование полноразмерного гена <i>chit19</i> , кодирующего хитиназу GH19 из росянки <i>D.capensis</i> и описание его структуры.....	59
5.1.1 Получение фрагмента гена <i>Chit19</i> из <i>D.capensis</i>	59
5.1.2 Клонирование кодирующей последовательности <i>Chit19 D.capensis</i>	61
5.2 Получение рекомбинантной хитиназы <i>Chit19</i> в бактериях <i>E.coli</i>	65
5.2.1 Разработка экспрессионных плазмид, трансформация бактерий и оптимизация экспрессии в клетках <i>E.coli</i>	65
5.3 Рефолдинг полноразмерной <i>Chit19</i> и <i>Chit19</i> с удаленным ChBD	69
5.3.1 Ступенчатый диализ.....	70
5.3.2 Рефолдинг на Ni-NTA сефарозе	70
5.3.3 Рефолдинг методом «быстрого разбавления»	70
5.3.4 Влияние химических добавок на эффективность рефолдинга.....	71
5.4 Мутагенез хитиназы <i>Chit19 D.capensis</i> , направленный на увеличение выхода растворимого белка в клетках <i>E.coli</i>	74
5.4.1 Построение пространственной модели <i>Chit19</i>	74
5.4.2 Определение потенциальных замен.....	76
5.4.3 Сайт-направленный мутагенез и экспрессия белков	78
5.5 Сравнение биохимических и фунгицидных свойств гомогенных препаратов растительной хитиназы <i>Chit19</i> и грибной хитиназы <i>Chit18</i>	80
5.5.1 Выделение хитиназы <i>Chit19</i> в гомогенной форме	80
5.5.2 Получение гомогенного ферментного препарата хитиназы GH18.....	80
5.5.3 Определение биохимических свойств <i>Chit18</i> и <i>Chit19</i>	82
5.5.4 Способность гидролизовать клеточную стенку патогена	87
5.6 Определение фунгицидной активности хитиназ	88
5.6.1 Исследование фунгицидной активности хитиназ против <i>Parastagonospora nodorum</i>	88
5.6.2 Исследование фунгицидной активности хитиназ против спор <i>Fusarium culmorum</i>	90
5.7 Экспрессия <i>Chit19</i> в <i>Pichia pastoris</i>	92
5.7.1 Получение вектора pPIG	92
5.7.2 Получение плазмид pPIG_ <i>Chit19</i> и pPIG_ <i>Chit19</i> ΔChBD	95
5.7.3 Определение частоты интеграции структурных элементов вектора pPIG-1_ <i>chit19</i> в геном <i>P.pastoris</i>	96
5.7.4 Ферментация штаммов продуцентов <i>Pichia pastoris</i>	98
5.7.5 Тестирование неочищенной хитиназы, полученной в <i>P. pastoris</i>	100
VI ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	101
VII СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	103

I. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГН	Гликозил-гидролазы
PR-белки	P athogenesis- R elated (белки индуцируемые патогенами).
БСЗР	Биологические средства защиты растений
IPC	I ntegrated P est C ontrol (комплексная борьба с вредителями)
КСГ	Клеточная стенка грибов
МAMP	M icrobe- A ssociated M olecular P attern (патоген-ассоциированный молекулярный паттерн)
ГТФазы	Гуанозинтрифосфат-гидролазы
CERK1	C hitin e licitor r ecceptor k inase 1 (хитин-элиситорной рецепторной киназы)
РАМР	P athogen- a ssociated m olecular p attern (Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны)
МАРК	M itogen- a ctivated p rotein k inase (митоген-активируемые киназы)
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ПВП	Поливинилпирролидон
ЦТАБ	Цетилтриметиламмония бромид
ФП	Ферментный препарат
ChBD	C hitin- b inding d omain (хитин-связывающий домен)
Chit19	Полноразмерная хитиназа 19 семейства из <i>D.capensis</i>
Chit19ΔChBD	Хитиназа 19 семейства из <i>D.capensis</i> с удаленным хитин-связывающим доменом
МТИ	МAMP-триггерный иммунитет
СКУ	С-концевое удлинение

II. ВВЕДЕНИЕ

2.1 Актуальность работы и степень разработанность тематики.

Рентабельное сельское хозяйство является основой продовольственной безопасности страны. Снижение экономической эффективности сельского хозяйства, как правило, связано с частичной потерей урожая зерновых культур из-за негативного воздействия вредителей, в том числе фитопатогенных грибов, являющихся основными возбудителями болезней растений. Из-за грибковых инфекций ежегодные потери урожая сельскохозяйственных культур, включая потери зерна при хранении, составляют более 30%. [1].

Использование химических пестицидов позволило взять под контроль распространение вредителей и модифицировать производственные схемы для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Однако необходимо учитывать, что интенсивное использование фунгицидов оказывает негативное воздействие на здоровье почвы, что, в итоге, приводит к потере биоразнообразия [2]. Поэтому, все более востребованы альтернативные подходы к борьбе с вредителями и болезнями. Одна из таких альтернатив – это экосистемный подход, впервые предложенный Верноном Штерном [3], который сочетает в себе различные методы контроля патогенов с целью минимизации использования пестицидов при сохранении эффективности защиты сельскохозяйственных культур от вредителей и патогенов. Основопологающая идея этого подхода заключается в разработке технологии замещения химических пестицидов на агенты биологического контроля [4].

Тем не менее, на сегодняшний момент наибольшей популярностью у сельхозпроизводителей пользуются химические фунгициды. По данным «Института Аграрных Исследований Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики»» в 2019 г. в России было использовано 98,5 тыс. тонн фунгицидов, из которых 97,6% пришлось на химические и лишь 2,4% - на биологические. Поэтому разработка и использование новых биологических средств защиты растений (БСЗР) является актуальной задачей современного сельского хозяйства, в особенности в части получения новых биофунгицидных средств.

Основными кандидатами на роль новых БСЗР являются ферменты, что обусловлено их высокой биологической активностью, специфичностью и экологической безопасностью [5]. Наиболее перспективным направлением в развитии БСЗР является разработка системы, основанной на PR - белках растений (Pathogenesis-related protein – белках, экспрессирующихся в ответ на патогенез). Среди всех PR-белков - хитиназы, потенциально могут являться эффективными агентами для защиты растений от

фитопатогенных грибов. Кроме того, хитиназы способны разрушать хитиновый покров насекомых-вредителей, что также обеспечивает устойчивость растений к их воздействию[6].

Важно отметить, что хитиназы, относящиеся к 19-ому семейству гликозил-гидролаз (GH19), являются бифункциональными ферментами, и их защитный эффект обусловлен не только гидролитической активностью по отношению к хитину клеточной стенки фитопатогена, но и сепаративной способностью ингибировать его рост по негидролитическому механизму.

В классических цветковых растениях хитиназы GH19 являются белками, связанными с патогенезом, и позволяют растениям противостоять действию фитопатогенов, однако некоторые роды хищных растений, в частности, *Ancistrocladus*, *Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes* и *Triphyophyllum*, адаптировали эти белки для активной охоты и разрушения хитина насекомых [7,8]. Таким образом, хитиназы GH19 имеют более широкую специфичность по отношению к хитин-содержащим субстратам, что обеспечивает также и инсектицидную активность фермента. Предполагается, что в процессе эволюции хищных растений могла произойти дивергенция генов хитиназ, что привело к появлению хитинолитических ферментов, приспособленных для хищничества и обладающих уникальными свойствами [9]. За счет более широкой субстратной специфичности и высокой каталитической активности, элиситорная активность (способность индуцировать иммунный ответ растений) данных ферментов, может быть существенно выше по сравнению с другими хитиназами растений.

Таким образом, получение нового ферментного препарата хитиназы, выделенной из *Drosera capensis*, и детальное описание его биохимических и фунгицидных свойств необходимо для разработки новых стратегий использования БСЗР в сельском хозяйстве.

2.2 Цели и задачи исследования.

Целью данной работы является получение рекомбинантной хитиназы 19-ого семейства гликозил-гидролаз из росянки *D. Capensis* (хитиназа Chit19), изучение ее биохимических и фунгицидных свойств, а также оценка биотехнологического потенциала нового фермента с точки зрения использования его в качестве компонента биологического средства защиты растений. Исходя из поставленных целей были сформулированы следующие задачи:

- Клонирование последовательности гена *chit19* из *D.capensis*;
- Оптимизация системы экспрессии *E.coli* для получения функциональной формы рекомбинантной хитиназы Chit19;

- Получение гомогенной формы хитиназы Chit19 и оценка её биохимических и фунгицидных свойств в сравнении с хитиназой 18-ого семейства гликозил-гидролаз (хитиназа Chit18);
- Оптимизация экспрессии рекомбинантной хитиназы Chit19 в дрожжах *Pichia pastoris*.

2.3 Научная новизна и теоретическая значимость работы

В работе впервые была определена нуклеотидная последовательность и клонирован ген хитиназы из хищного растения *D.capensis*. Предложена и апробирована стратегия увеличения растворимости хитиназы Chit19 при рекомбинантной экспрессии в *E.coli*, которая может быть использована для экспрессии других рекомбинантных ферментов. Получены кинетические параметры новой хитиназы Chit19 из *D.capensis*, и определено влияние хитин-связывающего домена на изменение кинетических параметров. Установлено, что хитин-связывающий домен необходим для гидролиза кристаллического хитина, однако его наличие не требуется для фунгицидной активности хитиназы *Chit19*. Определены биохимические параметры гомогенных рекомбинантных хитиназ. Получены трёхточечные мутанты, в которых проведена мутация свободных поверхностных цистеинов. Показано, что данные замены не приводят к снижению каталитической активности хитиназы *Chit19*, однако позволяют получить белки в растворимой форме в системе экспрессии *E.coli*. Оптимизирована интегративная векторная система для многоточечной интеграции в геном дрожжей *P.pastoris*, позволяющая создавать высокопродуктивные штаммы. Показано, что фунгицидная активность хитиназ не коррелирует с каталитической активностью, что позволяет разработать новые подходы для эффективного поиска новых БСЗР.

2.4 Практическая значимость работы

Полученные в ходе работы результаты расширяют арсенал доступных биологических средств защиты для борьбы с фитопатогенами. Полученные рекомбинантные штаммы *P.pastoris* могут быть использованы как штаммы для промышленного получения хитиназ из *D.capensis*.

2.5 Методология и методы исследования

В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: классические методы энзимологии, методы анализа и очистки белков (денатурирующий гель-электрофорез в полиакриламидном геле; гельпроникающая, гидрофобная и аффинная хроматография), кинетические методы характеристики ферментов (спектрофотометрия), методы молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция - ПЦР, термоасимметричная

черезстрочная ПЦР – TAIL ПЦР, рестрикция, лигирование, сборка по Гибсону), методы определения фунгицидной активности против фитопатогенов растений.

2.6 Положения, выносимые на защиту

1. Аминокислотные замены С191А, С231S и С286Т в совокупности с удалением хитин-связывающего домена в хитиназе Chit19 позволяют получать растворимую форму фермента в экспрессионной системе *E.coli*.
2. Оптимизация точек рекомбинации в векторной системе для трансформации *P.pastoris* позволяет увеличить частоту интеграции экспрессионной кассеты в геном штамма продуцента.
3. Хитиназа Chit18 из гриба *Myceliophthora thermophila* не способна ингибировать рост патогенных грибов *Parastagonospora nodorum* и *Fusarium culmorum*. Напротив, новая хитиназа Chit19 из *D.capensis* способна эффективно предотвращать рост фитопатогенов.
4. Удаление хитин-связывающего домена уменьшает в 3 раза ферментативную активность хитиназы Chit19 по отношению к коллоидному хитину, однако не приводит к уменьшению фунгицидной активности.
5. Каталитическая активность хитиназы Chit19 не имеет прямой корреляции с фунгицидной активностью, что предполагает существование иных механизмов ингибирования роста фитопатогенов.

2.7 Личный вклад диссертанта

Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены автором лично или при непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку данных, оформление и публикацию результатов

2.8 Степень достоверности

Достоверность представленных в диссертационной работе данных определяется использованием современных физико-химических методов исследования, выполнением экспериментов на сертифицированном оборудовании, использованием стандартных норм и протоколов, рекомендованных фирмами-производителями.

2.9 Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» по пунктам 1, 8, 9, 11.

2.10 Апробация работы.

Результаты работы были представлены на: VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» г. Севастополь 16-20 сентября 2019, Международном конгрессе Биотехнология: состояние и перспективы развития, Москва 28-30 октября 2020 г., VIII международной научно-практической Конференции «Биотехнология: наука и практика», г. Ялта 22-25 сентября 2020, на ежегодных конференциях аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН в 2019 - 2021 годах

2.11 Публикации

По результатам диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, и 1 патент на изобретение, а также 4 тезиса докладов конференций.

2.12 Связь работы с государственными программами

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в рамках Соглашения 05.616.21.0128 (RFMEFI61620X0128), а также с использованием научного оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» и АЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН и Центра коллективного пользования «Государственная коллекция фитопатогенных микроорганизмов и сортов-идентификаторов (дифференциаторов) патогенных штаммов микроорганизмов» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии».

2.13 Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 116 страницах, содержит 22 таблицы и 44 рисунка. Список литературы включает 205 ссылок.

III. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1 Грибные патогены растений, механизмы заражения растений и методы защиты

3.1.1 Грибные патогены в сельском хозяйстве

Грибы присутствуют во всех экологических нишах – в воде, почве, других организмах. Являясь редуцентами, они играют важную роль в экологии всей биосферы, разлагая всевозможные органические материалы. Грибы крайне разнообразны по организации своей жизнедеятельности: часть из них является сапротрофами, способствуя образованию плодородных почв, некоторые в той или иной степени образуют мутуалистические связи с различными живыми организмами. Существует также большое разнообразие грибных патогенов животных и растений. Именно фитопатогенные грибы представляют собой, вероятно, самую разнообразную группу экологически и экономически значимых микроорганизмов [1]. Возбудители грибковых заболеваний растений в основном представлены типами *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Фитопатогенные грибы относятся к различным классам, таким как *Dothideomycetes* (например, *Cladosporium spp.*), *Sordariomycetes* (например, *Magnaporthe spp.*) или *Leotiomycetes* (например, *Botrytis spp.*). Базидиомицеты представлены двумя крупнейшими группами патогенов растений: ржавчины (*Pucciniomycetes spp.*) и головни (распространенной среди подтипа *Ustilaginomycotina spp.*) [10]. Грибковые инфекции вызывают широкий спектр поражений плодов и вегетативных органов растений.

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (<http://www.fao.org/>), основными культурами, производимыми в мире в период с 2013 по 2019 год, были зерновые (кукуруза, рис и пшеница), сахарный тростник, фрукты и ягоды, а также картофель. Эти культуры особенно уязвимы для фитопатогенов, суммарные потери урожая составляют около 30% ежегодно (Таблица 1). При этом более половины этих потерь происходит при хранении и транспортировке урожая.

Таблица 1 – Основные патогены сельскохозяйственных культур и анализ их влияния на потери урожая

Возбудитель	Растение	Болезнь	Потери урожая (%)
<i>Botrytis cinerea</i>	Фрукты	Серая плесень	Потеря клубники от 30% до 40% [11]
<i>Blumeria graminis</i>	Пшеница и ячмень	Пероноспороз	Около 18% [12]
<i>Colletotrichum</i> spp.	Фрукты и овощи	Антракноз	Более 80% в тропических, субтропических и средиземноморских регионах [13]
<i>Cladosporium fulvum</i>	Помидор	Плесень листьев томата	Потеря 10-25% [14]
<i>Fusarium</i> spp.	Картофель	Сухая гниль клубней	Первичные потери до 25%. Потери во время хранения более 60% [15,16]
<i>Fusarium graminearum</i>	Злаки	Фузариоз;	В Китае потери 5–10%. В Европе и Южной Америке до 70% потерь [17]
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Рис	Пирикулярриоз риса	Потери колеблются от 10% до 35% в зависимости от сорта и условий окружающей среды [18]
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Пшеница	Септориоз пшеницы	Потери до 30–50% [19]
<i>Puccinia</i> spp.	Ячмень и рож	Ржавчина	70% [20]
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Соя	Ржавчина	Потери до 70% [20]
<i>Pytophthora infestans</i>	Картофель	Фитофтороз	16% [16]
<i>Rhizoctonia solani</i>	Злаки	Ризоктониоз	30% [16]
<i>Sporisorium scitamineum</i>	Сахарный тростник	Голова сахарного тростника	Потери до 62% [21,22]
<i>Ustilago Maydis</i>	Кукуруза	Кукурузная головня	Потери до 20% [17]

В последние годы вопросы защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов выдвигаются на передний план и являются особенно актуальными, так как уровень патогенной микрофлоры в почве и на семенном материале достиг критического значения, несмотря на повсеместное применение технологий

контроля фитопатогенов, основанных на химических фунгицидах, применяемых в сельском хозяйстве [23,24].

Для разработки методов контроля грибных патогенов необходимо четко понимать механизмы взаимодействия между патогеном и организмом хозяином. Анализ механизмов заражения и взаимодействия «хозяин-патоген» позволяет разделить все фитопатогены на три группы: биотрофы, некротрофы и гемибиотрофы [25]. Биотрофы - организмы, которые паразитируют на живых тканях, перестраивая метаболизм хозяина под свои нужды, вызывая инфекции, но не убивая его. Биотрофы преимущественно вид-специфичны и поражают узкий круг хозяев, как например, грибки мучнистой росы и ржавчины [26]. Из-за долгого периода скрытого заражения, эта группа патогенов наиболее опасна и требует превентивных мер защиты [27].

Некротрофы предпочитают атаковать максимально агрессивно, и быстро убивать своего носителя, вызывая обширные некрозы. Это связано с тем, что некротрофные грибы могут завершить свой жизненный цикл только на мертвых тканях. Эти патогены производят широкий спектр гидролитических ферментов и токсинов для разрушения растительных клеток. Некротрофы имеют два типа токсинов: специфичные для растения - хозяина, благодаря которому приобретают видоспецифичность и токсины широкого спектра действия, характерные для *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicicola* и *Botrytis cinerea*, которые могут атаковать обширный круг хозяев [28]. Гемибиотрофы используют смешанную стратегию, на первом этапе используют биотрофные методы проникновения в клетку и далее убивают своего хозяина, подобно некротрофам, как, например, грибы рода *Colletrichium* [26].

В зависимости от родовой принадлежности и способа питания, грибы имеют широкий арсенал различных приспособлений для колонизации растений. Понимание этих процессов позволяет определять ключевые точки в механизмах заражения и проникновения патогена в клетку, что определяет возможность адресно подбирать средства защиты, которые препятствуют заражению.

3.1.2 Методы борьбы с патогенами, биологические средства защиты растений

Сельскохозяйственные пестициды - химические вещества, которые используются для уничтожения вредителей сельскохозяйственных культур, или подавления их роста, или снижения вредного воздействия этих организмов [29]. Среди различных классов пестицидов - фунгициды включают физические, химические или биологические агенты,

предназначенные для борьбы с грибковыми микроорганизмами. Они широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями и сохранения урожайности и качества сельскохозяйственных культур [30].

Метод борьбы с патогенами путем обработки химическими фунгицидами до сих пор остается наиболее эффективным способом защиты урожая экономически значимых сельскохозяйственных культур и обеспечения его качества. На данный момент в сельском хозяйстве широко используется около 150 фунгицидных соединений с различными механизмами действия, а число их производных на порядок больше. Триазолы и стробилурины относятся к тем фунгицидам, применение которых в 1980-1990-х годах позволило остановить ряд эпидемий и обеспечить прорыв в борьбе с возбудителями наиболее опасных заболеваний растений [31]. Однако для надежной защиты растений от поражающих их грибов и оомицетов необходимо вводить строгую очередность применения различных типов фунгицидов, меняя типы в течение каждого нового вегетационного периода, иначе повышается риск развития резистентности этих фитопатогенов к фунгицидам. Резистентность - наиболее трудно преодолимое последствие фунгицидных обработок, которое делает их со временем малоэффективными и экономически неоправданными [32]. Попытки борьбы с резистентными формами фитопатогенных грибов и оомицетов посредством увеличения дозировок фунгицидов и кратности обработок бесперспективны, так как вызывают распространение все более и более устойчивых популяций этих патогенов. Доминирующими в современном сельском хозяйстве тенденциями, направленными на его экологизацию, считают сокращение дозировок фунгицидов без снижения эффективности их защитного действия и преодоление резистентности фитопатогенов. В то же время единовременный отказ от современных фунгицидов из группы высокого и среднего риска резистентности, в том числе стробилуринов и триазолов, не представляется возможным с практической точки зрения, поскольку они обеспечивают высокоэффективный контроль широкого спектра заболеваний и имеют ряд других преимуществ [33].

В качестве альтернативы химическим средствам защиты выступают БСЗР. На данный момент согласно «Государственному каталогу пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» (<http://opendata.mcx.ru/>), на данный момент известно 25 наименований биофунгицидов основанных на бактериях рода *Bacillus*, *Pseudomonas* и грибах рода *Trichoderma*. Принцип

действия данных препаратов схож – при обработке почвы, они способны быстро размножаться, подавляя развитие патогенов, утилизируя доступные органические компоненты почвы и повышая ее плодородность. Однако, биопрепараты имеют низкую эффективность при обработке растений и непригодны для «протравливания» семенного материала перед посадкой, так как подразумевают рост и развитие микроорганизмов, что неизбежно приводит к порче семян. Таким образом, несмотря на тренды экологического земледелия, отказ от химических фунгицидов на данный момент невозможен, так как БСЗР не могут составить реальную конкуренцию химическим фунгицидам [34].

Исходя из вышесказанного, становится очевидным, что в современных реалиях требуется разработка новых технологических решений, которые позволят дополнить или заменить химические фунгициды, используемые в настоящее время. Разработка и использование биологических средств защиты является одной из самых очевидных путей развития технологии защиты растений. Использование ферментов и ферментных препаратов в качестве БСЗР обусловлено их высокой активностью, специфичностью и экологической безопасностью. Наиболее перспективным направлением является разработка системы основанной на PR белках растений, являющихся частью иммунного ответа растения на заражение фитопатогенами [6] (более подробно классификация PR белков приведена в разделе 3.2).

3.1.3 Клеточная стенка грибов-фитопатогенов и ее роль в процессе патогенеза

Для определения методов борьбы с фитопатогенами, необходимо понимать механизмы-колонизации растения грибами. В этой связи состав клеточной стенки грибов является определяющим в процессе патогенеза.

Хитин представляет собой линейный гомополимер β - (1,4) -связанных мономеров N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) и, является вторым по распространенности полисахаридом в природе после целлюлозы. Помимо экзоскелета членистоногих и нематод хитин является важным структурным компонентом клеточных стенок грибов (КСГ). При синтезе цепей хитина они объединяются в микрофибриллы, которые ковалентно связываются с основным компонентом клеточных стенок грибов – β -(1,3)-глюканом, и вместе с гликопротеинами, образуют сложный матрикс, придающий жесткость клеткам грибов. Дополнительными компонентами клеточных стенок грибов являются другие белки и углеводы, такие как маннаны, β - (1,6) -глюкан и α - (1,3) -глюкан, которые образуют часть растворимого матрикса [35,36] (Рисунок 1).

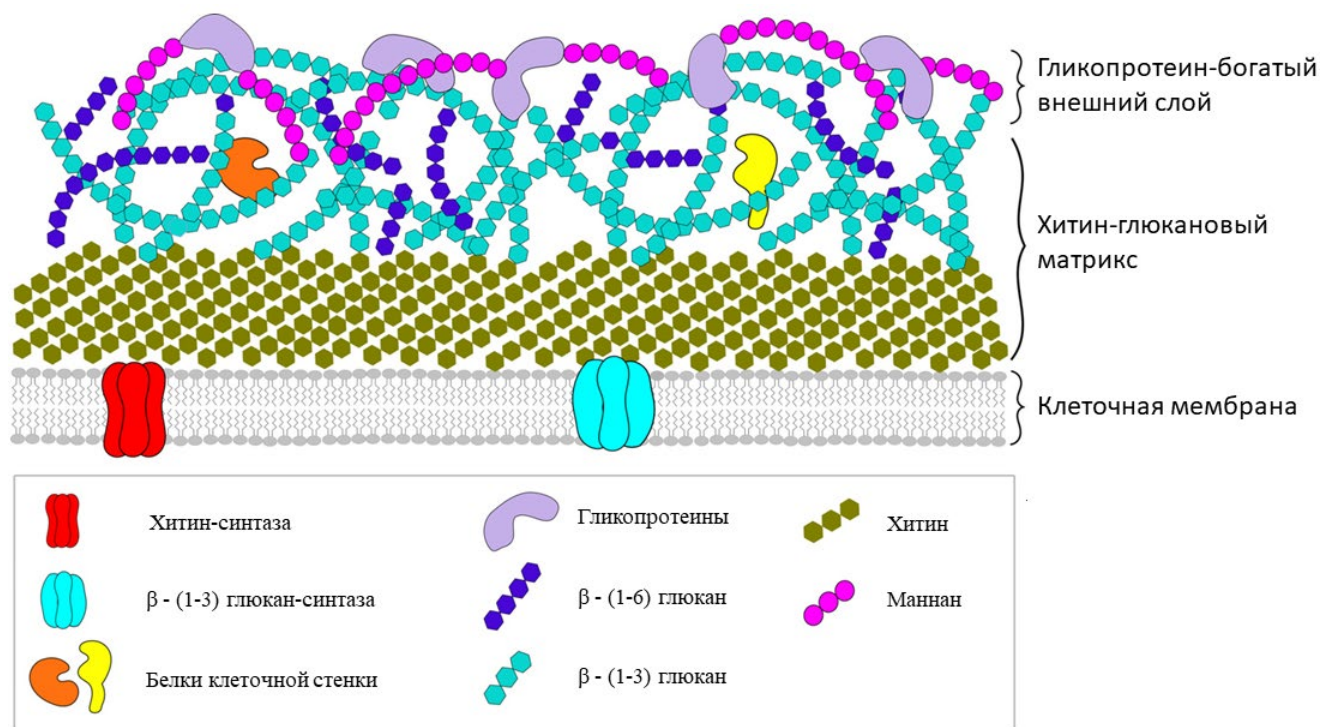


Рисунок 1 - Базовая структура клеточной стенки грибов. Внутренняя клеточная стенка представляет собой богатую хитином и глюканом взаимосвязанную матрицу. Внешний слой стенки богат маннозилированными гликопротеинами. Ферменты, участвующие в синтезе и ремоделировании клеточной стенки, могут быть либо интегральными мембранными белками или связанными с клеточной стенкой

Количество хитина в КСГ зависит от вида, условий окружающей среды и возраста. Содержание хитина в сухой клеточной стенке грибов может варьировать от 2 до 42% у дрожжей и аскомицетов, соответственно [37]. Хитозан также является одним из структурных компонентов клеточных стенок грибов, при этом его количество зависит как от видовой принадлежности гриба, так и фазы роста [37,38]. Несмотря на кажущуюся простоту биосинтеза клеточной стенки, полного понимания всех процессов, происходящих на разных стадиях развития грибов, на данный момент нет. В настоящее время полный анализ динамики изменения клеточной стенки в процессе роста исследован для двух организмов: *Saccharomyces cerevisiae* [39] и *Aspergillus fumigatus* [36].

Клетка гриба заключена в сложную матрицу из взаимосвязанных полисахаридов и белков, которые составляют клеточную стенку грибов. Существует много доказательств того, что клеточная стенка является основным фактором вирулентности патогенных грибов [40]. Недавние исследования показали влияние физиологического цикла развития гриба на его клеточную стенку, в процессе колонизации тканей растения-хозяина. В работах показано, что КСГ - это динамическая структура, как по форме, так и по составу,

которая играет ключевую роль в контроле патогенеза, морфогенеза и в восприятии широкого спектра факторов окружающей среды [33]. Несмотря на важность понимания процесса морфогенеза и десятилетия исследований, подробный состав и структура КСГ, а также процесс биосинтеза плохо изучены. Частично это связано с методологическими трудностями в изучении КСГ, а также в связи с значительным различием состава КСГ у разнородных грибов.

Таким образом, с одной стороны, клеточная стенка гриба является его защитой и основным инструментом для проникновения в растение и его заражения, с другой стороны, КСГ является основной мишенью защитных систем растений. А отдельные компоненты разрушенной клеточной стенки - основным демаскирующим компонентом патогена, вызывающие в хитин-индуцируемый иммунитет растений.

3.1.4 Хитин-индуцируемый иммунитет растений

Хитин, нерастворимый полимер β -1,4-связанного N-ацетилглюкозамина, является высококонсервативным структурным компонентом клеточных стенок грибов и является основным триггером растительного иммунитета. Олигомеры хитина распознаются как МАР (патоген-ассоциированный молекулярный паттерн) всеми видами растений, включая мхи (*Physcomitrella patens*) [41]. Таким образом, хитин, в процессе взаимодействий «патоген-растение» является ключевым объектом борьбы: для грибов это фактор вирулентности, незаменимый компонент КСГ, а для растений основная мишень, продукты деструкции которой способны вовремя активировать иммунитет. О том, что активация иммунитета растений связана с детекцией хитоолигосахаридов известно более 40 лет [42,43]. Однако понимание молекулярного механизма восприятия хитина и запускаемого хитином иммунитета сформировалось после клонирования первого хитинового рецептора растений из риса в 2006 году [44]. Точно так же олигосахариды β -глюкана запускают иммунные ответы растений, хотя механизм их восприятия полностью не выяснен [45,46].

Растения обладают активными механизмами защиты от патогенов, основанным на взаимодействиях клеточной стенки патогена и ее компонентами. На поверхности растений находится несколько рецепторов МАР, основная задача которых состоит в распознавании компонентов КСГ и активации сигнального МАР-киназного механизма [47]. Задачей этих рецепторов является первичное оповещение растения о заражении,

путем активации каскада гуанозинтрифосфат-гидролаз (ГТФаз) и патоген-активируемых киназ (МАРК) [48].

Рецепторы работают в единой системе с гидролитическими ферментами, которые растения конститутивно экспрессируют в апопласт. В основном это ферменты, относящиеся к классу хитиназ и 1,3-глюканаз, которые нацелены на клеточную стенку патогена такая система защиты преследует две цели. Первая, разрушение клеточной стенки патогена и его ослабление (рисунок 2).

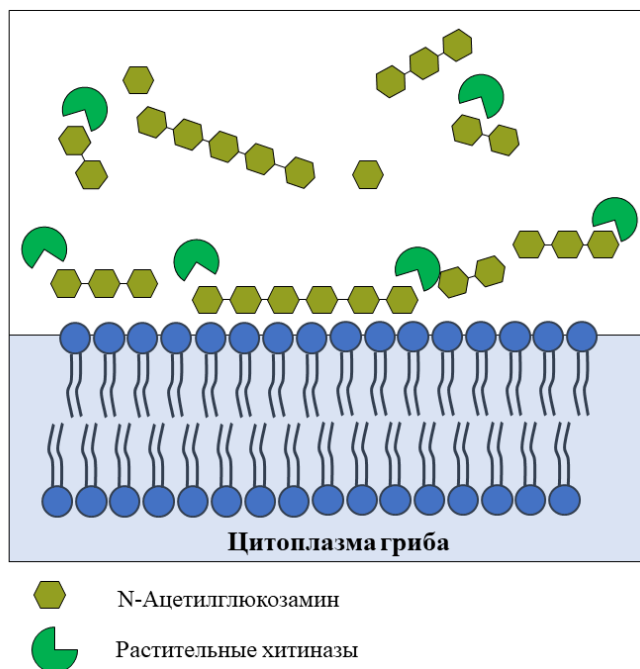


Рисунок 2 - Хитин в клеточных стенках грибов подвергается атаке хитиназ, секретируемых растением, вследствие чего высвобождаются фрагменты хитина, которые могут дополнительно активировать иммунную систему растения хозяина

Вторая цель - в ходе гидролиза клеточной стенки патогена высвободить максимальное количество молекул - индукторов МАРК, которые активируют иммунный ответ, что, в совокупности, позволяет эффективно сопротивляться проникновению патогена [49]. Хитиновый рецептор был впервые обнаружен у риса при исследовании хитин-элиситорного связывающего белка (CEBiP), который содержит внеклеточный мотив LysM и трансмембранный домен, но не имеет внутриклеточного киназного домена [50]. Данные показывают, что CEBiP образует комплекс с хитином и киназой 1 рецептора хитина-элиситора риса CERK1, что активирует иммунный ответ, известный как МАРК-триггерный иммунитет (MTI) [51,52] (Рисунок 3).

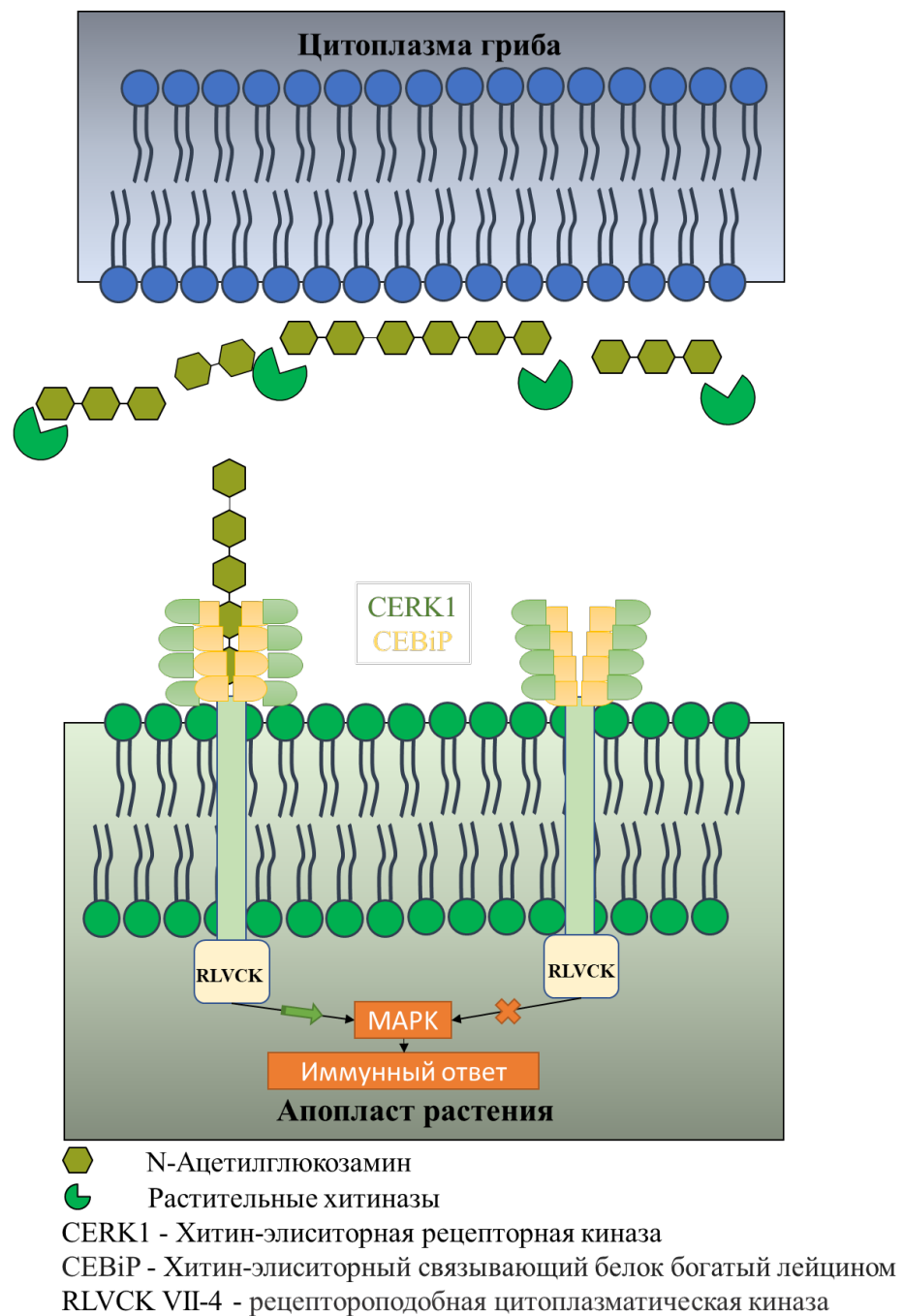


Рисунок 3 - Механизм активации МТІ путем передачи сигнала на MAP-киназы в ответ на связывание олигосахаридов хитина с рецептором

Активация данного типа иммунитета включает производство активных форм кислорода, транскрипционное перепрограммирование клеток, с целью гиперэкспрессии гидролитических ферментов и других белков, совместное действие которых останавливает рост патогена на ранних стадиях заражения [53,54].

Несмотря на эффективность хитин-индуцируемого иммунитета, у всех грибных патогенов есть различные стратегии защиты хитина КСГ от воздействия хитиназ

растений, состоящие как в способности нарушать пути передачи сигналов в иммунитете растений, так и в возможности эффективно конкурировать за олигомеры хитина [36,55,56]. Ниже будут рассмотрены основные механизмы, являющиеся ключевыми для понимания роли хитина и хитиназ в защите растений.

3.1.5 Механизмы защиты клеточной стенки патогена

Патогены устанавливают свой первый контакт с растительными клетками в апопласте, внеклеточном пространстве растительной ткани. Подавление иммунитета, запускаемого хитином, становится основным аспектом вирулентности грибов на данном этапе [57]. Для предотвращения индукции иммунного ответа, запускаемого хитином, патогены разработали множество механизмов.

Высвобождение олигомеров хитина происходит постоянно, как вследствие действия растительных хитиназ, так и в процессе ремоделирования клеточной стенки патогена. Это приводит к раннему обнаружению патогена и невозможности дальнейшего инфицирования. Олигомеры хитина связываются с рецептором растения. Таким образом, высвобождение этих МАР клеточной стенки напрямую влияет на результат взаимодействия между патогеном и хозяином.

Патогены научились блокировать высвобождение путем изменения состава клеточной стенки на периферии инфекции, например, путем деацетилирования хитина (с образованием хитозана). Превращение хитина в хитозан позволяет как существенно снизить скорость гидролиза клеточной стенки, делая ее недоступной для растительных хитиназ (Рисунок 4), так и снизить сродство олигомеров с рецепторами – олигомеры хитозана в 10-20 раз менее эффективно активируют хитининдуцируемый иммунитет.

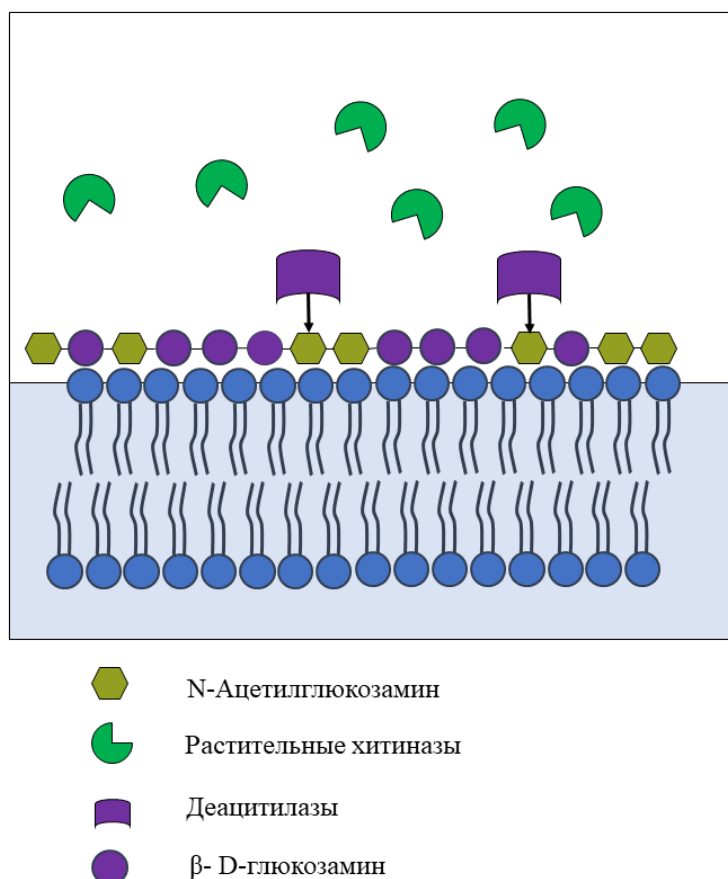


Рисунок 4 – Превращение хитина в хитозан, который является плохим субстратом для хитиназ и слабым индуктором иммунных ответов хозяина

Этот механизм был хорошо проиллюстрирован, на примере модификации клеточной стенки грибов ржавчины *Puccinia graminis* и *Uromyces fabae*, а также антракнозного гриба *Glomerella graminicola*. Так, хитин патогена на первых этапах заражения, недоступен для хитин-связывающего агглютиниона зародышей пшеницы, но хорошо связывается с хитозан-специфическими антителами [58], при этом на последующих этапах развития хитин в клеточной стенке надежно определяется.

Помимо деацетилирования хитина, во время грибковой инфекции могут происходить и другие изменения в составе КСГ. Патоген способен снижать содержание β -глюкана или осуществлять замены β -1,3-глюкана на α -1,3-глюкан (Рисунок 5).

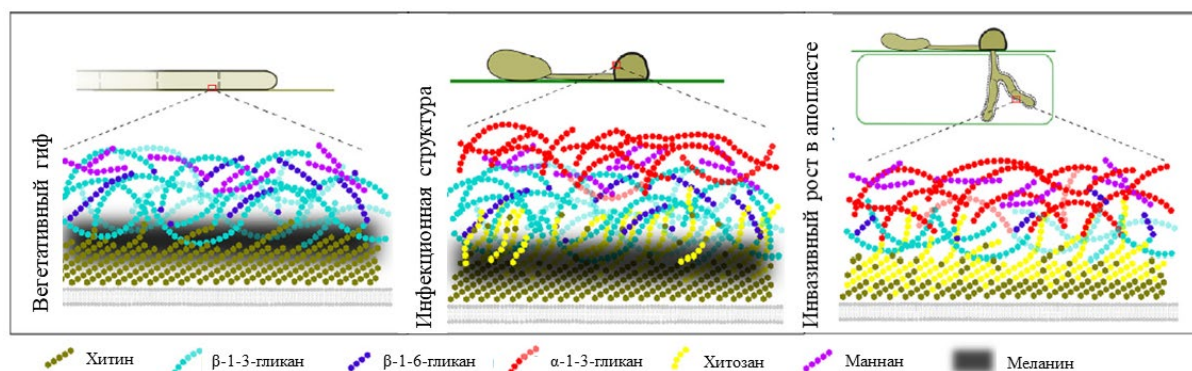


Рисунок 5 – Механизм ремоделирования клеточной стенки в процессе заражения растения

Таким образом, патоген модифицирует состав и структуру клеточной стенки, для защиты и маскировки целевых областей от гидролитических ферментов растения и уменьшения образования потенциальных МАР [59,60]. Например, возбудитель рисового blast *M. oryzae* специфически накапливает α -1,3-глюкан на поверхности клеточной стенки инфекционных гифов во время инвазии растений. Накопление α -1,3-глюкана на клеточной стенке *M. oryzae* необходим для успешной инвазии риса, поскольку мутанты с пониженным уровнем α -1,3-глюкана имели повышенную чувствительности к хитиназам (схожий эффект оказывала обработка или α -1,3-глюканазой немутантного штамма) и вызывали более быстрый иммунный ответ у растений. Таким образом, было показано, что α -1,3-глюкан защищает клеточную стенку грибов от антимикробных препаратов, включая хитиназы, задерживает высвобождение МАР и, как следствие, снижает иммунный ответ хозяина [59].

Следующий механизм связан с выработкой патогенами эффекторов - молекул, которые конкурентно связываются с компонентами клеточной стенки и олигомерами хитина. У патогенных грибов были охарактеризованы различные типы эффекторов, которые либо защищают их клеточную стенку от гидролиза, либо препятствуют механизмам иммунного ответа хозяина [61–63].

Классическим примером эффектора, защищающего клеточную стенку, является эффектор Avr4 из *Cladosporium fulvum*. Патоген секретирует эффектор Avr4 во время инфицирования растений-хозяев. Avr4 содержит хитин-связывающий домен беспозвоночных (ChBD) (семейство углеводов-связывающих модулей 14, CBM14) и связывает хитин клеточной стенки грибов, уменьшая его доступность для хитиназ растений, тем самым предотвращая гидролиз клеточной стенки [64,65]. Гомологи Avr4

встречаются у ряда родственников *Cladosporium fulvum*, недавно были достоверно определены гомологи эффектора Avr4 у *Mycosphaerella fijiensis*, который вызывает болезнь черной сигатки банана и аналогичным образом защищает стенки грибковых клеток от гидролиза хитиназами растений [66] (Рисунок 6).

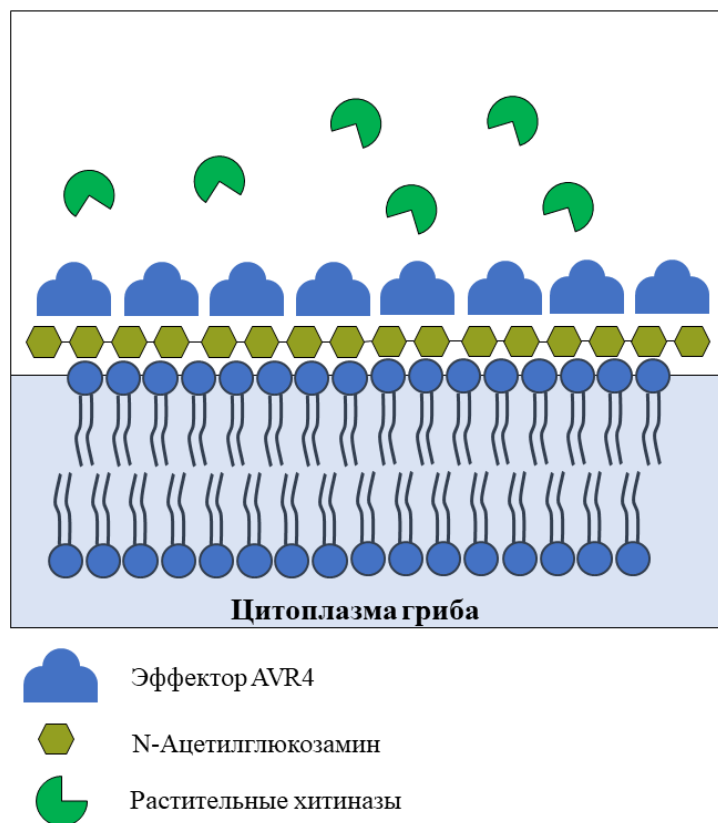


Рисунок 6 – схема защиты клеточной стенки патогена от хитиназ путем связывания эффектора AVR4 с хитином клеточной стенки

Более широко распространены группа хитин-связывающих эффекторных белков в царстве грибов основанная на лизин-богатых белках, называемых LysM, которые имеют достаточно много общего с растительными LysM упомянутыми в разделе 1.4. Семейство этих белков имеет разнообразное строение, однако всех их объединяет то, что они имеют от двух до десяти доменов богатых лейцином. Как и Avr4, этот эффекторы были первоначально идентифицированы у *Cladosporium fulvum*, однако позже были найдены в других видах грибов: *Magnaporthe oryzae* и *Zymoseptoria tritici* [67]. Эти патогены в процессе инфицирования экспрессируют эффекторы, содержащие LysM в апопластическое пространство инфицированных растения. Как было показано, эти эффекторы являются важной составляющей вирулентности грибов и обеспечивают

эффективное подавления иммунитета растения. Мутанты с делетированными генами *LysM*, теряли способность инфицировать растения [56,63,68].

Один из молекулярных механизмов, с помощью которого эффектор *LysM* *C. fulvum* может подавлять иммунитет, запускаемый хитином, был выявлен на основании его кристаллической структуры [69]. *LysM* обладает способностью связывать олигосахариды хитина с высокой аффинностью, достаточной для того, чтобы конкурировать с иммунными рецепторами растений [67]. Таким образом, иммунитет, запускаемый хитином, не индуцируется, и гриб может колонизировать апопласт, не подвергаясь риску быть обнаруженным. Так же есть данные, что *LysM* эффекторы потенциально нарушают процесс активации иммунных рецепторных комплексов хитина посредством предотвращения димеризации рецепторов (Рисунок 7).

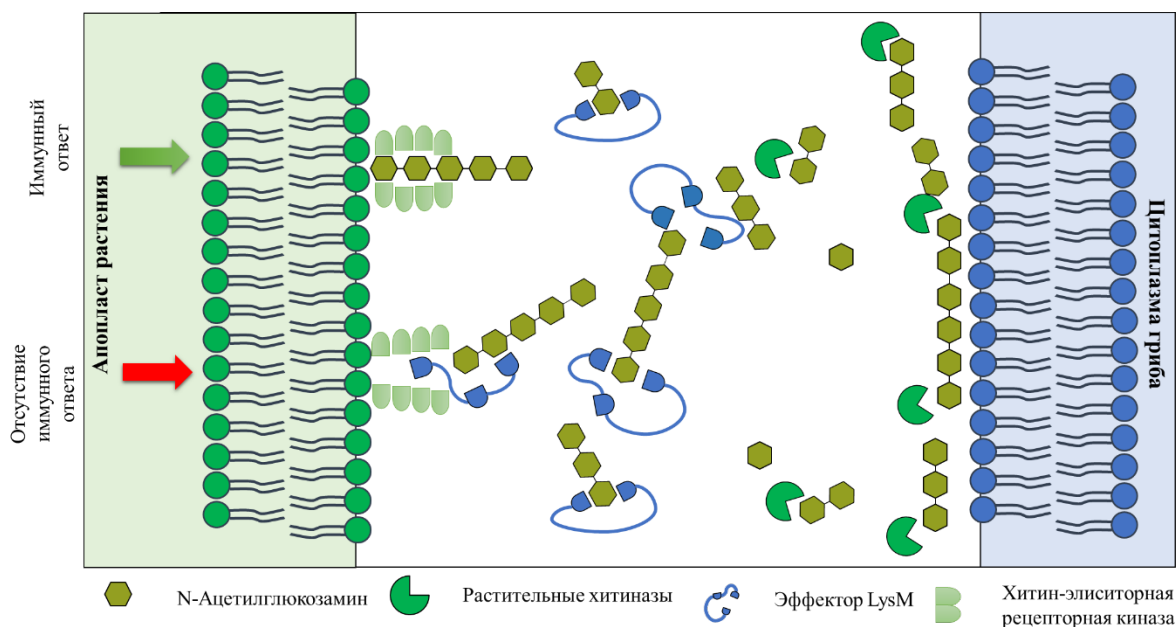


Рисунок 7 - Эффекторы *LysM* низших грибов препятствуют распознаванию высвободившихся олигомеров хитина растением-хозяином

Таким образом, анализируя вышесказанное, можно сделать вывод о том, что:

- грибные патогены представляют существенную угрозу для растений и для борьбы с ними требуется разработка новых биопрепаратов, способных воздействовать на механизмы патогенеза;

- КСТ и хитин, содержащийся в ней, являются основными целями иммунитета растений. Продукты разрушения хитина и хитозана являются МАР-активаторными молекулами, оповещающие растение о наличии патогена;

- растительные хитиназы, могут эффективно подавлять рост и развитие патогена по двум механизмам – разрушение клеточной стенки и активация иммунитета растений путем высвобождения МАР.

3.2 Хитинолитические ферменты

3.2.1 Первичная классификация хитиназ

Хитиназы (ЕС 3.2.2.14) представляют собой гликозилгидролазы, гидролизующие β -1,4 связи N-ацетилглюкозамина, присутствующего в полимерах хитина [70]. Хитинолитические ферменты разделены на две основные категории по типу воздействия на полимер: эндохитиназы и экзохитиназы. Эндохитиназы (ЕС 3.2.1.14) представляют собой класс хитиназ, которые случайным образом расщепляют внутренние участки хитина, генерируя низкомолекулярные олигомеры, состоящие из остатков глюкозамина, таких как хитотриоза, хитобиоза и диацетилхитобиоза. Экзохитиназы разделены на две категории, а именно, хитобиозидазы (ЕС 3.2.1.29), которые катализируют высвобождение диацетилхитобиозы от терминального невосстанавливающего конца, и N-ацетилглюкозаминидазы (ЕС 3.2.1.30), которые расщепляют олигомерные продукты, полученные эндохитиназами, на мономеры N-ацетилглюкозамин [71].

Хитинолитические ферменты классифицируются в базе данных CAZY [72] на семейства гликозилгидролаз (GH) 18, 19 и 20, как показано на рисунке 8.

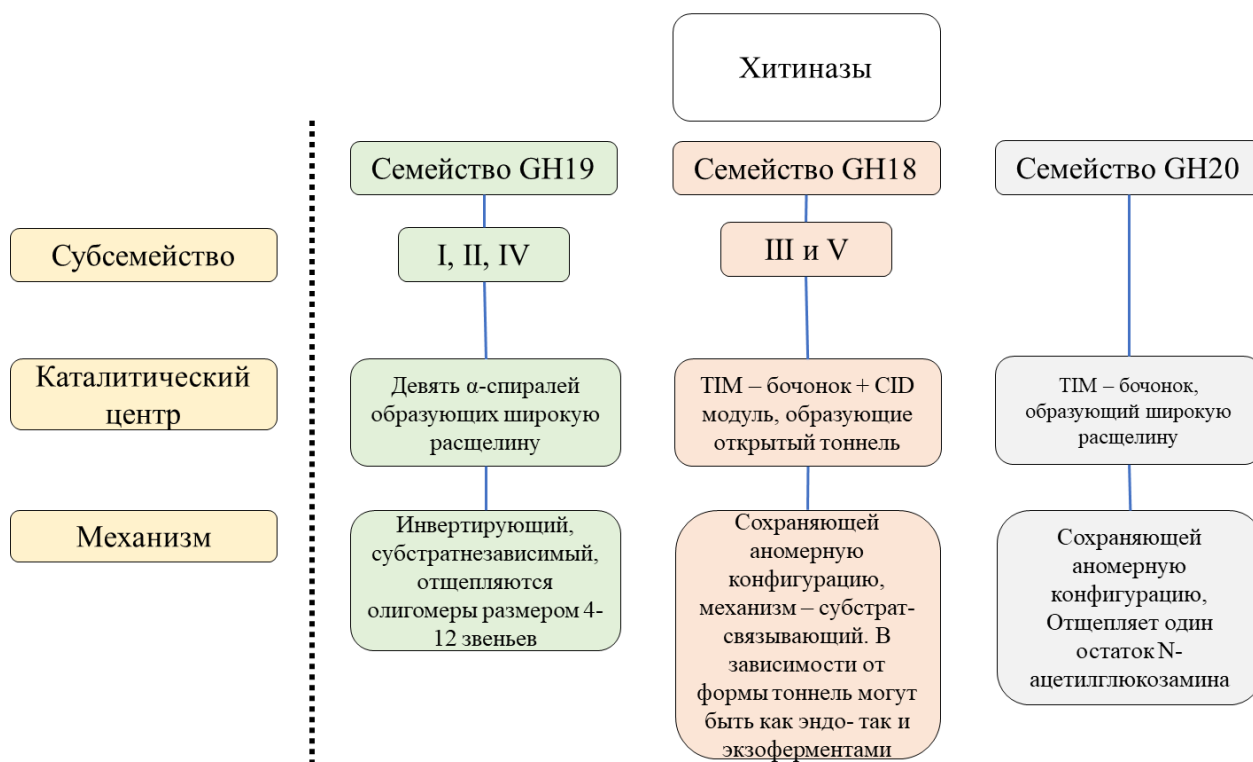


Рисунок 8 - Классификация хитиназ [73]

Гликозидазы семейств GH18 и GH19, рассматриваемые в данной работе, рассматриваются как истинные хитиназы, поскольку они катализируют деградацию полимеров хитина. Семейство GH20 включает хитобиазу и β -N-ацетилгексозаминидазу, которые катализируют распад димерных единиц N-ацетилглюкозамина (хитобиозы), отщепление концевой N-ацетилгалактозамина [74,75].

Семейства различаются по своим аминокислотным последовательностям и каталитическим свойствам [76], и, хотя в этой таксономии [77] есть достаточно много нестыковок, биохимически подтверждено, что семейства GH18, GH19 и GH20 состоят из ферментов, обладающих хитинолитическими свойствами. Несмотря на функциональное родство хитиназ GH18 и GH19, ферменты данных групп не обладают сходством аминокислотных последовательностей или трехмерных структур, и предполагается, что эти два семейства возникли эволюционно независимо [78].

3.3 Хитиназы 19-ого семейства гликозил-гидролаз (GH19)

3.3.1 Разнообразие хитиназ GH19

Было показано, что все хитиназы семейства GH19 происходят от растений, включая хитиназы актинобактерий и пурпурных бактерий, прямо или косвенно приобретенные в результате горизонтального переноса генов [79]. В обширном исследовании эволюции хитиназ было идентифицировано 20 уникальных консервативных мотивов среди GH19 и был определен общий мотив аминокислотной последовательности каталитического центра, характерный для хитиназ GH19 ([FHY] -GRG- [AP] -xQ- [IL] - [ST] - [FHYW] - [HN] - [FY] -NY)).

Первоначально, хитиназы в растениях были открыты как белки, связанные с патогенезом (PR). Классификация PR белков насчитывает 11 семейств, при этом четыре семейства представлены хитиназами (PR-3, PR-4, PR-8 и PR-11), что показывает исключительную важность хитиназ для иммунитета растений. Хитиназы либо индуцируются в ответ на элиситоры патогенов, либо конститутивно экспрессируются в тканях, уязвимых для атаки [80,81].

Хитиназы GH 19 широко представлены в природе, однако большинство из них идентифицированы в растениях. Ранее считалось, что носители бактериальных хитиназ GH19 являются исключительно бактерии рода *Streptomyces griseus*, *Streptomyces griseus* и *Streptomyces coelicolor*. Хитиназы этих бактерий - первые гомологи растительных ферментов, обнаруженные в бактериях и единственные представители бактериальных

GH19 с полученными 3D-структурами. Однако, спустя 20 лет, с развитием метагеномных технологий, удалось обнаружить и другие бактериальные рода [79], обладающие хитиназами GH19. В 2016 году была выделена и охарактеризована первая грибковая хитиназа семейства GH19 из *Nosema bombycis* (обозначенная как NbChiA). В настоящее время это единственная известная хитиназа семейства GH19, выделенная из грибов [82].

Из-за большого разнообразия хитиназ внутри семейств, на данный момент принято классифицировать хитиназы на 5 классов (Таблица 2). Классы I, II и IV растительных хитиназ принадлежат к семейству GH19, включая хорошо охарактеризованные хитиназы из *Oryza sativa* [83], *Bryum coronatum* [84] и *Picea abies* [85]. Классы различаются наличием (класс I) или отсутствием (класс II) хитин-связывающего домена (CHBD). Класс IV меньше по размеру из-за отсутствия в их структуре части петель [86].

3.3.2 Особенности строения и свойств хитиназ различных классов

Исследования структурно-функциональных свойств хитиназ GH19 исследовано многими научными коллективами, однако до сих пор нет единого мнения о их роли в организме растения - каждая новая форма фермента открывала новые, неизвестные ранее, функции. Изначально хитиназы GH19 были отнесены к различным классам в зависимости от первичных структур [87]. Однако, до сих пор в литературе используются привязка к классификации белков в зависимости от принадлежности к определенной группе PR, и изоформе (Таблица 2) [88].

Таблица 2 – Соответствие современной классификации хитиназ с классами PR белков.

Класс хитиназ	Группа	Семейство
I	PR-3	Основные хитиназы GH19
II	PR-3	Кислые хитиназы GH19
III	PR-3	Хитиназы GH18
IV	PR-8	Кислые и основные хитиназы GH19
V	PR-11	Хитиназы GH18

Так, хитиназы GH19 подразделяются на кислые и основные. Кислые хитиназы локализуются преимущественно в апопласте, что должно свидетельствовать о том, что они первыми встречаются с патогенами и должны обладать высокой фунгицидной активностью, однако в дальнейших работах было доказано, что среди хитиназ только основные формы обладают фунгицидным действием [89].

Хитиназы класса II представляют собой в основном кислые изоформы, расположенные в апопласте. По своей структуре схожи с хитиназами класса I, но не

имеют N-концевого домена, богатого цистеином. и обладают рядом аминокислотных замен в каталитическом домене, однако замены эти несистемны и их роль не ясна. Этот класс хитиназ обнаружен во всех модельных растениях: табак, картофель, ячмень, рис и петуния [90].

Группа Лоуренса [91] показала, что основная хитиназа I, полученная из томатов, инокулированных *Alternaria solani*, эффективно ингибировала патоген *in vitro*, при этом кислая хитиназа II (имеющая степень гомологии 79%) не оказывала ингибирующего действия. Основные хитиназы I локализируются в вакуолях растений и представляют наибольший интерес, с точки зрения разработки на их основе потенциальных биофунгицидов, так как все представители обладают фунгицидной активностью в той или иной степени. Основные хитиназы класса I содержат N-концевой богатый цистеином домен предполагаемыми хитинсвязывающими свойствами, который связан с высококонсервативным каталитическим доменом через гибкий пролин-богатый линкер. Большинство хитиназ данного типа имеют C-концевое удлинение (СКУ), необходимое для вакуолярной локализации белка [73]. Хитиназа класса I табака, картофеля, бобов, арабидопсиса и риса преимущественно расположены в центральной вакуоли. Основные хитиназы I так же следует разделять по локализации - когда СКУ отсутствует или изменяется посредством мутагенеза, хитиназы класса I транслоцируются внеклеточно [92–95]. Таким образом, наличие или отсутствие СКУ делит хитиназы класса I на два подкласса: подкласс Ia (присутствует СКУ) и подкласс Ib (СКУ отсутствует).

Хитиназы класса IV обнаруживают четыре делеции в каталитическом домене и обладают высокой гомологией с хитиназой класса I, однако являются внеклеточными. Доказано наличие такого типа хитиназ у *Arabidopsis thaliana* [82], винограда [83] и фасоли [84].

Как говорилось выше, два класса растительных хитиназ V и III относятся GH18, однако вероятнее всего они ответственны за иммунитет против патогенных бактерий, так как обладают высокой лизоцимной активностью [96]. Хитиназы класса V характеризуются дубликацией N-концевого хитин-связывающего домена. Хитиназы класса III, расположенные апопластически, структурно не связаны с другими типами растительных хитиназ, обладающих доменом со слабым сходством с прокариотическими хитиназами [97], основная активность - лизоцимная [88].

В то время как классы I, II и IV относятся к белку PR-3, класс III относится к PR-8, а класс V относится к группе белков PR-11. В работе Хаммела и др. [78] изучали эволюционные взаимоотношения между классами хитиназ, сравнивая нуклеотидные последовательности каталитических доменов хитиназ различных покрытосеменных растений. Классы I и IV образуют дискретные и хорошо поддерживаемые монофилетические группы, происходящие от общего предка, предшествующего расхождению двудольных и однодольных растений [98,99].

3.3.3 Дуализм свойств растительных хитиназ

Доказанным фактом является разнообразие ролей хитинолитических ферментов в организме растений и их свойств. Растительные хитиназы выполняют множество функций и, на данный, момент нет системы, способной достоверно предсказать свойства хитиназы в зависимости от ее структуры [100].

Однако способность гидролизовать хитин не ограничивают функции GH19. Например, показано, что хитиназа экспрессируется в ответ на холодовой стресс и накапливается при низкой температуре в апопласте листьев озимой ржи. Данный вариант хитиназы GH19 показал и эндохитиназную, и антифризную активность, тем самым доказывая свою двойственную функцию [101].

Следует акцентировать внимание на то, что дивергенция хитиназ привела к появлению так называемого «плотоядного синдрома», позволяющего растениям активно охотиться на насекомых и получать азот из их хитинового экзоскелета [102] (рисунок 9).



Рисунок 9 – *Drosera capensis*, переваривающая плодовую мушку (*Drosophila melanogaster*)

Хитиназы хищных растений, эволюционно превратившиеся из белков «защиты» в белки «нападения» довольно слабо освещены в мировой литературе, несмотря на свои исключительные свойства[103]. На данный момент существует ряд работ по определению

функциональных и биохимических свойств ферментов из растений рода *Dionaea* [104] и *Nepenthes* [105]. Однако на данный момент в международной базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) содержится всего 2 полные последовательности хитиназ растений из рода *Drosera* (KU516826 - *Drosera rotundifolia* и LC037409 - *Drosera adelae*). А биохимическая характеристика дана только для хитиназы *Drosera rotundifolia* [106].

Было показано, что хитиназы класса I не только служат частью иммунитета, но и играют важную роль в хищничестве растений у плотоядных *Caryophyllales*. Присутствие белков хитиназ класса I и их активность были продемонстрированы в ловушках росянки (*Drosera*) [98] и тропических растений-кувшинов (*Nepenthes*) [107]. Для подтверждения гипотезы о связи переваривания хитина и экспрессией хитиназы, были исследованы уровни экспрессии хитиназ Ib при индукции ловушек чистым хитином. Для *Nepenthes* было доказано, что хитиназы подкласса Ia и Ib имеют разные профили экспрессии в секреторной области ловушек: подкласс Ia конститутивно экспрессируется в секреторных клетках, тогда как экспрессия подкласса Ib повышается в ответ на хитин. У *Drosera rotundifolia* хитиназа класса I была локализована в стеблевых железистых щупальцах, используемых для отлова и переваривания добычи. Экспрессия данной хитиназы повышалась в ответ на индукцию хитином по тому же механизму, что и у *Nepenthes*. Таким образом, хитиназы класса I, по-видимому, имеют двойную роль в плотоядных растениях *Caryophyllales*, и одинаково хорошо используются растением как в ответной реакции на патогенез, так и для переваривания добычи [105,108].

Таким образом растительные хитиназы GH19 представляют огромный интерес с биотехнологической точки зрения, поскольку, очевидно, могут быть применены в гидролизе хитинсодержащих субстратов, а также в качестве эффективного БСЗР.

3.3.4 Классификация хитиназ 18-ого семейства гликозил-гидролаз (хитиназ GH18)

Хитиназы GH18 преимущественно представлены в грибах и бактериях. Хитиназы грибного происхождения можно разделить на три различные подгруппы, а именно, А, В и С, на основе аминокислотных последовательностей их каталитических модулей. Эти подгруппы различаются по архитектуре субстрат-связывающей щели и, соответственно, типу ферментативного механизма (-экзо и -эндо), а также виду углевод-связывающего модуля (ChBD классов 18 и 50 [109]). Присутствие ChBM в ферментах позволяет более

прочно связываться с нерастворимыми субстратами [110]. Таким образом, процессивность ферментов зависит от структуры ChBM.

К подгруппе «А» относятся хитиназы, участвующие в процессах роста и автолиза грибов. Автолиз - естественный процесс самопереваривания старых гиф. Лучшее понимание механизмов и факторов, вызывающих грибковый автолиз, может значительно улучшить понимание методов борьбы с патогенами. Показано, что *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma* экспрессируют различные изоформы хитиназ GH18 с молекулярной массой 42 кДа (Chit42).

Вклад хитиназ различного происхождения в автолиз сильно варьируется [111–113]. Например, для хитиназы из *T. atroviride* Chit42 описана двойная функция – хитиназа участвует как в автолизе, так и в микопаразитизме [114], эти данные подтверждают, что одни и те же хитиназы могут участвовать в деградации собственной и чужой КСГ. Было высказано предположение, что доступность хитина внутри КСГ может быть основным фактором, определяющим процесс автолиза. В здоровых гифах доступность может быть ограничена защитой, обеспечиваемой белками клеточной стенки. Это подтверждено фактом прорастания спор *T. atrovirid*, которые не ингибируются смесью собственных хитинолитических ферментов [115]. Напротив, прорастание других грибов (*T. reesei*, *Neurospora crassa* и *Aspergillus niger*) ингибируется этими ферментами. Таким образом, грибы, вероятнее всего, имеют иммунитет против собственных хитиназ GH18.

Хитиназы подгруппы «В» в основном участвуют в питательных функциях, включая функцию атаки, например, у микопаразитарных и энтомопатогенных грибов. Большинство протестированных генов хитиназ группы «В» регулируются пищевыми стимулами. Как правило, гены этих белков индуцируются хитином или более специфическими для хозяина источниками углерода у микопаразитарных и энтомопатогенных грибов. Большинство из них активируются во время голодания (например *chit33* и *ech30* из *T. atroviride* и *chit42* из *M. anisopliae*) и подавляются глюкозой или другими легко метаболизируемыми источниками углерода [116,117].

3.3.5 Хитиназы GH18 как эффекторы патогенеза

Описывая дуализм свойств хитиназ, необходимо отметить, что он проявляется и в 18 семействе хитиназ. Отдельно стоит обратить внимание на работу Лоренсини [118], посвященную хитиназам GH18, имеющим мутацию в каталитическом центре. Показано,

что патоген какао *Moniliophthora perniciosa* имеет каталитически неактивную хитиназу (MpChi), которая действует как фактор патогенности. Ген *mpChi* экспрессируется в процессе биотрофного взаимодействия патогена с какао и кодирует хитиназу с мутацией в активном центре, что приводит к неспособности фермента осуществлять гидролиз цепей хитина. Несмотря на отсутствие хитинолитической активности, MpChi сохраняет специфичность связывания субстрата и предотвращает запускаемый хитином иммунитет за счет связывания иммуногенных фрагментов хитина. Примечательно, что родственный ему вид *M.Roreri* кодирует вторую неортологичную хитиназу с другой мутацией в каталитическом центре, однако имеющей ту же функцию. Таким образом, хитиназы независимо развились в фактор вирулентности. В ходе исследования обнаружено, что несколько родов грибов имеют схожие инактивированные хитиназы.

Таким образом, участие в патогенезе хитиназ GH18 является достаточно распространенной практикой, очевидно, что активные хитиназы могут помогать патогену в колонизации растения. Это следует из того факта, что для акта каталитического расщепления хитина требуется наличие N-ацетильной группы в субстрате, при ее отсутствии даже полноценная хитиназа GH18, без мутаций, необратимо связывается с деацетилированными поли/олигосахаридами. Так частично деацетилированные фрагменты хитина, генерируемые растительными хитиназами из клеточной стенки гриба, могут необратимо связываться с хитиназами GH18 семейства, вследствие чего происходит подавление иммунного ответа растения.

Интересно отметить схожий механизм, направленный на инактивацию фермента в хитиназах GH19. Они были обнаружены в некоторых растениях и так же имели мутации в активном центре, при сохранении субстрат-связывающих свойств. Данная разновидность хитиназ 19 семейства у растений, вероятно появились с обратной целью – связываться с поверхностью клеточной стенки патогены и ингибировать его рост [119].

3.3.6 Топология каталитических сайтов хитиназ GH18 и GH19

Вариации топологии каталитических центров весьма широка, однако определённые общие паттерны прослеживаются. Как правило, активный центр GH может быть туннельным или в виде расщелины. Туннельные конформации – распространенные топологии хитиназ GH18. Они определяют специфичность субстрата, а также длину субсайтов субстрата и расщепления в хитиназах. Считается, что форма туннеля возникла

из топологии открытой расщелины, путем образования длинных петель, которые частично перекрывают расщелину и образуют «крышу» [120] (рисунок 10).

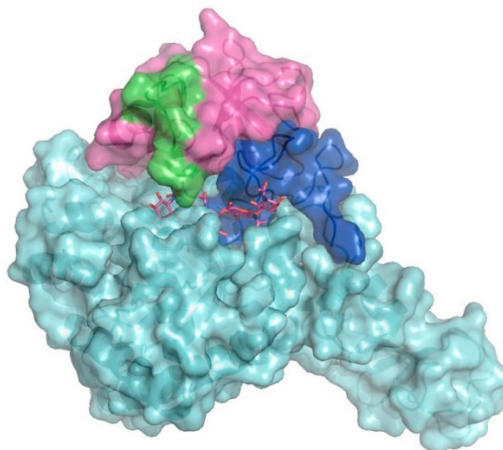


Рисунок 10 – Кристаллическая структура каталитического центра хитиназы 18 семейства, связанная с (GlcNAc) 5 (PDB ID: 1E6N). Лиганд показан в виде палочек с фиолетовыми атомами углерода. α / β -домен показан пурпурным цветом, а петля образующая «крышку» тоннеля, окрашена в зеленый цвет. TIM-модуль, показана синим цветом

Дополнительные петли позволяют активному центру претерпевать конформационные изменения, которые запускают «открытую» и «закрывающую» конформацию каталитической бороздки, что приводит к разной субстратной специфичности.

Некоторые хитиназы GH18 имеют дополнительный домен внутри каталитического домена, который называют CID (С-концевой домен). CID представляет собой ($\alpha + \beta$) домен, обнаруженный только в подсемействе «А» хитиназ GH18, расположенный между седьмой и восьмой β -цепями бочкообразной складки TIM каталитического сайта [121]. Широко изученные хитиназы из *S. marcescens*, обозначенные как *SmChiA*, *SmChiB* и *SmChiC*, были применены в качестве модели «стандартной» хитиназы GH18. *Sm ChiA* и *SmChiB* оба принадлежат к подсемейству «А». Их каталитические домены TIM-бочонка содержат CID, который ответственен за туннелеподобные глубокие щели и процессивность деградации хитина [100]. CID отсутствует в *SmChiC*, что свидетельствует о том, что его каталитическая щель более открытая и неглубокая по сравнению с аналогами, что приводит к отсутствию процессивности деградации хитина.

Хитиназы GH19 обычно имеют широкую и открытую щель, преимущественно состоящую из петель и α -спиралей (рисунок 11).

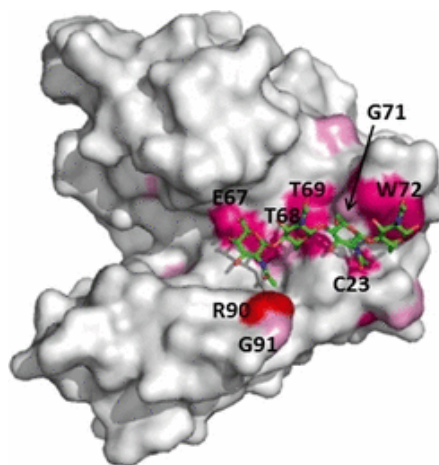


Рисунок 11 - Структура каталитического центра хитиназы GH19, буквам показаны положения а/к остатков, участвующих в связывании хитина [124]

Число петель и спиралей, обнаруживаемых в каталитических доменах, варьируется среди GH19 и, таким образом, описывается как «петлевые» или «без петель» [122]. В «петлевых» хитиназах дополнительные петли расположены по обе стороны от субстрат-связывающей щели, тогда как у «безпетлевых» эти дополнительные петли отсутствуют [123]. Считается, что дополнительные петли удлиняют канавки для связывания субстрата, обеспечивая больше участков для связывания с более длинными цепями хитина. «Петлевая» структура наиболее характерна для хитиназ 19 семейства из растений, тогда как бактериальные хитиназы дополнительных петель не имеют.

3.3.7 Вспомогательные хитин-связывающие домены

В основном, хитиназам присуща двудоменная структура, в которой особая роль отводится хитин-связывающему домену (ChBD). ChBD сепаративно от каталитического домена может связываться с кристаллами хитина, нарушая его упаковку. На сегодняшний момент механизм, по которому ChBD влияет на активность хитиназ, точно не известен, тем не менее, обнаружено, что ChBD домены обеспечивают аффиность фермента к субстрату и специфичность гидролиза [124]. Исследования хитиназ без ChBD и хитиназ с делетированным ChBD показали, что вспомогательный домен может способствовать частичному гидролизу субстрата и правильному позиционированию субстрата в активном центре [125]. Насчитывается около 5 типов ChBD, однако нет строгой зависимости между семействами хитиназ и семействами хитин-связывающих доменов. Зачастую ChBD являются общими для обоих семейств хитиназ.

Ли и др. с помощью сайт-направленного мутагенеза удалила остатки Trp70, Trp245 и Ser33 в ChBD из бактерии *Aeromonas caviae* (эти остатки ответственны за связывание

хитина), и продемонстрировала, что активность фермента снижалась в отношении кристаллического хитина с 5,24 ед/мг до 2 ед/мг. Удаление всего ChBD привело к тому, что фермент потерял почти всю свою активность в отношении кристаллического хитина, но, что закономерно, сохранил большую часть своей активности в отношении коллоидного хитина [126].

Это показывает, что ChBD необходим для полной деградации нерастворимого кристаллического хитина, однако не нужен для коллоидных или растворимых субстратов.

3.3.8 Каталитические механизмы действия хитиназ

Основываясь на стереохимическом подходе, хитиназы классифицируются как удерживающие или инвертирующие. Хитиназы GH18 сохраняют и поддерживают конфигурацию β -аномерного углерода субстрата и продукта (Рисунок 12А). Этот механизм достигается с помощью субстрат-зависимого гидролитического механизма двойного замещения с участием мотива DXDXDXE [127,128] или просто DXDXE [129] (D- аспарагиновая кислота, E-глутаминовая кислота и X-любая другая аминокислота) в каталитическом сайте. Известно, что общий механизм гликозилгидролаз включает два остатка глутаминовой кислоты, один из которых служит общей кислотой/основанием, а другой - нуклеофилом, который стабилизирует оксазолиниевый промежуточный продукт или служит в качестве активирующего основания в инвертирующих ферментах [130]. В семействе GH18, используется субстрат-связывающий механизм действия. Кислород N-ацетильной группы субстрата играет роль нуклеофила, в то время как высококонсервативный остаток глутаминовой кислоты, расположенный над цилиндром TIM, протонирует гликозидный кислород и инициирует разрушение гликозидной связи [131].

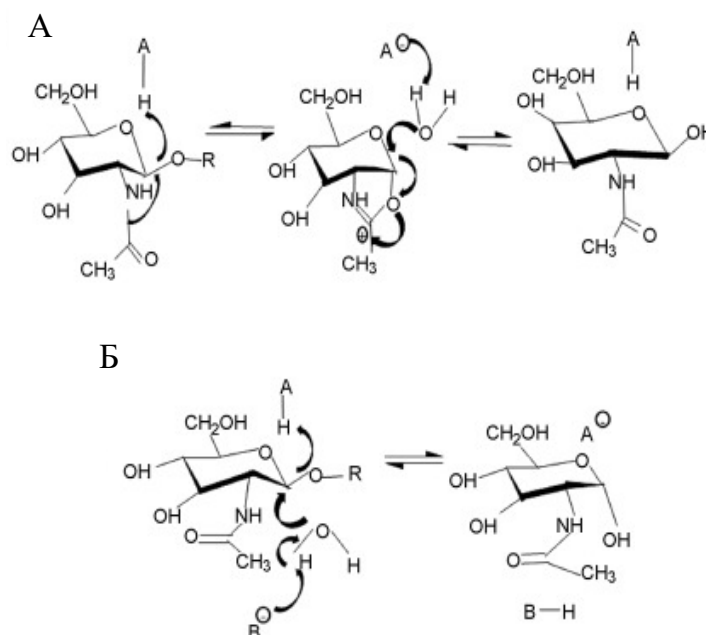


Рисунок 12 -Механизм гидролиза гликозидных связей в хитине (А) Механизм гидролиза хитиназами GH18. Гидролиз идет в два этапа 1) Гликозидный кислород сначала протонируется каталитической кислотой, в то время как каталитическим нуклеофилом выступает кислород N-ацетильной группы субстрата. Гликозидно-ферментный промежуточный комплекс гидролизруется молекулой воды, в результате образуется продукт, в котором сохраняется номерная конфигурация углерода в субстрате. (Б) Механизм гидролиза хитиназами GH19. Протонирование гликозидного кислорода кислотным остатком происходит одновременно с активацией молекулы воды каталитическим основанием, таким образом давая продукт с обратной конформацией, отличной от субстрата [132]

Хитиназы GH19 используют классический инвертирующий механизм (Рисунок 12Б), гидролизуя гликозидные связи посредством одностадийного, общего, кислотно-основного катализа, предположительно с участием двух остатков глутаминовой кислоты на противоположных сторонах каталитической щели, один из которых действует как донор протонов, а другой как нуклеофил. Два остатка глутаминовой кислоты, участвующие в гидролизе хитина, консервативны в хитиназах GH19, однако расстояния между ними варьируются. В хитиназах GH19 из бактерий а/к остатки глутаминовых кислот расположены ближе из-за отсутствия петли из 13 а/к, присутствующих в хитиназах GH19 из растений [133].

3.3.9 Применение хитиназ в сельском хозяйстве

Разнообразные характеристики хитиназ, такие как: наличие и взаимное расположение множественных доменов [134,135], разнообразие в архитектуре каталитических центров [136,137], различная процессивность ферментов [138,139],

различия в механизмах гидролиза или трансгликозилировании [140], затрудняет выбор хитиназ и обоснование их использования в конкретных практических приложениях. Например, процессивный *SmChiB* может быть полезен при гидролизе хитина, *SpChiD* может быть более подходящей для синтеза длинноцепочечных хитоолигосахаридов, а *Chit42* из *Clonostachys rosea* может использоваться как средство биоконтроля нематод [141]. Другими словами, не существует универсального подхода к подбору и применению хитиназ в биотехнологических целях.

Анализ и сопоставление эффективности применения хитиназ между лабораторными и полевыми прикладными экспериментами может быть обременительным и в конечном итоге, может привести к нестабильным и неудовлетворительным результатам применения [142]. Такие переменные, как природа субстратов, pH и температура, а также индукторы и ингибиторы в отношении конкретных хитиназ должны быть хорошо изучены для оптимизации эффективности хитиназ для практического применения. Имеются данные о том, что аллозамидин, кофеин и арганин являются мощными ингибиторами хитиназ семейства 18 [129]. Однако известно, что хитиназы семейства 19 не подвержены действию этих ингибиторов, поэтому они более предпочтительны для применения в сельском хозяйстве. Более глубокое знание этих характеристик позволит преодолеть сложности в разработке эффективных хитинолитических систем, эффективных в различных областях биотехнологии.

В сельском хозяйстве, фунгицидные свойства хитиназ, предлагается использовать для борьбы с вредителями и грибковыми заболеваниями растений. Ранее сообщалось о подавлении роста грибковых фитопатогенов, таких как *Trichoderma reesei* [143], *Colletotrichum gleosporoides* [144], *Phoma medicaginis* [145], *Rhizoctonia solani* [146], *Fusarium oxysporum* и *Fusarium graminearum* [147].

Доказано, что хитиназы GH19 обладают более сильными фунгицидными свойствами против грибных фитопатогенов, чем хитиназы GH18, что было продемонстрировано в работе Каваси [148]. Интересно отметить, что хитиназы класса I с дополнительным ChBD показали ингибирование роста патогенов в ~ 5 раз эффективнее, чем хитиназы класса II, у которых отсутствует дополнительный ChBD домен [149]. Аналогично, хитиназа класса I из семян ржи, которая эффективно ингибирует рост *T. reesei*, эффективнее, чем кислая хитиназа класса II того же вида, но без ChBD домена [150].

Кроме того, фунгицидные свойства хитиназ зависят от вида фитопатогена и иногда не проявляют их по отношению к некоторым видам. Это факт был доказан с помощью анализа ингибирования роста патогенов на трансгенных растениях, сверх-экспрессирующих хитиназы GH19 [151]. Скорее всего явление ингибирования роста мицелиальных и нефиламентозных грибов связано с различными паттернами воздействия хитиназы на фитопатогены. Карсинк и др. [152] сообщали, что хитиназа из *Streptomyces* не проявляла никаких фунгицидных свойств против *Candida albicans* при этом зафиксировано ингибирование всех протестированных нитчатых грибов. Хитиназа ячменя, которая была протестирована против 15 фитопатогенов растений, ингибировала только шесть, включая *Botrytis cinerea*, *Pythium theae*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria* sp., *Curvularia lunata* и *R. solani*. Никаких ингибирующих эффектов против остальных девяти видов (*Fusarium solani*, *Colletotrichum falcatum*, *C. gleosporoides*, *Magnaporthe grisea*, *Sarocladium oryzae* и *Macrophomina phaseolina*, *Cylindricoladium scoparium*, *Pestalotia theae*) не зарегистрировано [153].

Сообщалось о разнообразных противогрибковых свойствах рекомбинантной хитиназы риса, который эффективно ингибирует *Rizopus stolonifer* и *Botrytis squamosa*, но не оказывает значительного воздействия на *Aspergillus niger* и *Pythium aphanidermatum*. Эти различия в противогрибковых свойствах хитиназ можно объяснить также и разнообразным составом хитина у разных видов грибов [154]. Еще одной причиной может являться структура клеточной стенки и доступность хитиновых цепей в КСГ.

Учитывая неизбежную потребность в новых и более безопасных альтернативных средствах биоконтроля с широким спектром активности против различных фитопатогенов растений, хитиназы были и остаются одними из самых перспективных БСЗР, обладающих рядом преимуществ в сравнении с химическими фунгицидами.

Таким образом, в работе было предложено провести исследование свойств новой хитиназы из растения-хищника *Drosera capensis*. Суммируя литературные данные, приведенные выше, новая хитиназа, относящаяся к 19-ому семейству гликозил-гидролаз, должна обладать фунгицидной и гидролитической функцией, что определяет ее биотехнологическую значимость как нового компонента БСЗР.

IV. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1 Материалы

4.1.1 Штаммы микроорганизмов

Для клонирования ДНК использовали штамм *Escherichia coli MachI* (*hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)_{U169} (m80*lacZ* Δ M15) (Thermo Fisher Scientific, США).

Для экспрессии рекомбинантных белков использовали штаммы:

E. coli BL21(DE3), *E. coli Arctic Express (DE3)* (*F*⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ *Tet*^r *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*cpn10 cpn60 Gent*^r]) (Agilent, США)

E. coli BL21(DE3) Rosetta-gammi 2 (Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* (DE3) *F'*[*lac*⁺ *lacIq pro*] *gor522::Tn10 trxB pRARE2* (*CamR, StrR, TetR*)) (Novagen, США).

Для экспрессии рекомбинантной хитиназы GH18 использовали лабораторный штамм *Penicillium verruculosum* Chi403, полученный ранее.

Для создания дрожжевых продуцентов хитиназ 19-ого семейства использовали штамм *Pichia pastoris GS115* (*His4*) (Thermo Fisher Scientific, США).

4.1.2 Реагенты

Все используемые в работе реактивы имели чистоту «хч», «осч» и «Analytical grade».

Для создания сред для культивирования микроорганизмов были использованы следующие соли и компоненты: глюкоза, пептон, дрожжевой экстракт, агар, KН₂РO₄, ZnSO₄×7H₂O, K₂HPO₄, FeSO₄×7H₂O, MnSO₄, MgSO₄×7H₂O, CuSO₄ и CaCl₂ (Химмед, Россия). Антибиотики: гентамицин, ампициллин, хлорамфеникол, Зеоцин (Thermo Fisher Scientific, США).

Ферментативные активности рекомбинантной хитиназы определяли по следующим субстратам: коллоидный хитин, приготовленный по методике (п. 4.2.16) из хитина креветки (Sigma, США) и кристаллический хитин (Sigma, США).

Для работы с РНК и ДНК применяли следующие реактивы, наборы и ферменты:

Для экстракции генетического материала: цетилтриметиламмоний-N-бромид (ЦТАБ), поливинилпироллидон (ПВП) степень полимеризации 40 000, трис-основание, β -меркаптоэтанол (β -Me), NaCl, спирт этиловый, спирт изопропиловый, фенол, хлороформ,

спирт изоамиловый, ацетат натрия, этидиум-бромид (10 мг / мл), агароза, борная кислота, ЭДТА, соляная кислота.

Экстракцию плазмидной ДНК, продуктов ПЦР и элюции генетического материала из агарозных гелей здесь и далее производили наборами QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit и QIAGEN Plasmid mini Kit (QIAGEN, Германия).

T4 ДНК-полимераза (5 ед/мкл), T4 ДНК лигаза, T4 полинуклеотид-киназа (10 ед/мкл) (Thermo Fischer Scientific, США), Taq-полимераза (5,0 ед/мкл) (Thermo Fischer Scientific, США), эквимоллярная смесь четырех dNTP (10мМ) (Thermo Fischer Scientific, США), рестрикционные ферменты: *XbaI*, *XhoI*, *KpnI*, *ApaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *NdeI*, *NotI*, *NcoI* (Thermo Fischer Scientific, США), все ферменты использовались вместе с комплектными буферами.

Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице проводили с использованием набора MMLV RT KIT (Евроген, Россия).

Для количественной ПЦР в реальном времени использовали готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Синтол, Россия).

Реактивы для белкового электрофореза: акриламид 4К (AppliChem, США), бис-акриламид тетраметилэтилендиамин (TEMED), уксусная кислота, спирт этиловый, кумасси бриллиантовый голубой R (Sigma, США), белковые маркеры для электрофореза (Thermo Fischer Scientific, США).

Олигонуклеотиды для ПЦР были синтезированы фирмой ООО «Синтол» (Россия).

4.1.3 Среды для культивирования

Штаммы *E.coli* для субклонирования культивировались на среде Лурия- Бергани (таблица 3)

Таблица 3 – состав среды LB

Компоненты	г/л
Пептон микробиологический	10
Дрожжевой экстракт	5
NaCl**	10

*рН 7.0± 0.2

** 5 г/л при селекции на зеоцине

Культивирование экспрессионных штаммов *E.coli* проводилась на богатой среде ТВ (Terrific broth) (таблица 4)

Таблица 4 – состав среды ТВ

Компоненты	г/л
Пептон микробиологический	12.0
Дрожжевой экстракт	24
K ₂ HPO ₄	9.4
KH ₂ PO ₄	2.2
Глицерин	5.0

*pH 7,2 ± 0.2

Культивирование штамма *Penicillium verruculosum* Chi403 осуществлялось на богатой среде стандартной ферментационной среде (таблица 5).

Таблица 5 – состав стандартной ферментационной среды

Компоненты	г/л
Целлюлоза микрокристаллическая (MicroCell, Бразилия)	40
Пшеничные отруби	10
Дрожжевой экстракт	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	10
CaCl ₂ ×2H ₂ O	0.3
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.3

Поддержание штаммов, скрининг и первичная ферментация *P. pastoris* осуществлялась на среде YPD.

Таблица 6 – среда YPD

Компоненты	г/л
Дрожжевой экстракт	10
Пептон мясной ферментативный	20
K ₂ HPO ₄	9.4
KH ₂ PO ₄	2.2

Ферментация *P. Pastoris* осуществлялась на двух типах сред BMMG и MM (таблица 7 и 8).

Таблица 7 – состав среды MM

Компоненты	г/л
Фосфорная кислота	30
Фосфат аммония двузамещенный	5
Хлорид калия	9.5
сульфат магния*H ₂ O	7.6
Гидроксид калия	2.6
Глицерин	40

* pH среды доводится до pH 5.0 раствором аммиака (20%)

Таблица 8 –состав среды BMMG

Компоненты	г/л
Дрожжевой экстракт	10
Пептон мясной ферментативный	20
K ₂ HPO ₄	9.4
KH ₂ PO ₄	2.2
YNB	1.34
Глюкоза	40

4.2 Методы

4.2.1 Получение биоматериала растений

Растения *Drosera capensis*, получали из стерильных семян *in vitro* на базальной среде ½ MS, дополненной 2% сахарозы и 0,8% агара [155]. Саженьцы были выращены при 25 ± 2 °С. Продолжительность световых суток была 16 ч при интенсивности освещения 50 лк. Для работы использовались растения возрастом 8 недель [103].

4.2.2 Выделение геномной ДНК из *D.capensis*

В жидком азоте измельчали 100 мг листьев *D.capensis*, после чего порошок переносили в нагретый до 60°C лизис буфер (2% ЦТАБ, 1.5 М NaCl, 2% 2-меркаптоэтанол, 4% ПВП 15к, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM ЭДТА pH 8.0) и инкубировали 10 минут. Полученный раствор центрифугировали (14 000 g, 10 минут при 4°C). Супернатант переносили в чистую пробирку, вносили равный объем хлороформа и перемешивали встряхиванием, после чего центрифугировали (14 000g, 100 минут при 4°C). К супернатанту добавляли 3 объема этанола и 0,1 объем 3М ацетата натрия (pH 4,5). Раствор инкубировали при -80°C в течение двух часов и центрифугировали (14 000g, 30 минут при 4°C). Супернатант удаляли, а осадок перерастворяли в 200 мкл воды.

Для отделения РНК от ДНК, в получившийся раствор вносили 10М LiCl до конечной концентрации 2.5 М, инкубировали при -80°C в течение двух часов и центрифугировали (14 000g, 10 минут при 4°C). Получившийся осадок РНК трехкратно промывали 70% этанолом, растворяли в 50 мкл воды и обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный раствор очищенной РНК использовали для создания библиотеки кДНК.

Качество и количество полученных препаратов РНК определяли электрофоретически (в 1% агарозном геле), а также по соотношению поглощения 260/280 нм и 260/230 нм на спектрофотометре Nanodrop ND-1000, LabTechInternational, UK).

Супернатант, полученный после стадии осаждения с хлоридом лития, отделяли и вносили 3 объема этанола и 0,1 объем 3М ацетата натрия (pH 4.5). Раствор инкубировали при -80°C в течение двух часов и центрифугировали (14 000g, 30 минут при 4°C). Супернатант удаляли, а осадок трехкратно промывали 70% раствором этанола, растворяли в 50 мкл воды и обрабатывали смесью РНКаз А/Т1 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный раствор ДНК использовали как матрицу для клонирования целевого гена *Chit19* по методу TAIL-PCR (пункт 4.2.7 Материалов и методов) [103].

4.2.3 Выделение геномной ДНК дрожжей

Выделение ДНК из дрожжей проводилась в соответствии с методикой предложенной Marko Lõoke [156]. 100 микролитров ночной культуры дрожжей осаждали центрифугированием 14000 об/мин и ресуспендировали в 100 мкл 200 мМ LiOAc с добавкой 1% раствора SDS. Раствор инкубировали при 70°C в течение 15 минут. После инкубации добавляли 300 мкл 96% этанола, образцы встряхивали и центрифугировали 10 минут при 4°C. Осажденную ДНК растворяли в 100 мкл TE, нерастворившийся осадок отделяли центрифугированием (14000 об/мин в течение 1 мин) и 1 мкл супернатанта использовали в качестве матрицы для ПЦР.

4.2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для проведения рутинной ПЦР использовали Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) 10X Taq Buffer с (NH₄)₂SO₄ (Thermo Fisher Scientific, США), раствор 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, США).

ПЦР проводили в следующих условиях: 95°C – 10 сек; 55°C - 30 сек; 72°C - 1,5 мин (температуры отжига и время элонгации менялись в пределах 50-65°C и от 1 до 4 минут - в зависимости от олигонуклеотидной последовательности и размера целевого продукта) [93].

Для проведения высокоточной ПЦР использовали Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США).

ПЦР проводили в следующих условиях: 98°C – 7 сек; 55°C – «5-150» сек; 72°C – «15-150» сек (температуры отжига и время элонгации менялись в зависимости от олигонуклеотидной последовательности и размера целевого продукта) [93].

4.2.5 Дизайн олигонуклеотидов для ПЦР

В ходе работы был сконструирован ряд олигонуклеотидов, необходимых для получения полноразмерных последовательностей хитиназ, проведения полуколичественной оценки уровня транскрипции и анализа копийности генов в геноме штаммов продуцентов. Дизайн и анализ олигонуклеотидов осуществляли с помощью ПО Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) [93].

4.2.6 Проведение полуколичественной ПЦР

Уровни экспрессии и количество копий гена в геноме определяли полуколичественной ПЦР с использованием ген-специфичных олигонуклеотидных последовательностей и последовательностей референсным генам: актин, 18S рРНК, промотор алкоголь оксидазы I (AOX1), промотор глицеральдегид – 3 фосфат дегидрогеназы (GAP), дисульфидизомеразы (PDI). Реакцию проводили в следующих условиях: 95°C – 4 мин; 95°C – 30 сек; 55°C – 1 мин; общее число циклов – 45.

Реакционная смесь (10 мкл для каждого образца) включала в себя: 1 мкл taq-буфера (x10); 0,2 мкл 10 mM dNTP (Евроген, Россия); 0,1 мкл Taq-полимеразы (Евроген, Россия); 1 мкл смеси специфических олигонуклеотидов (таблица 9), концентрация каждого в исходной смеси равна 10 мкмоль; 100 нг соответствующей матрицы [93].

Таблица 9 – Праймеры для проведения полуколичественной ПЦР

Название	Последовательность 5'→3'
GAPF	TACGTTGCGGGTAAAACGGA
GAPR	CCGCTATTATTGCCAGCGAC
pAOXF	GAATGCAACAAGCTCCGCAT
pAOXR	CAGTTTTGGGCCATTTGGGG
18S rDNAF	TTGATAGGGCAGAAATTTGAATGAACC
18S rDNAR	ACAAGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCT
ActinF	ACACAGTGTTCCCATCGGTC
ActinR	TTGGATTGAGCCTCGTCACC
PDI(RT)F	GCCGTTAAATTTCGGTAAGCA
PDI(RT)R	TCAGCTCGGTCACATCTTTG
ChitSint(RT)R	AGGCATACGGACCATCAGGAG
ChitSint(RT)F	ACTGGTGACATCAACACTC

Все системы обеспечивали специфическую амплификацию целевых генов с эффективностью 100±2% длиной не более 150 п.о.

4.2.7 TAIL-ПЦР

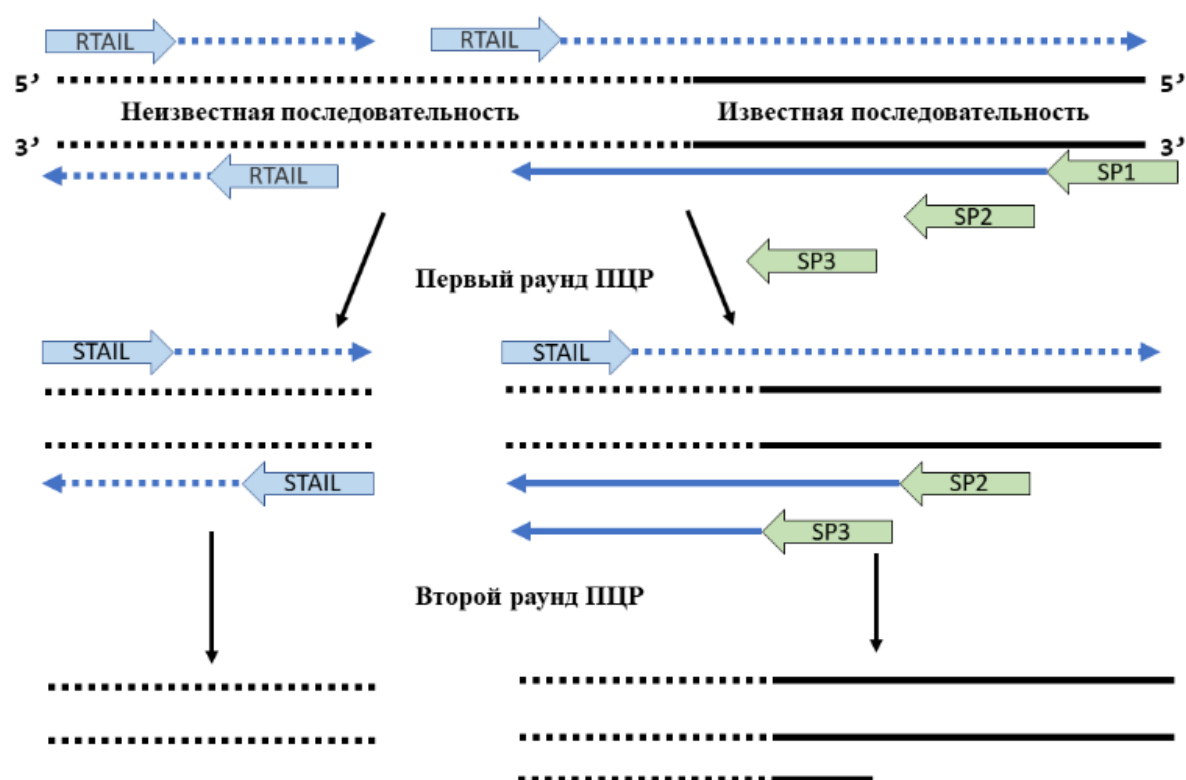
Для реконструкции полной структуры гена, необходимым является прочтение 3'- и 5'- концевых участков, фланкирующих известную область. Для этой задачи

использовалась методика TAIL-ПЦР [157] Для этого были синтезированы три олигонуклеотида, отжигающиеся на известный участок гена друг за другом и два случайных олигонуклеотида (RTAIL1 и RTAIL2, таблица 10), на концы которых была добавлена короткая последовательность (STAIL, таблица 10).

Таблица 10 – Специфичные олигонуклеотиды для клонирования гена *chit19* из *D.capensis* методом TAIL-ПЦР

Название	Последовательность 5'→3'
RTAIL1	GACACGTGAGCATGCAWNNWNHCCAG
RTAIL2	GACACGTGAGCATGCAYNINYVGCTC
STAIL	GACACGTGAGCATGCA
TagChitF1	GTGATGTYAGCTCCATCATAACTTCTCARATCTTCAACCA
TagChitF2	GAACGACAATGCTTGTCCTGCTAATGGGTTCTACT
TagChitF3	GAAACAGCGATATGGTTTTGGATGACGCCTCAA
TagChitR1	CCTTGAGGCGTCATCCAAAACCATATCGCTGTTT
TagChitR2	TGGTTGAAGATYTGAGAAGTTATGATGGAGCTRACATCA
TagChitR3	TGTGACTTGGTGAAGTTTAAAGGATACATGGGGTCTAT

Метод состоит из трех основных этапов (рисунок 13).



Первый этап включает в себя две основные стадии: 1L (линейная) и 1E (экспоненциальная). Для стадии 1L, готовили 20 мкл ПЦР смеси, содержащей 20 мкл

Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США), 100 пмоль праймера TagChitF1 (или TagChitF3) и 200 нг геномной ДНК. Условия проведения ПЦР реакции приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – температурный профиль амплификации генов методом TAIL-ПЦР

Этап	Стадия	Олигонуклеотиды	Условия ПЦР
I	I L	TagChitF1 или TagChitR1	98°C - 10 с., 62°C - 5 с., 72°C - 30 с.; 20 циклов
	I E	RTAIL1 RTAIL2	98°C - 10 с., 25°C - 5 с., 72°C - 45 с.; 1 цикл 98°C - 10 с., 60°C - 7 с., 72°C - 45 с.; 18 циклов
II	II L	TagChitF2 TagChitR2	98°C - 10 с., 62°C - 5 с., 72°C - 45 с.; 20 циклов
	II E	TagChitF3 TagChitR3	98°C - 10 с., 68°C - 7 с., 72°C - 45 с., 98°C - 10 с., 63°C - 7 с., 72°C - 45 с. 98°C - 10 с., 45°C - 7 с., 72°C - 45 с.; 7 циклов
III	III E	TagChitF3 TagChitR3 и STAIL	98°C - 10 с., 68°C - 7 с., 72°C - 45 с., 98°C - 10 с., 63°C - 7 с., 72°C - 45 с. 98°C - 10 с., 45°C - 7 с., 72°C - 45 с.; 13 циклов

Продукт реакции, содержащий на 5'- или 3'- конце целевой участок гена, разбавляли в 100 раз и использовали в качестве матрицы для стадии 1Е. В ПЦР смесь добавляли случайные олигонуклеотиды RTAIL1 и RTAIL2 и производили амплификацию. На этой стадии первичный отжиг осуществлялся при низкой температуре, что позволяло случайным олигонуклеотидам эффективно отжигаться на матрице [93].

На втором этапе осуществляли стадию IIL, используя праймер TagChitF2 (или TagChitR2, в случае восстановления 5'- конца). Полученный продукт разбавляли в 100 раз и использовали как матрицу для дальнейшей реакции. В экспоненциальной стадии IIE использовали 10пМ праймера STAIL и 10пМ праймера TagChitF2 (TagChitR2). Температурный профиль имел две ступени: с высокой температурой отжига (68-63°C), где происходит отжиг ген-специфичного праймера, и одну с низкой (45°C), позволяющей отжигаться праймеру STAIL. Данный температурный профиль сдвигает баланс в сторону образования специфического продукта содержащего последовательность целевого гена. Продукт реакции разбавляется в 10 раз и используется как матрица для III этапа [158].

Этап III состоит из одной стадии и в нем использовали пару TagChitF3 (TagChitR3) и STAIL (10 пМ каждого праймера). На данном этапе происходит обогащение ПЦР смеси специфичным продуктом, содержащим 3'- или 5'- фрагмент целевого гена и фланкирующую область. Продукты реакции разделяли в агарозном геле и секвенировали по методу Сэнгера в компании ООО «Синтол» (Россия) [93].

4.2.8 Биоинформатический анализ

Для работы с генетическими последовательностями использовали программное обеспечение CLC main workbench (Германия) (<https://digitalinsights.qiagen.com/>) и Snapgene (США) (<https://www.snapgene.com>). Предсказание экзон-интронной структуры осуществили на онлайн-сервере AUGUSTUS (<http://bioinf.uni-greifswald.de/webaugustus/>). Предсказание последовательности сигнального пептида, сайтов гликозилирования при помощи SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Предсказание дисульфидных связей осуществлялось на серверах программного обеспечения DISULFIND. Моделирование пространственной структуры осуществлялась при помощи программного обеспечения PyMOL (<https://pymol.org>). Для анализа адекватности созданной модели, выполнялось построение карты Рамачандрана при помощи программного обеспечения PROCHECK [159].

4.2.9 Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводился на масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker, Германия) на базе Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН. Обработку белковых масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (BrukerDaltonics, Германия). Идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Для этого, используя опцию «пептидный фингерпринт», провели поиск в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI, считали определенными надежно (p50 считали вероятными. С использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 (BrukerDaltonics, Германия) проводили поиск по объединенным MS+MS/MS результатам.

4.2.10 Синтез кДНК и амплификация гена *chit19*

Первая цепь кДНК была синтезирована с использованием Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific, США), согласно инструкции производителя. Библиотеку кДНК синтезировали из одного микрограмма тотальной РНК с использованием (dT₁₈) олигонуклеотидов.

Используя полученные библиотеки кДНК, амплифицировали полноразмерную последовательность *Chit19* при помощи Phusion PCR mix и генспецифичных олигонуклеотидов (таблицы 12 и 13).

Таблица 12 – Ген-специфичные олигонуклеотиды для амплификации полноразмерной хитиназы *Chit19* и хитиназы без хитинсвязывающего домена *Chit19dChBD*

Название	Последовательность 5'→3'
Chit_Dr-Lic5	TACTTCCAATCCATGatgaggattactgtcttgctattgc
Chit_Dr-Lic3	TATCCACCTTTACTGctaagaaaaaggacgctgattatagc
Chit_DrChBD-Lic5	TACTTCCAATCCATGatgggtggcagctctccaccaccagc
Chit_Dr-Lic3	TATCCACCTTTACTGctaagaaaaaggacgctgattatagc

Таблица 13 – Температурный профиль ПЦР реакции амплификации *Chit19*

Этап	Температура	Время
Предварительная денатурация	98	30'
Денатурация	98	5'
Отжиг	60	10'
Элонгация	72	1''
Финальная элонгация	72	5''
Циклы	25	

4.2.11 Создание мутантных форм хитиназ

Для введения мутаций использовали следующие олигонуклеотиды (таблица 14)

Таблица 14 – олигонуклеотиды для мутации остатков цистеинов и глутаминовых кислот в последовательности хитиназы

Название	Последовательность 5'→3'
1	2
ChitCap_3'End_rew	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT
ChiCap_3305C-T_fwd	ACCAGAGATACACAAGCATTATG
ChiCap_305C-T_rew	CATAATGCTTGTGTATCTCTGGT
ChiCap_250C-S_fwd	CAAGCCCTCAAGCCATGCTGTCGCCA

Продолжение таблицы 14

1	2
ChiCap_250C-S_rew	TGGCGACAGCATGGCTTGAGGGCTTG
ChitCap_210C-A_fwd	ACTATGGGCAAGCCGGCGCTGCCA
ChitCap_210C-A_rew	TGGCAGCGCCGGCTTGCCCATAGT
ChitCap E130G_F	AGCCACCAGTGGTCCCGTGGCTCGTCTGAC
ChitCap E130G_R	GGGACCACTGGTGGCTGGCCCACT
ChitCap E152G_F	TTGCCTTGCCCCTGTTTGAAGCAGTAG
ChitCap E152G_R	CAGGGGCAAGGCAATCCTG

Мутации вводились с использованием протокола QuikChange (Agilent, США). К ПЦР-смеси после амплификации добавляли 1 мкл рестрикционного фермента Dpn I (10 Ед / мкл) и инкубировали при 37° С в течение 1 часа для расщепления родительской (т.е. немутантной) суперспиральной ДНК. 5 мкл смеси использовали для трансформации в *E.coli MachI* по стандартному протоколу. Выделенные плазмиды секвенировали по методу Сэнгера в обоих направлениях.

4.2.12 Получение экспрессионных плазмид pNIC_Chit19 и pNIC_Chit19ΔChBD

ПЦР-продукт, который соответствовал последовательности гена *Chit 19*, клонировали методом независимого лигирования в вектор pNIC28-Bsa4 [160]. Для этого ПЦР-продукт и вектор подвергали обработке Т4-ДНК полимеразой (Thermo Fisher Scientific Inc, США) в присутствии dTTP и dATP соответственно, для генерации «липких» концов. Концентрацию ПЦР-продукта и вектора определяли на спектрофотометре NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, США) при длине волны 260 нм. Далее, обработанный ПЦР-продукт лигировали в вектор, для этого смешивали 50 нг вектора и 150 нг ПЦР-продукта. Смесь инкубировали при 22 °С в течение 30 мин, а затем инкубировали 30 мин при 80 °С для инактивации Т4-ДНК полимеразы. Полученные плазмиды трансформировали в компетентные клетки *E. coli MachI* по стандартной методике [161]. Для скрининга бактериальных колоний использовали Taq-полимеразу. Скрининг бактериальных колоний проводили по стандартной методике, рекомендованной фирмой-производителем [162].

Культивирование клеток, отобранных после скрининга, проводили в жидкой среде LB с добавлением ампициллина 100 мкг/мл при 37 °С 200 об/мин в течение 12-16 часов. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Германия).

Выделенные плазмиды секвенировали по Сэнгеру (работы выполнены ООО «Синтол») в обоих направлениях для определения соответствия полученной и искомой последовательности. Мутаций, делеций, инсерций обнаружено не было. Получены две плазмидные конструкции: pNIC_Chit19 и pNIC_Chit19dChBD (рисунок 14).

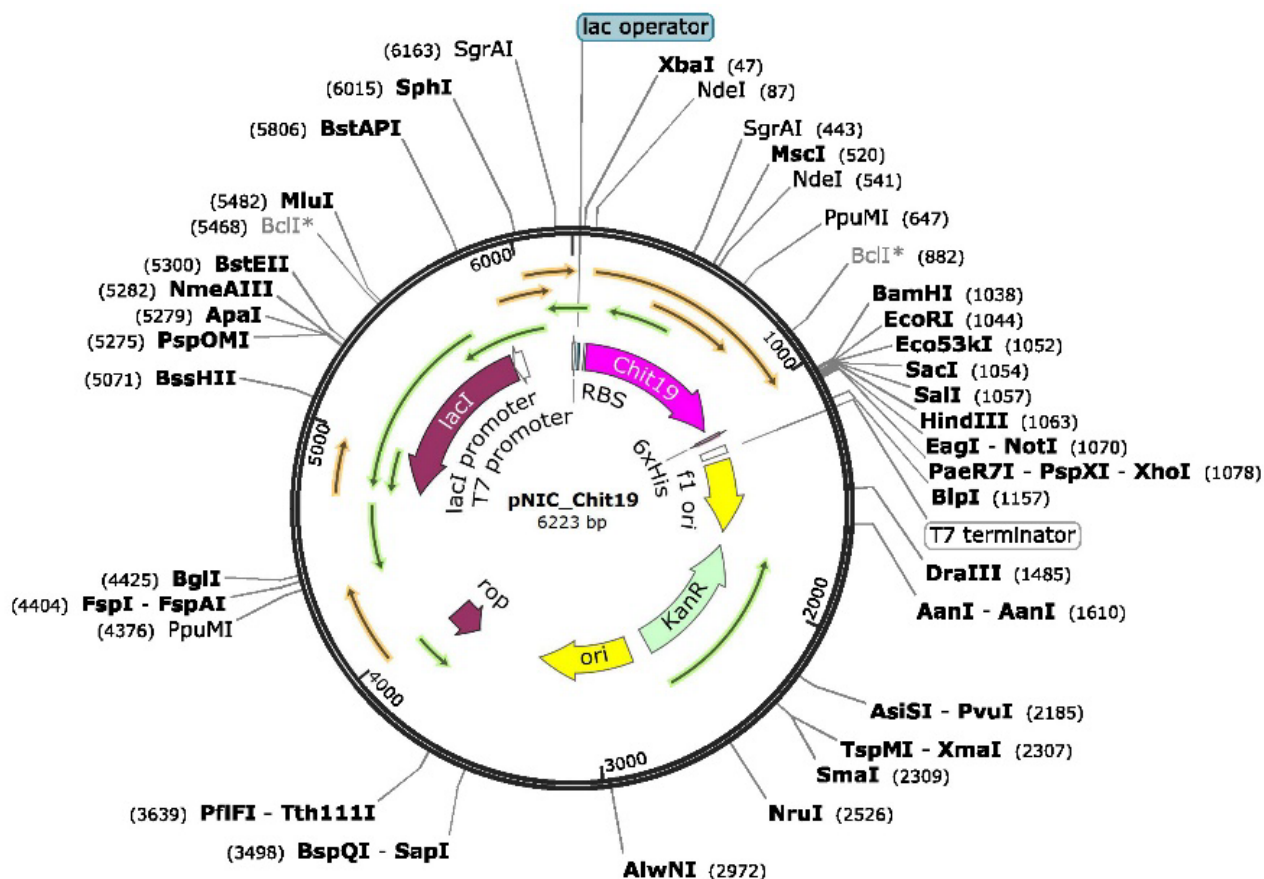


Рисунок 14 – схемы плазмидного вектора pNIC28_Chit19

4.2.13 Трансформация и экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*

Получение штаммов продуцентов рекомбинантной хитиназы осуществляли путем трансформации плазмидной ДНК в клетки *E. coli Arctic express (DE3)* (Agilent, США) и *E. coli Rosetta-gammi 2* (Novagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для наработки рекомбинантного белка одна колония штамма продуцента переносилась петлей в 5 мл жидкой среды LB, дополненной 50 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Клетки выращивались в течение 12-16 ч в пробирке при 30 °С. Затем свежая среда ТВ (100 мл, мкг/мл канамицина) была засеяна ночной культурой с разбавлением 1:100, которая далее подрачивалась до OD600 = 0,3. Далее в среду был добавлен 0,01-1мМ IPTG. Последующее инкубирование велось при температуре 10-35°С в течение 24 часов. Уровень экспрессии и растворимость белка определяли путем Na-SDS-PAGE электрофореза.

4.2.14 Выделение телец включения из биомассы *E.coli*

После культивирования *E.coli*, 100мл культуральной среды, центрифугировали и клетки ресуспендировали в 10 мл буфера (50 mM Трис-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF). Суспензию клеток разрушали ультразвуком (5 × 30 с) охлаждая на льду. Лизат бактерий центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин при 4° C, супернатант и осадок отделяли и идентифицировали денатурирующим геле-электрофорезом в полиакриламидном геле. Результаты показали, что обе формы фермента выражены в виде телец включения в осадке. Осадок пять раз промывали 5 мл буфера (50 mM Трис-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl и 2M мочевины) для максимального удаления белков *E. coli*. Тельца включения осаждали в течение 15 минут при максимальных оборотах в минуту, супернатант удаляли. Осадок растворяли в 5 мл буфера для денатурации (50 mM Трис-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 8 M мочевины, 1 mM ЭДТА и 20 mM DTT) в течение 2 часов при 40° C. Раствор центрифугировали 15 минут на максимальной скорости. Концентрация белка в супернатанте определялась по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм.

4.2.15 Рефолдинг хитиназы GH19

Основной буфер рефолдинга состоял из 50 mM Трис-HCl, pH 8.5 и 200 mM NaCl, который был дополнен следующими добавками: сахароза 0-5%, аргинин 0-5 M, глицерин 0-15%. В работе использовали цистин/цистеин, окисленный глутатион (GSSG)/восстановленный глутатион (GSH) и добавку 2-меркаптоэтанола в качестве добавок для «переборки» дисульфидных связей. Использование детергентов также может снизить агрегацию белков, поэтому был протестирован эффект Triton 100X, Tween 20 и лаурилсаркозина натрия. Эффективность рефолдинга оценивали по двум параметрам: выходу растворимой формы фермента и его активности. На первом этапе оценивали действие отдельных добавок, после чего оценивали синергизм наиболее эффективных из них. После выбора оптимального буфера для рефолдинга были протестированы различные методики удаления хаотропного агента из раствора денатурированной хитиназы.

4.2.15.1 Рефолдинг диализом

Один миллилитр раствора хитиназы (2 мг / мл) в денатурирующем буфере (8 M мочевины, 50 mM Трис-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl) диализовали против денатурирующего буфера, в котором концентрация мочевины постепенно снижалась каждые 2 часа

(мочевина концентрация 6, 4, 2, 1 и 0,5 М соответственно) при 4°C. После этого проводили диализ против буфера рефолдинга, который не содержал мочевины в течение 24 часов. Далее полученный раствор центрифугировали. Полученный раствор центрифугировали на максимальной скорости от осадка и диализовали еще 24 часа против 20 мМ Na-ацетатного буферного раствора pH 5.0 содержащего 5% глицерина.

4.2.15.2 Рефолдинг быстрым разбавлением

Один миллилитр раствора хитиназы в денатурирующем буфере (2 мг/мл) охлаждали до 4° С и быстро добавляли к охлажденному буферу для рефолдинга при интенсивном перемешивании. Смесь инкубировали 4 часа, отделяли от осадка центрифугированием при максимальной скорости 15 минут. Полученный раствор центрифугировали на максимальной скорости от осадка и диализовали 24 часа против 20 мМ Na-ацетатного буфера pH 5, содержащего 5% глицерина.

4.2.15.3 Рефолдинг на Ni-NTA-сефарозе

Один мл Ni-NTA-сефарозы добавляли к 1 мл раствора хитиназы (концентрация белка 2 мг / мл) в денатурирующем буфере и осторожно перемешивали в течение 30 мин при 4 ° С. Адсорбированный белок промывали денатурирующим градиентным буфером мочевины (6, 4, 2, 1 и 0,5 М) и элюировали из агарозы Ni-NTA в градиенте буфера для элюирования (50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол). Фракции элюирования (6 x 0,5 мл) объединяли. Полученный раствор центрифугировали на максимальной скорости от осадка и диализовали 24 часа против 20 мМ Na-ацетатного буфера pH 5.0, содержащего 5% глицерина.

4.2.16 Получение коллоидного хитина и определение хитиназной активности

Коллоидный хитин получали из хитина креветки (Sigma, США) по модифицированному методу Хсу [163]. К порошку хитина (40 г) медленно добавляли 600 мл концентрированной HCl и выдерживали в течение 60 минут при 30°C и интенсивном перемешивании. Хитин осаждали в виде коллоидной суспензии, медленно разбавляя раствор в 2 л воды при 10°C. Суспензию фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Полученная суспензия использовалась в работе для определения хитиназной активности.

Активность по хитину и хитозану определялась методом, основанном на спектрофотометрической детекции выделяемого в ходе гидролиза N-ацетилглюкозамина. К 120 мкл суспензии коллоидного хитина (10 г/л) подогретого до 55°C добавляли 90 мкл

ацетатного буфера pH 5,0 и 60 мкл ферментного препарата (с концентрацией 1 мг/мл). После чего инкубировали 10 минут и добавляли 900 мкл красящего раствора (0,5 г/л гексацианоферрата (III) калия в 0,5М Na₂CO₃). Смесь инкубировали 15 минут при 100°C, центрифугировали и измеряли оптическую плотность при длине волны =400 нм [164]. Была построена калибровочная кривая по N-ацетилглюкозамину (рисунок 15)

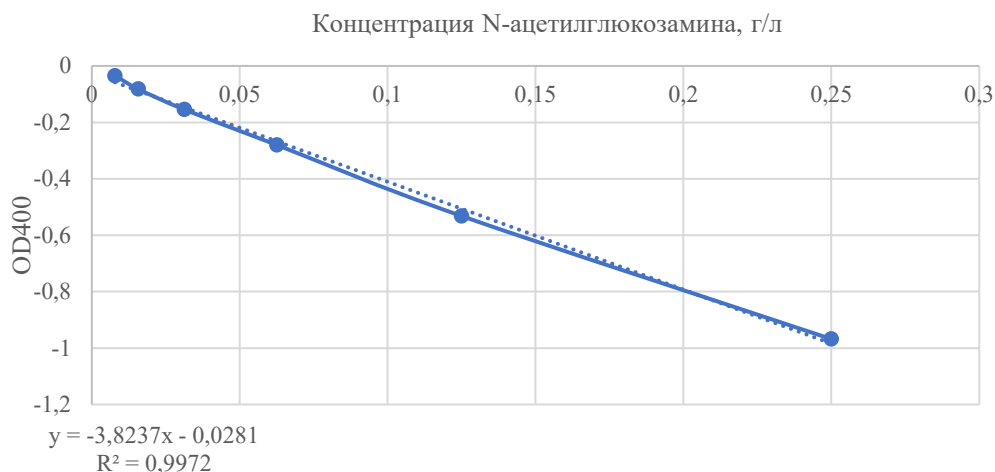


Рисунок 15 – калибровочная кривая по N-ацетилглюкозамину, г/л

Используя коэффициенты, полученные по калибровочной кривой, была получена формула определения активности

$$\text{Активность} \left(\frac{U}{ml} \right) = (OD_{400} + 0,0281) * 5 * D / (0,179 * t) / (-3,8237)$$

где:

OD₄₀₀ - оптическая плотность образца

0,0281 и (-3,8237) – коэффициенты, полученные с калибровочной кривой;

5 – разбавление фермента в реакционной смеси;

t – время реакции;

0,179- молярная масса глюкозамина;

4.2.17 Определение кинетических параметров ферментов

Для измерения стационарной кинетики с коллоидным хитином, к 120 мкл подогретого до 55°C суспензии коллоидного хитина (диапазон концентраций 0,05-10 г/л) и 90 мкл ацетатного буфера pH 5,0 добавляли 60 мкл ферментного препарата (0,5 мг/мл) инкубировали в течении 24 часов, после чего реакционные пробирки центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин. Далее производился анализ активности в каждой точке по протоколу, указанному в п. 4.2.16. Одна единица

ферментативной активности была определена как количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина из коллоидного хитина в течение одной минуты в условиях анализа. Все измерения были выполнены в трех повторности, с отрицательными контролями, включающими смеси без фермента. Результаты были обработаны с использованием уравнения Михаэлиса-Ментена в программном обеспечении Graph-Pad для получения значений K_m и V_{max} .

4.2.18 Трансформация *P.pastoris*

Плазмиды (по 10 мкг каждой) обрабатывали эндонуклеазой рестрикции BamHI (для векторов на базе pGAP) или ApaI (для векторов на базе pPIG) в течении ночи при 37°C, после чего к ДНК добавляли 3 объема этанола и 0,1 объем 3М ацетата натрия pH 5.2, инкубировали 30 минут при -80°C и центрифугировали при 4°C на максимальных оборотах 30 минут, промывали холодным 70% этанолом и подсушивали осадок. ДНК ресуспендировали в 4 мкл H₂O (чистоты Milli Q).

Штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen™) засекали петлей в 4 мл среды YPD и инкубировали в течение ночи на орбитальной качалке при 30°C на скорости 240 об/мин. К 100 мкл ночной культуры добавляли 2.9 мл H₂O, и измеряли OD₆₀₀ против разведённой в 30 раз среды YPD. Ночной культурой засекали 50 мл среды YPD в 750 мл «качалочной» колбе из расчета конечной OD₆₀₀ 0.15-0.2. Колбу инкубировали на орбитальной качалке при 30°C на скорости 240 об/мин до оптической плотности 0.8-1.0 при длине волны 600 нм (4 часа). Культуру клеток переносили в стерильную 50 мл пробирку типа «Falcon» и центрифугировали 5 мин при 4°C и 4000 g. Супернатат удаляли, и клетки ресуспендировали в 10 мл стерильной среды YPD/HEPES (10 мл YPD + 200 мкл 1M HEPES pH=8.0). Добавляли 250 мкл 1 M DTT. Инкубировали суспензию 15 мин при 30°C с перемешиванием. Добавляли 40 мл охлажденного 1M сорбитола и центрифугировали 5 мин при 4°C и 4000g. Ресуспендировали клетки в 50 мл 1M ice-cold сорбитола, определяли оптическую плотность при длине волны 600 нм, и центрифугировали 5 мин при 4°C и 4000 g. Клетки ресуспендировали в 2 мл 1M ice-cold сорбитола и центрифугировали 5 мин при 4°C и 4000g. Клетки тщательно ресуспендировали в 1M ice-cold сорбитоле из расчета 10⁹ клеток на 40 мкл и помещали суспензию в ледяную баню.

К 40 мкл суспензии электрокомпетентных клеток добавляли 4 мкл линейаризованной плазмиды (<10 мкг) и переносили в охлажденную 0.2 см кювету для электропарации. Кювету устанавливали в прибор MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad,

США) и на программе «Рис», производили электропорацию, после чего, добавляли в кювету 1 мл 1М дежяного сорбитола. Инкубировали кювету в термостате 90 мин при 30°C для регенерации клеток. Параметры электропорации в приборе ($V \approx 2$ кВ; $t \approx 3-5$ мс). После инкубации с сорбитолом, парированные клетки высевались на чашки Петри с агаризованной (2%) средой YPDS (YPD с добавкой 1М сорбитола), содержащей антибиотик Zeocin™ 300 мкг/мл, после чего чашки помещались в воздушный термостат 30°C. Спустя 72 часа наблюдали около 300 трансформантов *P. pastoris*, обладающих устойчивостью к антибиотику Zeocin™. Из 300 полученных трансформантов, по 50 шт. для каждой конструкции были рассеяны петлей до отдельных колоний на чашки Петри с агаризованной (2%) средой YPD, содержащей антибиотик Zeocin™ 300 мкг/мл. Чашки инкубировали в воздушном термостате при 30°C 48 часов. Скрининг трансформантов проводили путем культивирования в пробирках на 10 мл среды YPD в течение 36 часов при 30°C и анализа продуктивности путем гель-электрофореза аликвоты культуральной жидкости и оценки интенсивности экспрессии.

4.2.19 Культивирование *P.pastoris* в ферментере объемом 1 литр

Одна колония штамма *P. pastoris*, продуцента хитиназы без ChBD, заседалась в качалочную колбу на 100 мл среды BMMG (раздел 4.1.3 дополненную селективным антибиотиком Зеоцин (300мкг/мл). И выращивалась в течение 16 часов при 32°C и перемешивании 250 об/мин.

Стартовая культура засеивается в 1L-ферментер в среду BMMG с содержанием глюкозы 4% по массе и выращивается до истощения субстрата (определяли по уровню кислорода). После чего, дробно подавали 50% раствор глюкозы до 1% каждые два часа (30°C, сатурация > 30%, корректировка pH осуществлялась серной кислотой и аммиаком). Каждые сутки оценивали концентрацию белка, активность белка по коллоидному хитину и осуществляли денатурирующий гель-электрофорез (раздел 4.2.22) культуральной жидкости для контроля стабильности фермента.

4.2.20 Выделение и очистка ферментов

Гомогенные рекомбинантные формы хитиназ выделяли из культуральных жидкостей (КЖ) и ФП методами гель-проникающей, аффинной и гидрофобной хроматографии. Фракционирование и очистку ферментов осуществляли на хроматографической системе АКТА UPC (GE Healthcare, США) [165].

4.2.20.1 Очистка рекомбинантной Chit19 выделенной из клеток *E.coli*

В раствор рефолдированного белка вносили Na-фосфатный буфер (pH 7.8) до конечной концентрации 20мМ, 250мМ NaCl и 5мМ имидазола. Полученная смесь наносилась на колонку HisTrap HP 5ml (GE Healthcare, США) уравновешенную тем же буфером. Связанный белок промывали 50 мл промывочного буфера (20мМ Na-фосфатный буфер (pH 7.8), 250мМ NaCl и 5мМ имидазола), после чего элюировали в градиенте имидазола (5-250 мМ). Фракции анализировали на содержание целевого белка, после чего диализовали против 20 мМ Na-ацетатного буфера pH 5, содержащего 5% глицерина.

4.2.20.2 Очистка рекомбинантной Chit19 из культуральной жидкости *P.pastoris*

Культуральную жидкость центрифуговали при 4600 об/мин на центрифуге Universal 320 (Hettich Zentrifugen, Германия). В супернатант добавляли сульфат аммония до насыщения 70%, для осаждения белков. Затем осадок отделили от супернатанта и перерастворяли в стартовом буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, и подвергали обессоливанию на колонке BioGel P2 (Bio-Rad, США), уравновешенной тем же буфером [145].

4.2.20.3 Очистка рекомбинантной хитиназы 18 семейства (Chit18)

Выделение производили из ферментного препарата, полученного в предыдущей работе [166]. Ферментный препарат, содержащий целевую Chit18, растворяли в воде до концентрации 2 мг/мл. Далее осаждали нерастворившуюся фракцию при 4600 об/мин на центрифуге Universal 320 (Hettich zentrifugen, Германия). В супернатант добавляли сульфат аммония до насыщения 70%, для осаждения белков. Затем осадок отделяли от супернатанта и перерастворяли в стартовом буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 7.0, и подвергали обессоливанию на колонке BioGel P2 (Bio-Rad, США), уравновешенной тем же буфером [162].

Обессоленную фракцию наносили на колонку с анионообменным носителем Source 15Q (GE Healthcare, США). В качестве элюентов использовали буферы 20 мМ Bis-Tris/HCl, pH 6.8, и 20 мМ Bis-Tris/HCl + 1М NaCl, pH 6.8. Фракционирование осуществляли в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1 М. Затем к фракциям добавляли сульфат аммония до концентрации 1,7 М, и проводили их гидрофобную хроматографию на колонке с носителем Source 15 Iso (GE Healthcare, США). В качестве элюентов использовали 50 мМ Na-ацетатный буфер + 1,7М (NH₄)₂SO₄, pH 5,0, и 50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,0. Разделение осуществляли в линейно убывающем градиенте

сульфата аммония от 1,7 до 0 М. Выделенные гомогенные хитиназы обессоливали диализом против 50 мМ Na-ацетатного буфера, pH 5,0 [162].

4.2.21 Определение концентрации белка

Концентрацию белка в КЖ и в растворах гомогенных белков определяли модифицированным методом Лоури [167]. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре «Varian Cary 50 UV-Vis» (Agilent Technologies, США). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (Merck KGaA, Германия).

4.2.22 Проведение SDS-PAGE-электрофореза

Электрофорез КЖ и гомогенных хитиназ проводили в денатурирующих условиях с использованием пластин из полиакриамидного геля, который состоял из двух частей. Верхний слой являлся концентрирующим (4% полиакриламида), нижний слой - разделяющим (12% полиакриламида). Электрофорез проводили с использованием системы Mini Protein II (Bio-Rad Laboratories, США). Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Кумасси бриллиантовый синий [168].

4.2.23 Изучение термостабильности рекомбинантных хитиназ

Изучение термостабильности гомогенных хитиназ проводили путем измерения остаточной активности по отношению к коллоидному хитину. Гомогенный фермент (1 мг/мл) инкубировали в диапазоне температур 30-80°C в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5,0. Через каждые 10 минут отбирали аликвоту фермента, быстро охлаждали и определяли его каталитическую активность при 55 °C методом, указанным в разделе 4.2.16.

4.2.24 Определение температурного и pH-оптимумов активности хитиназ

Для определения температурного оптимума действия хитиназ и их мутантных форм измеряли активность методом указанным в п 4.2.16 по отношению к коллоидному хитину в диапазоне температур 30-80° С. Измерения проводились в 0,1 М Na-ацетатном буфере, pH 5.0 методом, указанным в разделе 4.2.16. Реакцию проводили в течение 30 мин.

4.2.25 Нарabотка биомассы *Penicillium canescens*

Штамм *Penicillium canescens* Пер-4 (ВКМ F-4677D) культивировали в колбах в течение семи дней при 30 ° С в среде, содержащей (%): лузга сои - 4,5, экстракт кукурузы - 5,0, КН₂ РО₄ - 2,5. В конце ферментации биомассу грибов отделяли фильтрованием через нетканый материал.

4.2.26 Определение фунгицидных свойств хитиназ

Части листьев пшеницы (длиной 8 см), вырезанные из центральных частей отдельных листьев пшеницы (10 листьев на обработку), помещали в чашку Петри на 1% водный агар с добавлением бензимидазола (0,004%). Споры *Parastagonospora nodorum* суспендировали в порции свежего 20 мМ Na-ацетатного буфера, буфер pH 5 до концентрации 2×10^6 конидий / мл. Перед инокуляцией срезов листьев 1 мл суспензии смешивали с 1 мл лиофилизированного препарата очищенного фермента, растворенного в том же буфере до концентрации 0,5 мг/мл. Полученная смесь содержала фермент и споры грибов в конечных концентрациях 1×10^6 конидий/мл и 0,75 мг/ мл, соответственно. После 1-часовой инкубации при 20-22 ° С аликвоты (10 мкл) смеси по каплям наносили на верхние (дистальные) части срезов листьев. Параллельно капли (10 мкл) суспензии конидий (10^6 конидий / мл) в буфере наносили на нижние (базальные) части тех же срезов листа (контроль). Симптомы заболевания оценивали по пятибалльной шкале через 4 дня после инокуляции. Все эксперименты с фитопатогенными грибами проводились на базе Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов и растительных идентификаторов патогенных штаммов микроорганизмов Российского института фитопатологии (г. Большие Вяземы, Московская область).

V. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5.1 Клонирование полноразмерного гена *chit19*, кодирующего хитиназу GH19 из росянки *D.capensis* и описание его структуры

5.1.1 Получение фрагмента гена *Chit19* из *D.capensis*

На первом этапе работы проводилось клонирование полноразмерного гена *chit19*, кодирующего хитиназу Chit19 из росянки *D.capensis*.

Для клонирования новой хитиназы из *Drosera capensis* была выбрана стратегия, основанная на гомологии консервативных участков растительных хитиназ. В качестве объектов сравнения были выбраны хитиназы из хищных растений. Эволюционно все хищные растения близки друг к другу, поэтому для выравнивания использовали все доступные последовательности хитиназ GH19 из хищных растений. В настоящий момент в NCBI опубликовано две хитиназы из росянковых: *D. adelia* (LC037409.1) и *D. rotundifolia* (KU516826.1), несколько изоформ хитиназы из *Nepenthes* (AY618882.1), и одна хитиназа, выделенная из венериной мухоловки (*Dionaea muscipula*, KT223143.1) [93].

В ходе анализа кодирующих последовательностей было выявлено наличие двух интронов, гомология которых между видами составляла менее 30% между родами. Экзоны имели гомологию 60-70%. К наиболее гомологичным участкам были синтезированы вырожденные олигонуклеотиды (последовательность представлена в таблице 10, пункте 4.2.10), последовательность которых была комплементарна кодирующей последовательности экзона 2 и области экзона 3 (Рисунок 16).

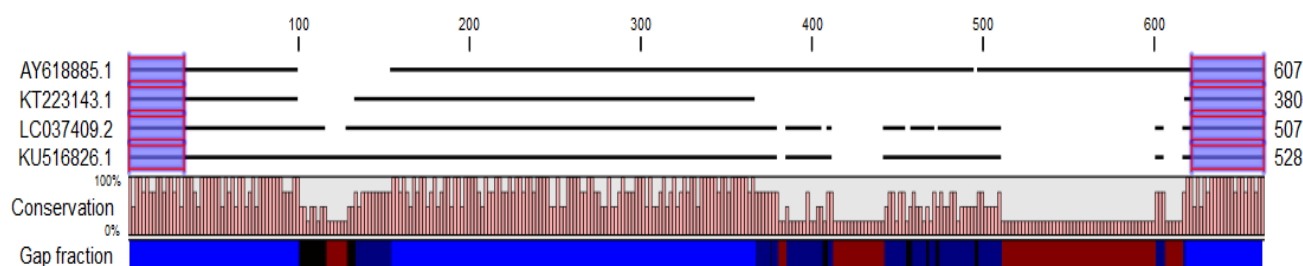


Рисунок 16 – Выравнивание области экзона 2 и области экзона 3 в нуклеотидных последовательностях гомологичных хитиназ из насекомоядных растений (концевые области выделенные красными прямоугольникам – места подбора вырожденных олигонуклеотидов).

С использованием вырожденных олигонуклеотидов (Таблица 12) и геномной ДНК *Drosera capensis*, в качестве матрицы, были клонированы два ПЦР-фрагмента длиной 450 п.о. и 835 п.о. (рисунок 17)

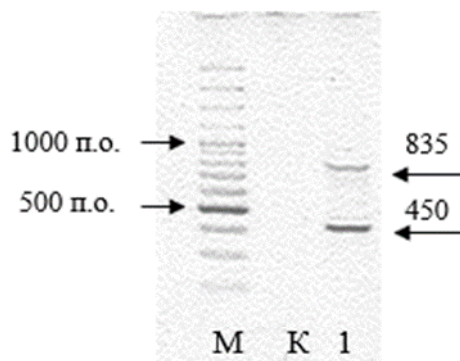


Рисунок 17 – ПЦР-продукты, полученные с вырожденными ген-специфичным олигонуклеотидами М – маркер, К – контроль без матрицы 1 – целевые ПЦР-продукты

После секвенирования фрагментов, было установлено, что фрагмент длиной 835 п.о. имеет гомологию с известными последовательностями кислых хитиназ типа I. Для реконструкции полной структуры гена осуществляли амплификацию по технологии TAIL-PCR. (п.4.2.7 Материалов и методов).

Было проведено три раунда TAIL-PCR. Был получен продукт длиной ~2400 п.о. в направлении 3' и около 800 п.о. в направлении 3' (рисунок 18).

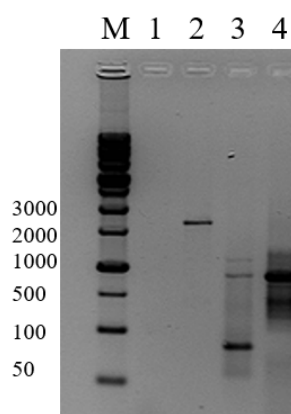


Рисунок 18 – Продукты амплификации с II и III стадии TAIL-ПЦР, в прямом (1 и 2) и обратном (3 и 4) направлении

Секвенирование полученных продуктов позволило восстановить структуру фрагмента ДНК длиной 2443 п.о. Анализ экзон-интронной структуры фрагмента, на сервере AUGUSTUS [169] с высокой достоверностью определи одну открытую рамку

считывания, три экзона и два интрона. Общая длина гена составила 1661 п.о., а длина кодирующей последовательности 978 п.о. [103].

5.1.2 Клонирование кодирующей последовательности *Chit19 D.capensis*

Насекомоядное растение *D.capensis* содержит до 20% полифенолов, которые ковалентно связываются с нуклеотидами и не позволяют отделить генетический материал, пригодный для дальнейшего анализа, поэтому в данном случае выделение тотальной РНК представляло собой нетривиальную задачу [170]. Как показала практика коммерческие наборы RNeasy *Plant* Mini Kit (QIAGEN) и GeneJET *Plant* RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) оказались неэффективны, как и классические методы экстракции РНК.

Поэтому, для выделения тотальной РНК был разработан метод экстракции основанный на СТАВ протоколе [171] с модификациями. Суть внесенных изменений состоит в: 1) увеличении количества β -меркаптоэтанола до 5% и PVP-40 до 10% для максимально эффективного связывания полифенолов и предотвращения их окисления, 2) использовании цитратного буфера с pH 5.0 вместо Tris-HCl с pH 8.0, так как РНК при данных значениях наиболее стабильна, 3) добавлении в буфер SDS до концентрации 1%, с целью ингибирования рибонуклеаз.

В результате из 300 мг растения было выделено около 3 мкг общей РНК, пригодной для обратной транскрипции. Синтез кДНК производился с использованием dT18 праймера и Maxima Reverse Transcriptase согласно рекомендациям производителя. В результате была получена библиотека транскриптов длиной от 100 до 6000 п.о. (Рисунок 19). Так как длина предполагаемого фрагмента составляет 978 п.о. то решено было использовать данную кДНК в качестве матрицы для клонирования кодирующей последовательности *chit19* [103].

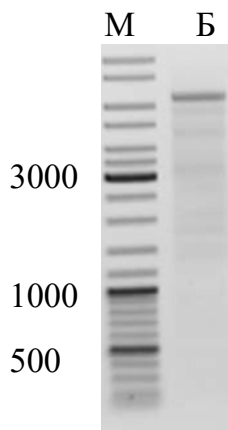


Рисунок 19 - Электрофореграмма библиотеки (Б) кДНК *D.capensis*

Для подтверждения предсказанной последовательности, используя библиотеку кДНК и праймеры Chit_Dr-Lic5 и Chit_Dr-Lic3 (таблица 12 п.4.2.10 материалов и методов) амплифицировали полную кодирующую последовательность *chit19* гена длиной 978 п.о. Секвенирование данной последовательности и определение рамки считывания показало, что клонированная последовательность является полноразмерным геном *chit19* из *D.capensis*. Ген *chit19* был секвенирован и депонирован в базу данных GenBank под номером MK093978 [103].

Анализ аминокислотной последовательности хитиназы Chit19 показал, что фермент из *D.capensis* представляет собой классическую хитиназу 19-го семейства гликозилгидролаз, относящуюся к классу Ib, длиной 325 а.к. и молекулярной массой 34.2 кДа. Новая хитиназа состоит из четырех основных элементов: сигнального пептида (20 а.к.), N-концевой хитинсвязывающий домен (40 а.к.), пролин-богатый линкер (18 а.к.) и каталитический домен (247 а.к.) (Рисунок 20).

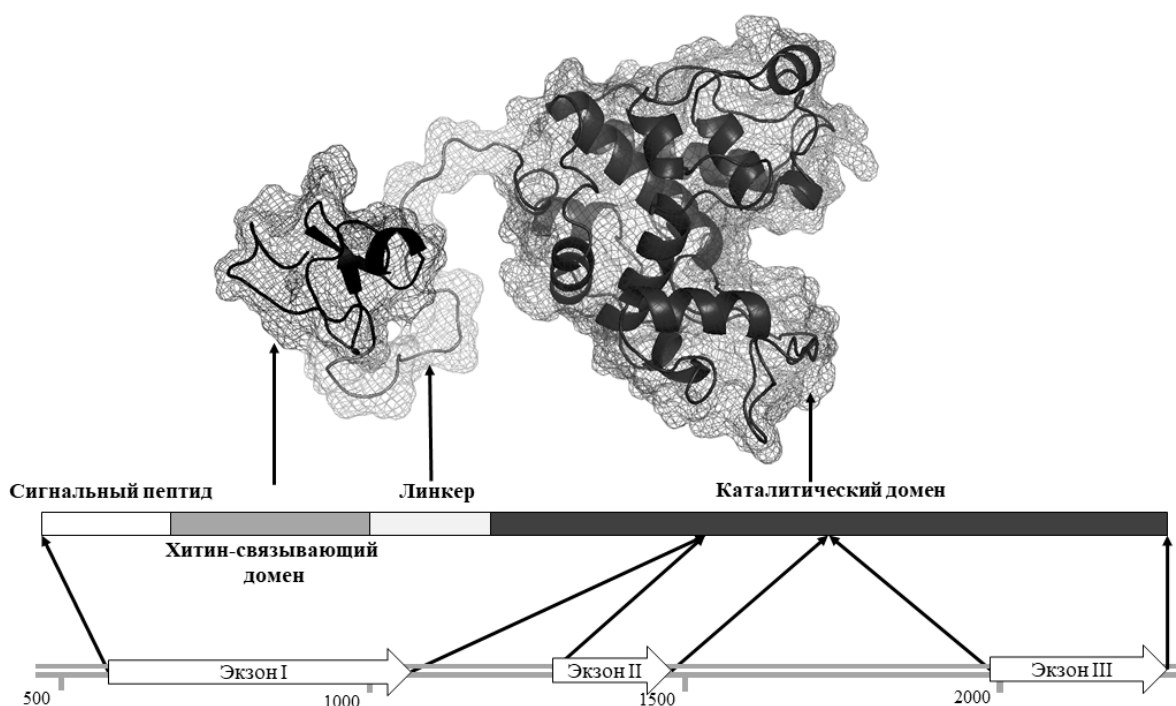


Рисунок 20 - Структура гена *chit19* и модель кодируемой хитиназы Chit19 из *D.capensis*

Хитин-связывающий домен Chit19 имеет высокую гомологию с хитин-связывающими доменами других растений (>90 %) и относится к углевод-связывающим доменам ChBD18, имеет в своей структуре 8 консервативных цистеинов и 2 остатка тирозина, которые, предположительно, участвуют в связывании хитина [172].

Длинный линкер (18 а.к.) между хитин-связывающим и каталитическим доменами обладает регулярной структурой, состоящей из повторов –S–P– и имеет три предполагаемых сайта O - гликозилирования.

Каталитический домен имеет высокую гомологию с известными хитиназами GH19 из *Drosera adelaе* (BAR13254.1) и *Drosera rotundifolia* (AMM76171.1) - 90 и 95 %, соответственно, что свидетельствует о высокой консервативности данного участка пептидной последовательности. Оценить влияние аминокислотных замен на структуру фермента и его функциональные параметры представляется сложной задачей, так как отсутствуют данные по 3D-структурам хитиназ GH19 из хищных растений, как и данные о их биохимических свойствах. Ближайшим гомологом новой хитиназы Chit19 из *D. capensis*, с изученными биохимическими свойствами, является хитиназа из *Oryza sativa* (2DKV_A, гомология каталитического домена составляет 69%).

Анализ сигнальных пептидов с использованием веб-сервера Signal-P 5.0 показал, что сайт расщепления сигнального пептида находится между поз. 20 и 21 (TYA-VQ) с вероятностью 96,31%.

Аминокислотная последовательность полноразмерной хитиназы *D. capensis* показана на рисунке 21, дисульфидные связи и свободные цистеины отмечены красным. Хитин-связывающий домен хитиназы (21-63 а.о.) имеет высокую гомологию с хитин-связывающими доменами хитиназ других растений (> 90%). Он имеет в своей структуре 8 консервативных цистеинов и 2 остатка тирозина, которые, предположительно участвуют в связывании с хитином [103,173].

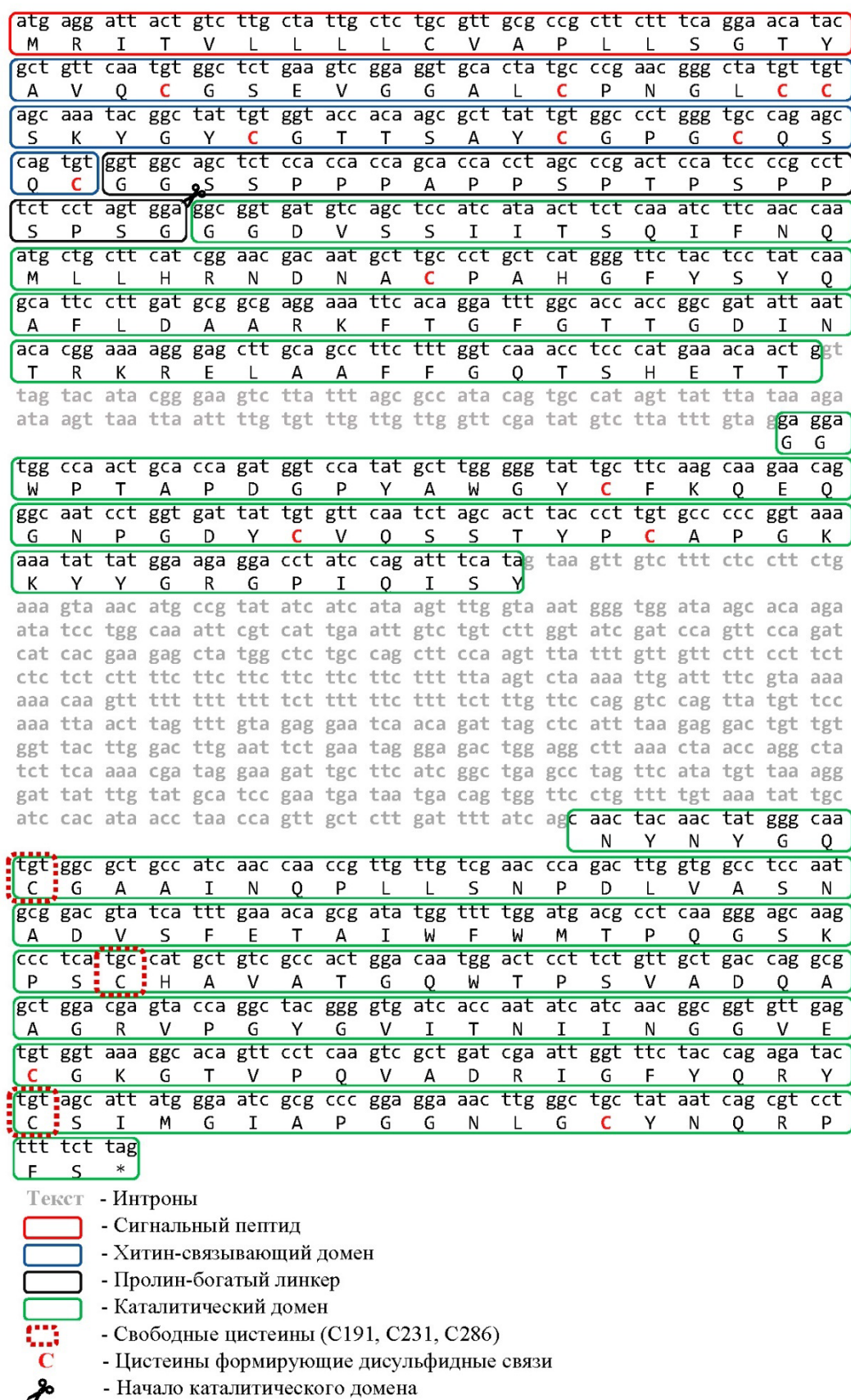


Рисунок 21 – Нуклеотидная и аминокислотная последовательность хитиназы из

Drosera capensis.

5.2 Получение рекомбинантной хитиназы Chit19 в бактериях *E.coli*

5.2.1 Разработка экспрессионных плазмид, трансформация бактерий и оптимизация экспрессии в клетках *E.coli*

На первом этапе, для получения рекомбинантной хитиназы Chit19 была выбрана экспрессионная система *E. coli*, позволяющая быстро получить новый фермент и охарактеризовать его биохимические свойства. За основу был взят экспрессионный вектор pNIC-28a.

Методом ПЦР, используя в качестве матрицы кДНК *D.capensis*, было проведено клонирование двух вариантов хитиназы 1) Chit19 – полноразмерной хитиназы из *D. capensis*), с удаленным сигнальным пептидом (20 а.к с N-концевой области) и 2) Chit19 Δ ChBD - хитиназы с удалённым хитин-связывающим доменом (Рисунок 22)



Рисунок 22 –Электрофореграмма продуктов амплификации Chit19(1) и Chit19 Δ ChBD(2)

Полученные последовательности, кодирующие области Chit19 и Chit19 Δ ChBD, были клонированы в вектор pNIC-28a.

Плазмиды (pNIC_Chit19 и pNIC_Chit19 Δ ChBD) (п.4.2.12 материалов и методов) были трансформированы в *E.coli Rosetta* (DE3), данный штамм использовался, так как в последовательности растительной хитиназы наблюдались кодоны, имеющие низкую частоту встречаемости в *E.coli*.

Полученные рекомбинантные штаммы *E.coli Rosetta* pNIC_Chit19 и *E.coli Rosetta* pNIC_Chit19 Δ ChBD, содержащие рекомбинантную ДНК, кодирующую 6xHis-меченую хитиназу из *Drosera capensis* массой ~32 кДа и ~27 кДа в случае с вариантом без ChBD.

Полученные трансформанты выращивались на среде ТВ и индуцировались 1мМ IPTG при температуре 30°C в течение 6 часов. Наличие рекомбинантного белка определяли путем отбора 5 мкл клеточной культуры и анализа на наличие рекомбинантной хитиназы на SDS-PAGE (Рисунок 23).

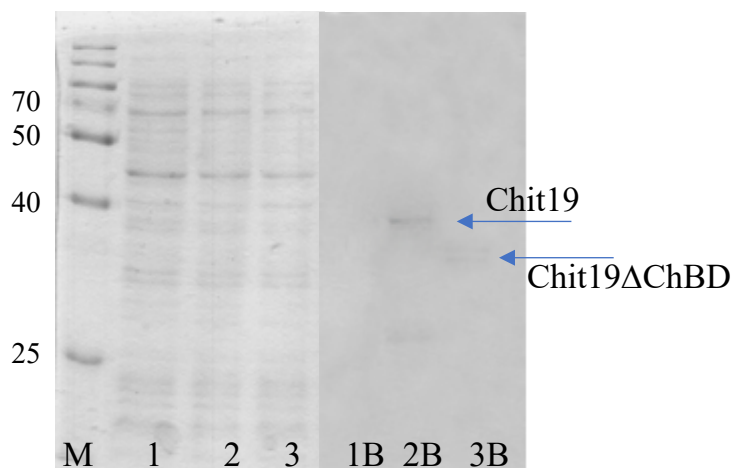


Рисунок 23 – ДСН-ПААГ электрофорез и Вестерн-блот клеточного лизата *E.coli* Rosetta (1 и 1B), *E.coli* pNIC_Chit19 (2 и 2B) и *E.coli* pNIC_Chit19ΔChBD (3 и 3B).

Синими стрелками обозначены полосы различных форм хитиназы Chit19

Анализируя электрофореграмму следует отметить, что экспрессия рекомбинантных хитиназ визуально не наблюдалась, как в случае Chit19 так и для Chit19ΔChBD. Проведя вестерн-блоттинг с антителами на эпитоп - 6xHIS_{tag}, было обнаружено, что целевой белок присутствует, хотя и во фрагментарном виде, однако его концентрация находится на грани чувствительности метода иммуноблоттинга (<5нг). Подобный результат может объясняться следующими факторами:

- Неоптимальные условия экспрессии для данного белка, в следствии чего требуется оптимизация температурного режима и концентрации индуктора;
- Отсутствие вспомогательных шаперонов и отсутствие посттрансляционных модификаций не позволяет эффективно экспрессировать данный белок, что может вызывает клеточный стресс, который индуцирует секрецию внутриклеточных протеаз, разрушающих продукт.

Первый шаг оптимизации экспрессии заключался в варьировании температуры культивирования в диапазоне 16-32°C и концентрации ИПТГ в диапазоне 0.01-1.0 мМ. Однако, предложенная оптимизация не привела к заметному увеличению выхода

рекомбинантной хитиназы, что означало необходимость применения иных подходов для улучшения экспрессии.

Для дальнейшей оптимизации экспрессии тестировали коммерческие штаммы-продуценты *E. coli Arctic express (DE3)* и *E. coli Rosetta Gammi 2 (DE3)*. Эти штаммы используют принципиально разный подход к решению проблемы низкого выхода целевого белка.

E. coli Arctic express (DE3) конститутивно экспрессируют адаптированные к низким температурам шапероны Cpn10 и Cpn60 из психрофильной бактерии *Oleispira antarctica*. Шапероны Cpn10 и Cpn60 из *O. antarctica* имеют 74% и 54% аминокислотную идентичность с нативными шаперонами GroEL и GroES *E. coli*, соответственно, и проявляют высокоэффективный фолдинг белков при температурах 4–12° С. Для расширения возможностей штамма в него была дополнительно введена плазмида pRARE из *E. coli Rosetta*. Если проблема состоит в недостатке шаперонов для фолдинга и защиты гидрофобных участков белка, то данный штамм позволил бы решить эту проблему.

E. coli Rosetta Gammi 2 (DE3) —штамм, несущий мутации в локусах *trxB* / *gor* благодаря чему клетки имеют более кислую цитоплазму, что облегчает окислительный фолдинг цистеиновых мостиков в целевом белке.

Плазмиды pNIC_Chit19 и pNIC_Chit19ΔChBD были трансформированы в оба штамма. *E. coli*. Однако режимы индукции различались для двух штаммов.

E. coli Arctic express выращивали при 30°C на среде ТВ до оптической плотности 0.4, снижали температуру до 10°C и индуцировали путем добавления 0.5мМ ИПТГ, после чего инкубировали 24 часа.

E. coli Rosetta Gammi 2 выращивали при 30°C на среде ТВ до оптической плотности 0.8, снижали температуру до 25°C и индуцировали путем добавления 0.5 мМ ИПТГ, после чего инкубировали 24 часа.

Клетки, отделённые от среды, анализировали при помощи SDS-PAGE (Рисунок 24).

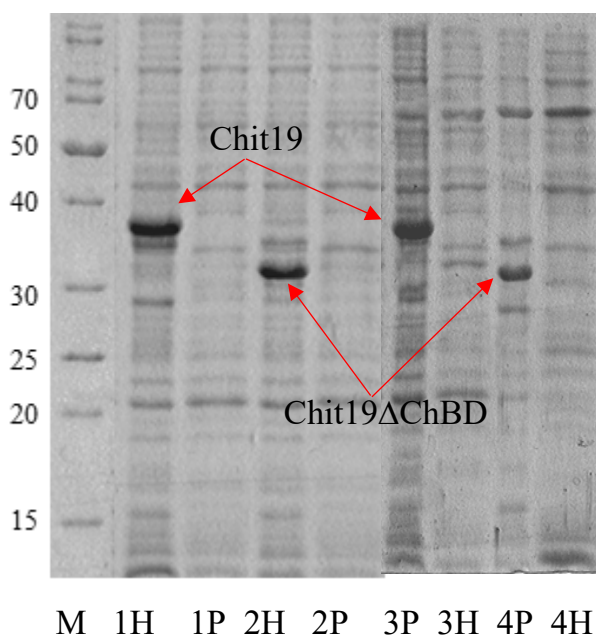


Рисунок 24 – SDS-PAGE электрофорез растворимой (P) и нерастворимой (H) фракции *E.coli* 1 - *E. coli Rosetta Gammi 2_Chit19*, 2 - *E. coli Rosetta Gammi 2_Chit19ΔChBD*, 3 - *E. coli Arctic express_Chit19*, 4 - *E. coli Arctic express_Chit19ΔChBD*

Как видно из рисунка 24 основное количество Chit19 накапливалось в нерастворимой фракции клеточного лизата.

Полученные данные согласуются с результатами, полученными коллективом Раджнинека, где, используя штаммы: *E. Coli: BL21-CodonPlus* и *E. coli Shaffle (DE3)* не удалось получить рекомбинантной хитиназы из *D. rotundifolia* в растворимой форме, несмотря на использование тиоредоксиновых меток и оптимизацию температурного профиля [174]. Небольшие количества растворимой формы белка возможны во время лизиса клеток с использованием буферов, содержащих сильные детергенты (ДСН), как было показано в более поздней работе. Комбинация этих подходов позволяет получить активную хитиназу из *D. rotundifolia* с выходом около 1 мг целевой хитиназы на грамм влажной биомассы [175].

Таким образом в нашей работе выход рекомбинантного белка в виде телец включения составил 23,4 мг и 13,5 мг Chit19 на 1 г влажной биомассы в случае *E. coli Arctic express (DE3)* и *Rosetta-gammi 2*, соответственно. Удаление ChBD, по-видимому, не привело к увеличению растворимости белка. Хитиназы с ChBD и без него экспрессировались исключительно в нерастворимой форме. Подбор штамма позволил добиться двукратного увеличения выхода рекомбинантного белка в виде телец включения. Исходя из полученных данных, в дальнейшей работе использовали штамм *E.*

coli Arctic express (DE3) в качестве продуцента. Снижение температуры индукции до 10°C и концентрации индуктора до 0.3мМ позволила увеличить выход телец включения. Выход очищенных телец включения 1л культуры составил **126 мг Chit19** и **158 мг Chit19ΔChBD** (рисунок 25)

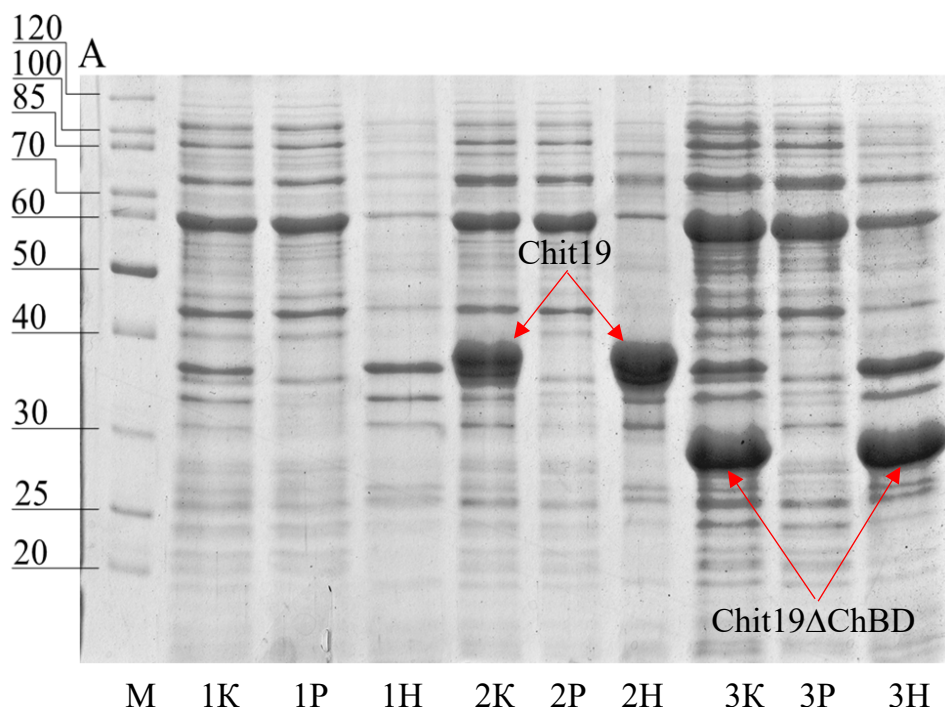


Рисунок 25 – ДСН-ПААГ электрофорез клеточной культуры (К) растворимой (Р) и нерастворимой (Н) фракции *E.coli*: 1 - *E. coli Arctic express*; 2 - *E. coli Arctic express_Chit19*; 3 - *E. coli Arctic express_Chit19ΔChBD*

5.3 Рефолдинг полноразмерной Chit19 и Chit19 с удаленным ChBD

Для наработки рекомбинантной хитиназы было проведено масштабирование процесса культивирования рекомбинантных штаммов *E.coli*. Штаммы-продуценты Chit19 и Chit19ΔChBD выращивались 500 мл среды ТБ (п.4.1.3 материалов и методов) и индуцировались в соответствии с условиями, описанными выше. По окончании культивирования клетки отделяли и производили очистку телец включения (п.4.2.20. Материалов и методов) и растворяли в 8М мочеvine. Полученный раствор денатурированного белка разводили до финальной концентрации 2мг/мл.

Оптимизация стандартной процедуры рефолдинга проводилась в несколько этапов. Первый этап включал оптимизацию удаления хаотропного агента из образца денатурированного белка. Были протестированы три метода: ступенчатый диализ, быстрое разбавление и ступенчатая укладка на Ni-сефарозе. На данном этапе производилась первичная оценка эффективности способа удаления хаотропного агента и

не оценивалось влияние стабилизирующих добавок в буфере для рефолдинга. Оработку процесса рефолдинга осуществляли на полноразмерной хитиназе (Chit19), чтобы исключить возможность снижения ферментативной активности за счет удаления ChBD. Эффективность рефолдинга оценивали по определению выхода активной хитиназы Chit19. Выход оценивался как отношение массы денатурированного белка до рефолдинга к массе денатурированного белка, полученного в растворимой форме после рефолдинга.

5.3.1 Ступенчатый диализ

Первой протестированной методикой рефолдинга был классический ступенчатый диализ (п.4.1 материалов и методов). Несмотря на то, что реализация метода ступенчатого диализа для рефолдинга хитиназы кукурузы, что отмечено в работе Kirubakaran и Sakthivel [153], для хитиназы из *D.capensis* этот метод оказался малоэффективным и позволил получить лишь 5% растворимого белка. Основная агрегация Chit19 происходила на последних ступенях диализа, когда концентрация мочевины снижалась ниже 2 М, что свидетельствовало о неполном рефолдинге рекомбинантной хитиназы.

5.3.2 Рефолдинг на Ni-NTA сефарозе

Ренатурация на среде Ni-NTA - хорошо известный метод, который часто используется для получения растворимых форм белка. Иммунизация денатурированных белковых молекул на носителе позволяет физически изолировать молекулы друг от друга и минимизировать межмолекулярные взаимодействия во время складывания. Процесс рефолдинга на Ni-NTA сефарозе, позволяет быстро получить растворимую форму фермента, при этом происходит дополнительная очистка, от ферментов лишенных 6xHis-эпитопа. Выход белка составил около 10%. Следует отметить, что основная агрегация белка происходила при его смывании с носителя. Предположительно, это связано с высокой локальной концентрацией Chit19 на фронте элюента, что приводило к множественным взаимодействиям между молекулами белка и его дальнейшей агрегации. Тем не менее, метод обладает существенными преимуществами перед ступенчатым диализом – помимо увеличения выхода, метод более экономичен с точки зрения расхода реагентов и времязатрат.

5.3.3 Рефолдинг методом «быстрого разбавления»

Быстрое «шоковое» разведение белка в буфере рефолдинга в соотношении от 1 до 10, в некоторых случаях предпочтительнее, чем постепенный диализ[176]. Метод показал наилучшую эффективность, выход белка составил 14,5% (Таблица 15).

Таблица 15 – Сравнительная характеристика методов рефолдинга

Метод	Выход, %	Активность, ед/г	Трудоемкость, ч
Диализ	5,0%	200.3±3.8	96
Ni-NTA	10,0%	184.4±5.4	32
Быстрое разбавление	14,5%	323.8±9.4	25

Различную удельную активность ферментов, полученных разными методами рефолдинга, можно возможно объяснить наличием доли белка с частичным фолдингом, у которого процесс прошел не полно, с частично сформированными (или сформированными ошибочно) дисульфидными связями, что позволяет белку существовать в растворимой форме, однако, такая форма не проявляет биохимических свойств присущих нативной форме фермента.

В результате применения метода быстрого разбавления, агрегация Chit19 происходит в меньшей степени за счет окружения белковой глобулы молекулами растворителя и предотвращения взаимодействия молекул белка друг с другом. Особенность реализации данного метода позволяет осуществлять рефолдинг в 96-луночных микропланшетах, комплексно оценивая влияние различных добавок на эффективность процесса рефолдинга. Поэтому, в дальнейших экспериментах рефолдинг проводили по методу разбавления.

5.3.4 Влияние химических добавок на эффективность рефолдинга

Хитиназы 19 семейства являются цистеин-богатыми белками с множеством дисульфидных связей, необходимых для правильного фолдинга. Однако образование этих связей *in vitro* – сложноконтролируемый процесс, который напрямую влияет на эффективность и полноту рефолдинга, который, можно контролировать путем использования различных добавок, выполняющих роль «искусственных шаперонов».

Второй этап оптимизации был направлен на оценку влияния химических добавок на эффективность рефолдинга. Различные химические добавки в стандартном буфере рефолдинга позволяют комплексно улучшать процесс рефолдинга, влияя на каждую стадию рефолдинга: эффективность образования цистеиновых мостиков и стабилизацию третичной структуры фермента. Редокс-пары веществ, такие как глутатион, цистеин / цистин, ускоряют «перетасовку» дисульфидных связей и сокращают время рефолдинга [177]. А вещества, такие как глицерин, например, выступают в роли стабилизатора

белковых молекул, увеличивая порядок молекул растворителя вокруг белков. Глицерин улучшает стабильность фермента даже при высоких концентрациях белка [161]. Хотя стабилизаторы, такие как глицерин или полиэтиленгликоль, увеличивают выход во время рефолдинга, одновременно может происходить агрегация белка. Поэтому эти типы добавок всегда используются в сочетании с ингибиторами агрегации, такими как аргинин [178] или пролин [179]. Для оценки влияния добавок на эффективность рефолдинга были протестированы буферы рефолдинга с добавлением: 5% сахарозы, 5% глицерина, 1% PEG 3000, 0.1 М аргинина, 1 М пролина, 0,5% Triton X100, 0,5% Tween 20 и 0,5% натриевой соли N-лаурилсаркозина (Таблица 16).

Таблица 16 – Качественный анализ влияния добавок на процесс рефолдинга

Добавки							
Сахароза	Глицерин	Аргинин	Пролин	PEG 3000	Triton x100	Twin-20	N-лаурил-саркозил
n	+	+	n	n	n	n	-

“+” – увеличивает эффективность рефолдинга, “-” – уменьшает эффективность рефолдинга, “n” – нет эффекта

Твин-20 и Тритон X100 не оказали значительного влияния на выход рефолдированной Chit19, в то время как ионный детергент, N-лаурилсаркозин, снизил выход рекомбинантного белка по сравнению с контролем. Сахароза и ПЭГ 3000 не влияли на эффективность рефолдинга, в то время как глицерин увеличивал выход хитиназы. Следует отметить, что глицерин является основной буферной добавкой, которая доказала свою эффективность с широким спектром белков и методов рефолдинга [180].

Пролин и аргинин могут действовать как «химические шапероны», взаимодействуя с гидрофобными участками молекулы [181]. В нашей работе аргинин показал значительное увеличение выхода рефолдированной Chit19.

Таким образом, для количественной оценки и дальнейшей оптимизации, были выбраны две добавки: глицерин и аргинин. Аликвоты хитиназы, растворенной в буфере для денатурации (100 мкл), добавляли к 1 мл буфера для рефолдинга, дополненного различными концентрациями глицерина (от 0 до 15%) и аргинина (от 0 до 4 М). Активность фермента в каждом образце измеряли по отношению к коллоидному хитину.

На основании полученных данных построена диаграмма, демонстрирующая зависимость хитинолитической активности от концентрации глицерина и аргинина. (Рисунок 26)

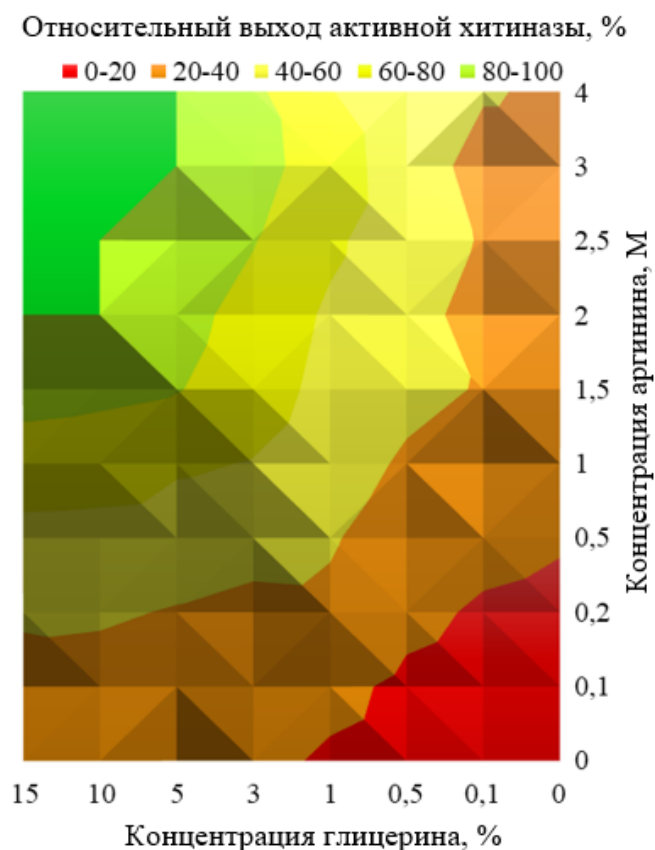


Рисунок 26 - Зависимость активности хитиназы от концентрации аргинина и глицерина. Зеленая зона - концентрации глицерина и аргинина, при которых достигается максимальный относительный выход активного растворимого белка после рефолдинга (80-100%), желто-зеленая зона (60-80%), желтая зона (40-60%), оранжевая зона (20-40%) и красная зона (0-20%)

Следует отметить, что глицерин и аргинин проявили синергетический эффект, максимальная активность (360 ед/г) была достигнута при 10% глицерина и 2 М аргинине, эффективность рефолдинга составила 25%. Дальнейшее увеличение концентрации вспомогательных компонентов не повлияло на эффективность рефолдинга.

Следующим этапом оптимизации стал подбор окислительно-восстановительных агентов, ускоряющих образование правильных дисульфидных связей. В данной работе были испытаны следующие добавки: 1) 2-меркаптоэтанол (1-5 мМ), 2) окисленный глутатион / восстановленный глутатион (3/0,3 мМ и 1/1 мМ), 3) цистеин / цистин (0,1/3 и 0,5/5 мМ). Добавление меркаптоэтанола и окислительно-восстановительной пары цистеин / цистин в используемом диапазоне концентраций не привело к значительному изменению выхода растворимой формы белка и активности. Из всего перечисленного

только глутатион в концентрации 0,3 / 3 мМ оказывал положительное влияние на выход растворимой хитиназы, который увеличивался до 30%. Ранее эффективность использования окислительно-восстановительных пар GSH / GSSG используемых в соотношении 1:10 была продемонстрирована в работах по рефолдингу лизоцима [182], где показано, что добавка существенно увеличивает скорость и «точность» рефолдинга [183]. Однако чаще всего эта система влияла не столько на выход растворимого белка, сколько на его активность, направляя образование дисульфидных связей в «правильном» направлении.

Таким образом, выбранный оптимальный состав буфера для рефолдинга представлял собой 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 100 мМ NaCl, 10% глицерин, 2 М аргинин, 3 мМ окисленный глутатион и 0,3 мМ восстановленный глутатион. Выход растворимой полноразмерной активной хитиназы составил 30%. Протокол был также реализован для Chit19ΔChBD, где выход растворимого белка составил 42%.

5.4 Мутагенез хитиназы Chit19 *D.capensis*, направленный на увеличение выхода растворимого белка в клетках *E.coli*

Несмотря на успешную реализацию процесса рефолдинга, очевидно, что данный процесс применим только для получения лабораторных образцов фермента. Для масштабирования производства хитиназы необходимо получение растворимой формы рекомбинантного белка в процессе культивирования штамма-продуцента.

Одним из узких мест для экспрессии в клетках *E. coli* является отсутствие процессинговой системы для образования дисульфидных связей [184]. Свободные цистеины часто приводят к образованию аберрантных дисульфидных связей, что приводит к агрегации белков. Одним из наиболее эффективных подходов для получения более высокого выхода правильно окисленного, растворимого белка, является замена несущественных для фолдинга цистеинов, которые образуют аберрантные дисульфидные связи [185]. Как говорилось выше в структуре хитиназы *D.capensis* присутствует 18 цистеинов (9 в каталитическом домене и 9 в ChBD). В следующем разделе описывается процесс поиска несущественных, для формирования каталитического центра, цистеиновых остатков и их замена.

5.4.1 Построение пространственной модели Chit19

Так как в базах данных отсутствуют структуры хитиназ из рода *Drosera*, то для анализа была построена гомологичную модель Chit19 (для построения использовалась

последовательность без сигнального пептида, длина последовательности 306 а/к) с использованием пакета программ YASARA (v.19.12.14.W.64) с параметрами по умолчанию [186,187]. Работа осуществлялась совместно с Техническим Университетом Аахена.

Возможные шаблоны для моделирования были идентифицированы путем выполнения 5-ти итераций PSI-BLAST, создание позиционно-зависимой оценочной матрицы (PSSM), с последующим поиском в базе данных белков (PDB) структур, подходящих для использования в качестве шаблона для построения 3D модели хитиназы (E-value <0.1).

Модель хитиназы была создана на основе структуры PDB хитиназы из *Oryza sativa* (идентификатор PDB (ID) 2DKV-A (далее только 2DKV), полученной с разрешением 2,0 Å; [188], которая являлась ближайшим гомологом исследуемого фермента (гомология составляет 74%).

Гомологичная модель оценивалась с помощью сервера структурного анализа и проверки (SAVES), который реализует оценку качества структуры с помощью таких инструментов, как VERIFY3D [189,190] и PROCHECK [159]. VERIFY3D показал, что 100,00% остатков имеют средний балл 3D-1D > = 0,2; Карта Рамачандрана и анализ параметров основной цепи PROCHECK показали, что все параметры структурной модели, кроме одного, соответствуют критериям модели хорошего качества (рисунок 27).

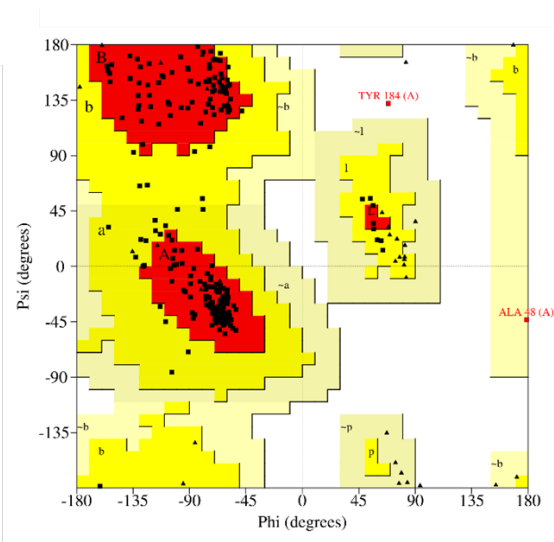


Рисунок 27 - Валидация гомологичной модели Chit19. Карта Рамачандрана модели гомологии Chit19, обозначающий углы ϕ и ψ основной цепи в градусах: 87,1% всех остатков находятся в предпочтительных областях, 12,5% в разрешенных областях и 0,4% в запрещенных областях

5.4.2 Определение потенциальных замен

Для определения паттернов аминокислотных остатков было проведено выравнивание для Chit19 используя сто наиболее гомологичных последовательностей, используя Chit19 в качестве входных данных для поиска в базе данных белков с использованием веб-сервера BLAST. Полученная информация была использована в качестве входных данных для веб-сервера WebLogo 3 для оценки частоты встречаемости каждого аминокислотного остатка (рисунок 28).

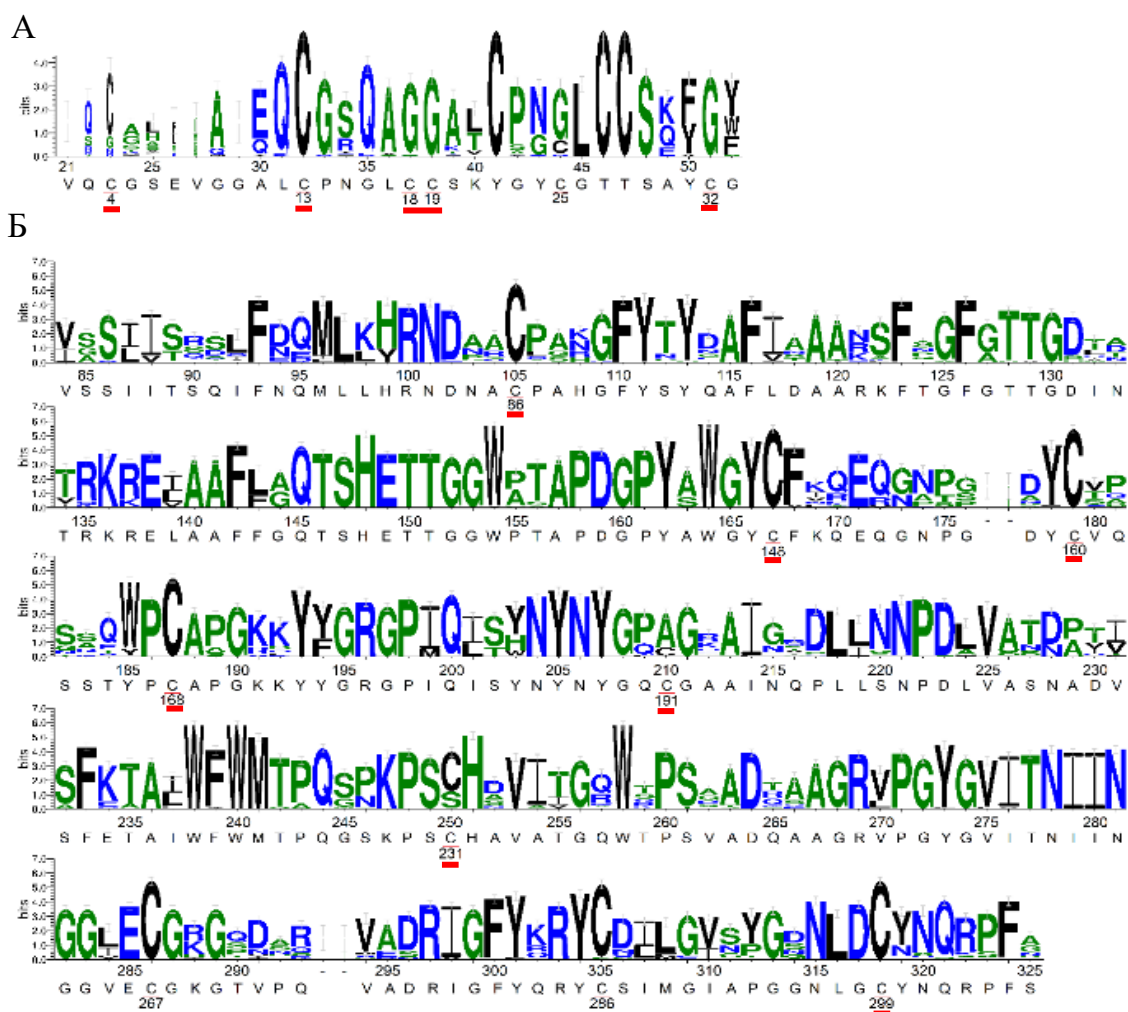


Рисунок 28 - Анализ консервативности аминокислот Chit19. Цистеины Chit19 выделены красными линиями и дополнительно помечены порядковым номером. Размер каждой буквы представляет консервативность, то есть частоту встречаемости этой аминокислоты в соответствующем положении среди 100 наиболее гомологичных последовательностей. Цвет букв аминокислот представляет их гидрофобность, (гидрофильный - синий; нейтральный - зеленый; гидрофобный - черный). (А) представляет собой консервативную последовательность остатков области ChBD (позиции 21-52) и (Б) каталитического домена (позиции 84-325)

Чтобы определить возможные аминокислотные замены чего – цистеинов или глутаминовых кислот, было выполнено множественное выравнивание хитиназ 19-го семейства, доступного в базе данных PDB (*Oryza sativa* 2DKV, *Carica papaya* 3CQL, *Vigna unguiculata* 4TX7, *Brassica juncea* 2Z37, *Bryum coronatum* 3WH1, *Streptomyces griseus*). (Рисунок 29 А)

Замечено, что все цистеины в каталитическом домене Chit19 показали очень высокую консервативность среди выровненных последовательностей. Кроме того, свободные цистеины основного домена (C191, C231, C286) (Рисунок 29 Б,В) были идентифицированы на 3D-модели Chit19, построенной на платформе YASARA.

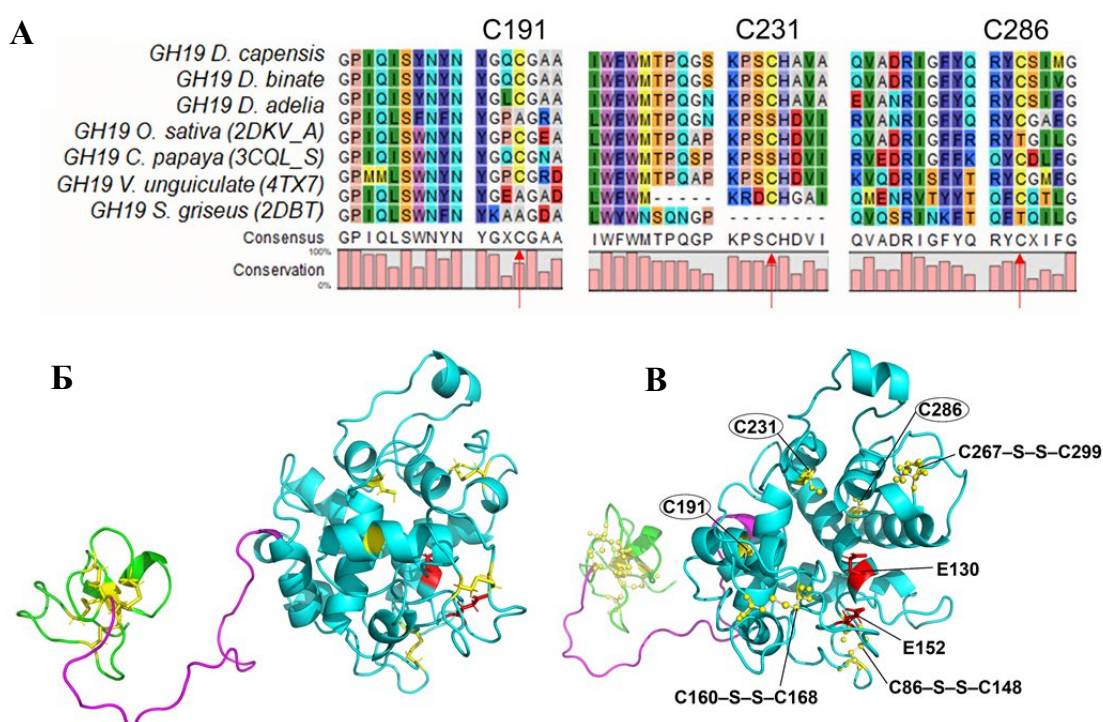


Рисунок 29 - Выравнивание белков гомологичных хитиназ в областях несвязанных цистеинов:(А) Выравнивание семи последовательностей хитиназ. (В) модель Chit19 *D.capensis* хитин-связывающие домены (ChBD, остатки 1-39, зеленый), линкер (остатки 40-65, пурпурный), каталитический домен (остатки 68-306, голубой), выделены дисульфидные связи (желтый) и предполагаемые каталитические остатки (E130 и E152, красный). Вторичные структуры выделены как ленточные модели (с указанием α -спиралей, β -листов и областей петель). (Б) и (В) представляют ту же структуру, но на (В) угол снимка повернут, чтобы выделить предполагаемые каталитические центры и дисульфидные мостики (шарики и палочки) основного домена (C86 – S – S – C148, C160 – S – S – C168, C267 – S – S – C299), а также свободные цистеины (C191, C231, C286)

Хотя три цистеина (C191, C231, C286) находятся близко к поверхности белка, моделирование доступной для растворителя площади поверхности на платформе YASARA показала, что только C286 локализован непосредственно на поверхности белковой глобулы и доступен для молекул растворителя (Рисунок 29 В).

Также, на основании модели идентифицированы каталитические аминокислоты - остатки глутаминовой кислоты (Glu), действующие как кислотный и основной катализатор, расположены находятся на гранях каталитической щели в позициях Glu130 и Glu152 (Рисунок 29В), что согласуется со структурой известных хитиназ риса [86] и папайи [191].

В ходе анализа выравнивания и поиска возможных замен C191, C231, C286, обнаружено, что на данных позициях чаще всего представлены альтернативные аминокислоты аланин (Ala), серин (Ser) и треонин (Thr). Thr Треонин показал незначительную консервативность в этих положениях (Рисунок 28). Аминокислотные замены C191A, C231S и C286T были выбраны для экспериментального подтверждения влияния свободных цистеинов на растворимости Chit19. Тот факт, что эти замены консервативны среди выровненных последовательностей и/или являются полярными, а также стерически-подобными или идентичными цистеинами, позволяет надеется, что введение замен не приведет к серьезным изменениям структурных и биохимических свойств ферментов, однако упростит экспрессию и повысит растворимость целевой Chit19.

5.4.3 Сайт-направленный мутагенез и экспрессия белков

Используя олигонуклеотиды (таблица 14 п. 4.2.11 Материалов и методов) и методику QuikChange (п. 4.2.11 Материалов и методов), на основе ранее полученных плазмид (pNIC28_Chit19 и pNIC28_Chit19ΔChBD), были получены шесть экспрессионных конструкций, содержащих замены C191A, C231S, C286T по отдельности и две конструкции, несущие все три мутации.

Полученные плазмиды были трансформированы в штамм *E.coli arctic express (DE3)* по методике (пункт 4.2.13 материалов и методов) и культивированы на стандартной среде (ТВ) культивирования с индукцией 0,3 мМ ИПТГ.

По отдельности мутации C191A, C231S и C286T не приводили к улучшению растворимости рекомбинантной хитиназы как с, так и без ChBD. Трёхточечный мутант, лишенный трех свободных цистеинов в каталитическом домене, так же не

экспрессировался в растворимой форме. Однако совокупный эффект от удаления трех цистеинов и богатого цистеином хитин-связывающего домена хитиназы привел к заметному увеличению растворимости, что позволило получить растворимую форму Chit19 без ChBD (рисунок 30).

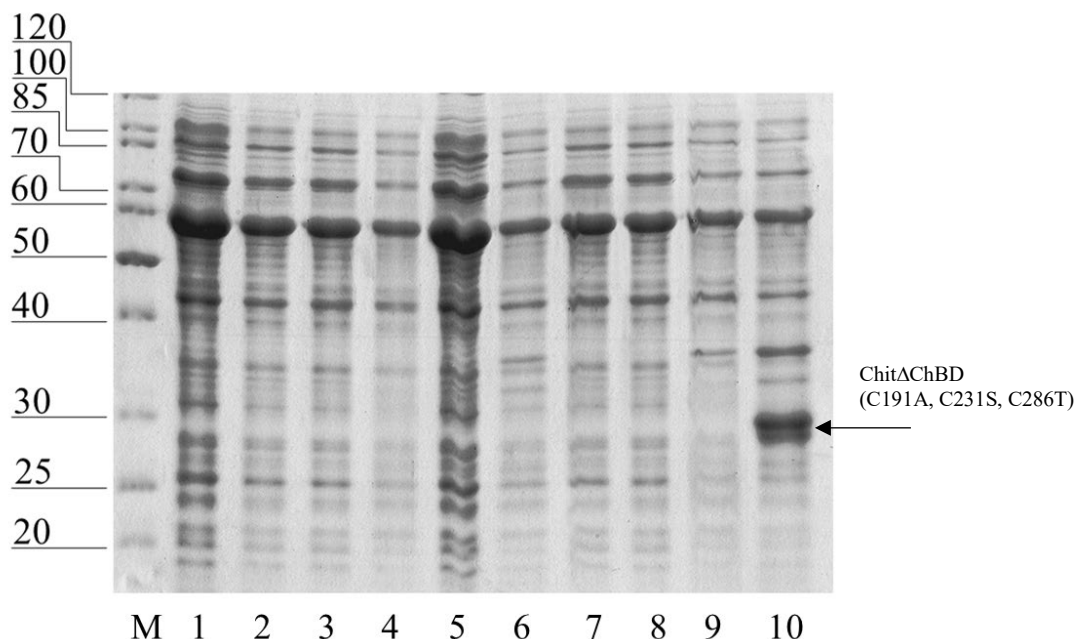


Рисунок 30 – Растворимая фракция *E. coli* после экспрессии мутантных форм Chit19: **1** - Chit19, **2** - Chit19(C191A), **3** - Chit19(C231S), **4** - Chit19 (C286T), **5** - Chit19(C191A, C231S, C286T), **6** - Chit19ΔChBD, **7** - Chit19ΔChBD(C191A), **8** - Chit19ΔChBD(C231S), **9** - Chit19(C286T), **10** - ChitΔChBD (C191A, C231S, C286T)

Выход растворимой Chit19 без ChBD составил около 50 мг с 1 л культуры клеток *E.coli Arctic Express (DE3)*.

Таким образом, использование системы экспрессии *E. coli* не является оптимальной для получения растворимой формы полноразмерной Chit19. Несмотря на то, что путем сайт-направленного мутагенеза удалось получить трехточечный мутант хитиназы без хитин-связывающего домена. Получение растворимой формы полноразмерной хитиназы без процедуры рефолдинга - невозможно. Путем оптимизации процедуры рефолдинга хитиназы из телец включения удалось достичь эффективности рефолдинга 30%, однако масштабирование и применение рефолдинга при промышленном производстве ферментов является дорогостоящей и нетехнологичной процедурой, приводящей к экономической неэффективности процесса получения фермента. Таким образом была

решена, хоть и частично, задача получения ферментного препарата хитиназы *D.capensis* в нативной форме, пригодной для определения биохимических свойств.

5.5 Сравнение биохимических и фунгицидных свойств гомогенных препаратов растительной хитиназы Chit19 и грибной хитиназы Chit18

5.5.1 Выделение хитиназы Chit19 в гомогенной форме

Для определения биохимических и функциональных свойств растительной хитиназы были подготовлены гомогенные препараты хитиназы Chit19, полученные в бактериальной и дрожжевой системах экспрессии. Выделение гомогенных хитиназ проводили аффинной хроматографией по п. 4.2.20 материалов и методов (рисунок 31).

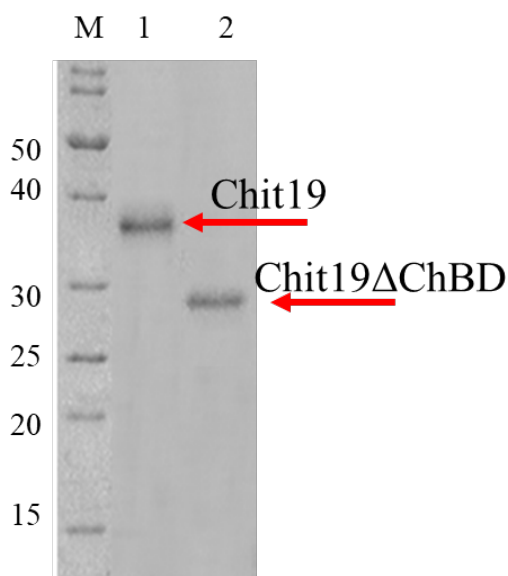


Рисунок 31 – SDS-PAGE электрофорез гомогенных ферментных препаратов Chit19 (1) и Chit19ΔChBD (2)

5.5.2 Получение гомогенного ферментного препарата хитиназы GH18

В качестве контрольной хитиназы при определении биохимических и фунгицидных свойств была выбрана хитиназа из гриба *Myceliophthora thermophila*, относящаяся к 18-ому семейству гликозилгидролаз (GH18). Данный фермент имеет молекулярную массу 42 кДа и является типичным представителем грибных хитиназ, гомологи которой представлены во многих штаммах низших грибов. Хитиназы 18 семьи отвечают за морфогенез и питание грибов. Более 70% секретома *Trichiderma harzianum*, основного биологического средства защиты, используемого на данный момент,

представлено гомологичной хитиназой. Это позволяет грибам *T. harzianum* быть высокоэффективными БСЗР за счет микофагии - способности разрушать клеточную стенку других грибов [192].

Для получения рекомбинантной хитиназы 18 семейства гликози-гидролаз, ген *chit18* был клонирован и экспрессирован в лабораторном реципиентном штамме *Penicillium verruculosum* 537, являющимся базовым продуцентом ряда промышленных ферментов [148]. Был получен рекомбинантный штамм *Penicillium verruculosum* *Chit18*, стабильно секретирующий Chit18 из *M. thermophila* (GenBank AN: NC_016476), под контролем индуцибельного промотора гена *cbh1* [166]. Эффективность экспрессии GH18 в грибной системе составлял 10 г/л культуральной жидкости, схема культивирования была оптимизирована отдельно [193].

Как следует из Рисунка 35 ферментный комплекс, секретируемый *Penicillium verruculosum* *Chit18*, содержит около 55% целевой хитиназы GH18 (данные денситометрии). Для выделения гомогенной формы фермента применяли очистку методом анионообменной хроматографии на колонке Source 15Q при pH 7.0, а затем гель-фильтрацию для удаления низкомолекулярных соединений. Фракции, содержащие хитиназу, подвергали гидрофобной хроматографии на колонке Source 15 Isopropyl. Все элюированные фракции анализировали на содержание целевого белка. Фракцию, содержащую гомогенный препарат Chit18 использовали в дальнейшей работе (Рисунок 32).

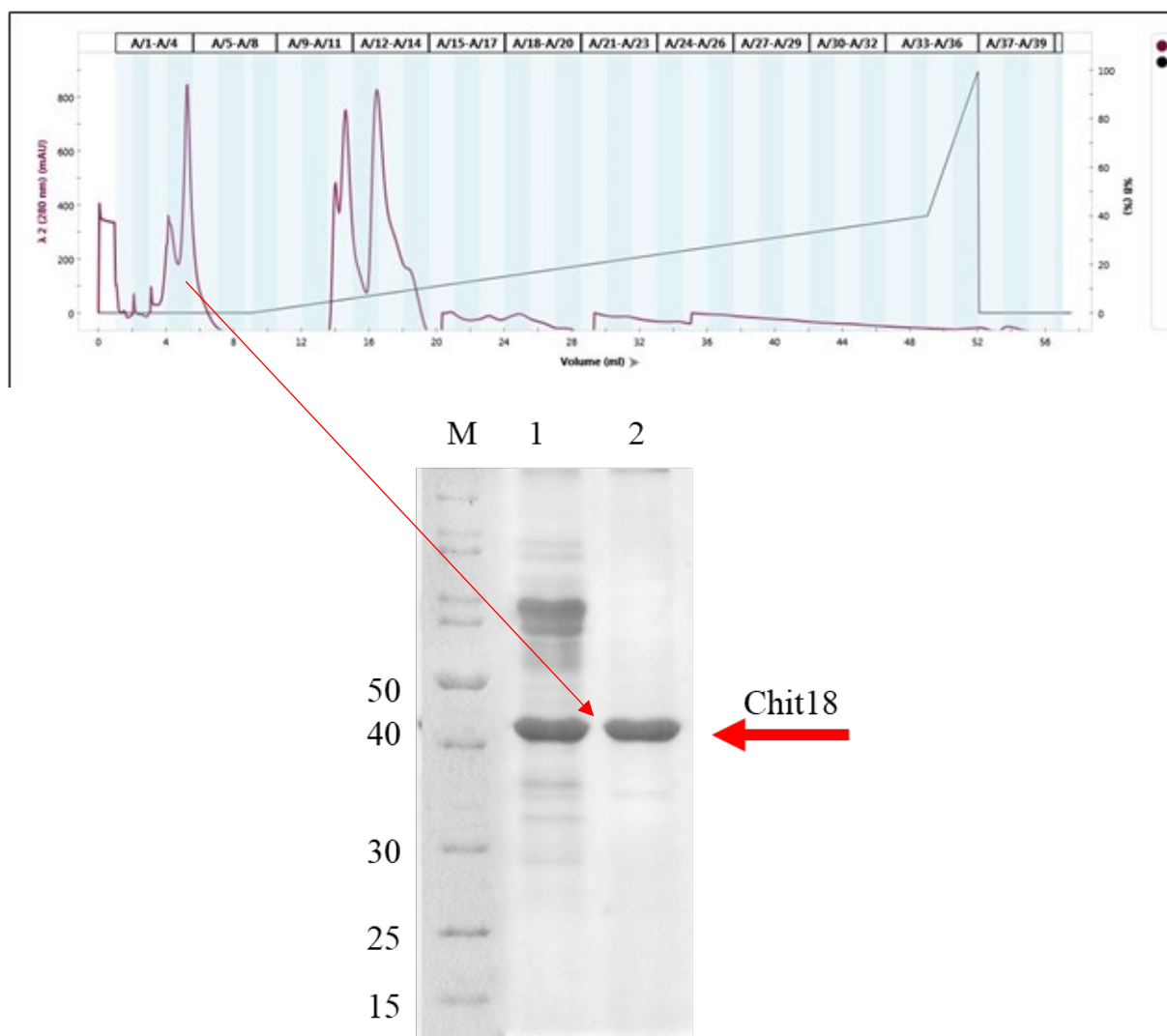


Рисунок 32 – Хроматограмма и SDS-PAGE электрофорез культуральной жидкости штамма *Penicillium verruculosum* Chit18 (1) и гомогенного препарата Chit18 (2)

Для доказательства соответствия выделенного гомогенного фермента хитиназе *M.thermophila* был проведен масс-спектрометрический анализ, который показал – соответствие аминокислотной последовательности искомому белку.

5.5.3 Определение биохимических свойств Chit18 и Chit19

После выделения исходных и мутантных форм рекомбинантных Chit19 и Chit 18 в гомогенном виде, были изучены основные биохимические свойства хитиназ: ферментативные активности по отношению к кристаллическому хитину креветки, коллоидному хитину, хитозану (150 кДа), микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) и ксилану березы, определены Т- и рН-оптимумы, а также исследована температурная инактивации хитиназ.

Для хитиназ, полученных из дрожжей *P.pastoris*, наблюдаемые биохимические характеристики были идентичны хитиназам Chit19 и Chit19 Δ ChBD полученным в ходе рефолдинга, поэтому данные измерений физико-химических параметров будут демонстрироваться без указания источника.

Специфические активности по коллоидному хитину для Chit19 и Chit19 Δ ChBD составили 360 ед/г и 130 ед/г, соответственно. Активность по кристаллическому хитину для Chit19 составила 85 ед/г. Удаление ChBD у Chit19 Δ ChBD, как и ожидалось, привело к утрате активности по нерастворимому субстрату. Однако удаление хитин-связывающего домена снизило активность и по коллоидному хитину в 3 раза.

Исследование каталитических свойств мутантной хитиназы Chit19 Δ ChBD(mut) (с заменами C191A/C231S/C286T) показало, что мутации не привели к существенному изменению специфической активности по коллоидному хитину в сравнении с немутантной формой растительной хитиназы без ChBD.

Грибная Chit18 имела почти в два раза более высокие активности по коллоидному и кристаллическому хитину 690 ед/г и 187 ед/г. Однако интересно отметить, что Chit18 так же обладала побочными активностями по МКЦ и ксилану березы (Таблица 17).

Таблица 17 – Ферментативные активности хитиназ Chit19 и Chit18 по различным субстратам

Субстрат	Ферментативная активность фермента, ед/г			
	Chit19	Chit19 Δ ChBD	Chit19 Δ ChBD (mut)	Chit18
Коллоидный хитин	360 $\pm$ 4	130 $\pm$ 3	121 $\pm$ 5	690 $\pm$ 8
Кристаллический хитин	85 $\pm$ 3	<0,5	<0,5	187 $\pm$ 2
Хитозан 140кДа	66 $\pm$ 2	67 $\pm$ 4	60 $\pm$ 1	530 $\pm$ 6
МКЦ	-	-	-	9 $\pm$ 2
Ксилан березы	-	-	-	51 $\pm$ 1
Кинетические параметры				
Km, мг/мл*	4,73 $\pm$ 0,45	7,4 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,3	1.7 $\pm$ 0.1
Kcat, мин ⁻¹ *	0,50 $\pm$ 0,11	0,62 $\pm$ 0,12	0,54 $\pm$ 0,08	5.1 $\pm$ 0.10
Kcat/Km, мл*(мин*мг) ⁻¹	0,11 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	3,00 $\pm$ 0,13

Каталитические параметры хитиназ оценивали по коллоидному хитину, и данные о начальных скоростях в зависимости от концентрации субстрата приводили в соответствие с графиком Михаэлиса-Ментена.

Для Chit19 $K_m = 4,73 \pm 0,45$ мг/мл, $K_{cat} = 0,47 \pm 0,09$ мин⁻¹ и $K_{cat}/K_m = 9,6 \times 10^{-2}$ мл/мг/мин. тогда как для Ch19ΔChBD $K_m = 7,43 \pm 0,23$ мг/мл, $k_{cat} = 0,63 \pm 0,12$ мин⁻¹ и мл/мг/мин в тех же условиях, что свидетельствует о более высоком сродстве и «оборотистости» для Chit19. Примечательно, что обе формы Chit19, проявляли на порядок большую активность при гидролизе длинных полимерных молекул (кристаллический и коллоидный хитин), чем при гидролизе олигосахаридов: хитогексаозы (GlnNac)-6 и хитотриозы (GlnNac)-3 в одних и тех же условиях. Наиболее гомологичная хитиназа из *Oryza sativa*, имеет несколько более высокие значения K_m (1,9 мг/мл) по коллоидному хитину, однако в работе, описывающей свойства этой хитиназы не приведены значения K_{cat} , что затрудняет дальнейшее сравнение [194]. Chit18 является гораздо более эффективным ферментом для гидролиза всех специфичных субстратов, что подтверждается как удельными активностями так и каталитическими константами.

pH-оптимум растительных хитиназ, измеренный по коллоидному хитину, находился в районе pH 5.5, что соответствует стандартным значениям для кислых хитиназ растений [195]. Удаление ChBD домена не приводило к изменению pH оптимума, однако мутированная форма GH19 имела сдвиг pH в более кислую область (5.0). Грибная Chit18 демонстрировала более широкий оптимум, проявляя высокую активность по коллоидному хитину в диапазоне pH 3.5-6.5 (рисунок 33)

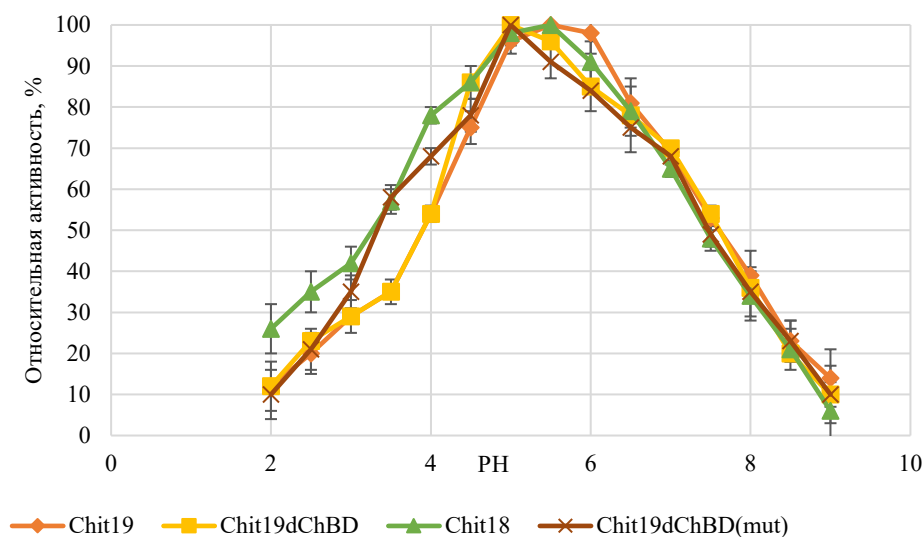


Рисунок 33 – pH- оптимум для Chit19, Chit19ΔChBD, Chit19ΔChBD(mut) и Chit18

Температурный оптимум Chit19 находился в диапазоне 50-55°C, что характеризует полученную хитиназу как фермент с высоким температурным оптимумом. Однако

следует отметить, что хитиназа сохраняет более 50% активности в широком диапазоне температур (30-65°C). Удаление хитин-связывающего домена не оказывает влияния на T-оптимум, равно как и замена цистеинов на гидрофобные а/к. Chit18 имеет более высокий T-оптимум – 60°C, однако при этом активность при низких температурах (30-50°C) существенно ниже, и в целом для грибной хитиназы характерен более узкий T-оптимум (рисунок 34).

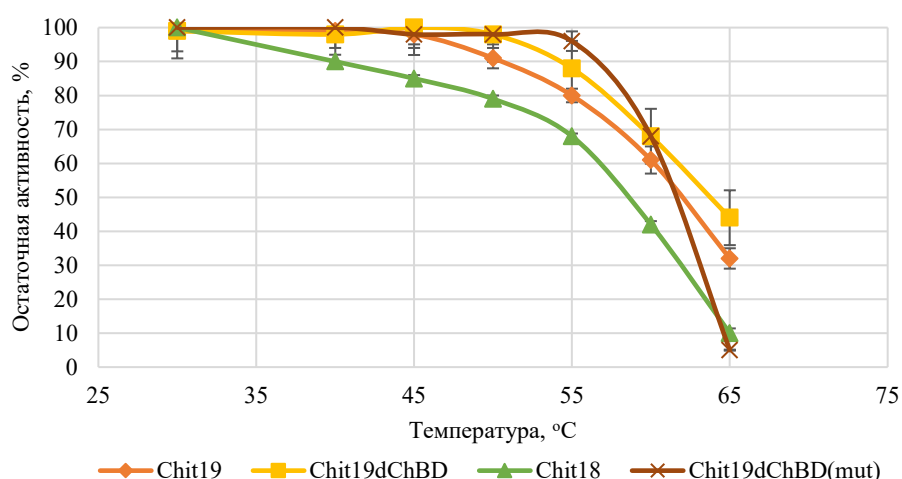


Рисунок 34 – Температурный оптимум для Chit19, Chit19ΔChBD, Chit19ΔChBD(mut) и Chit18

Результаты по анализу стабильности ферментов при различных температурах выявили существенное влияние аминокислотных замен на стабильность. Так замена трех цистеинов привела к стабилизации Chit19 при температурах 30-50°C, однако стабильность при высоких температурах (>50°C) снизилась. При 65°C происходила быстрая инактивация мутантной формы фермента, тогда как полноразмерная Chit19 и Chit19 без домена сохраняли остаточную активность на уровне 32 и 44%, соответственно. Несмотря на более высокий T-оптимум, Chit18 по сравнению с Chit19, достаточно быстро инактивируется при температурах свыше 40°C (рисунок 35).

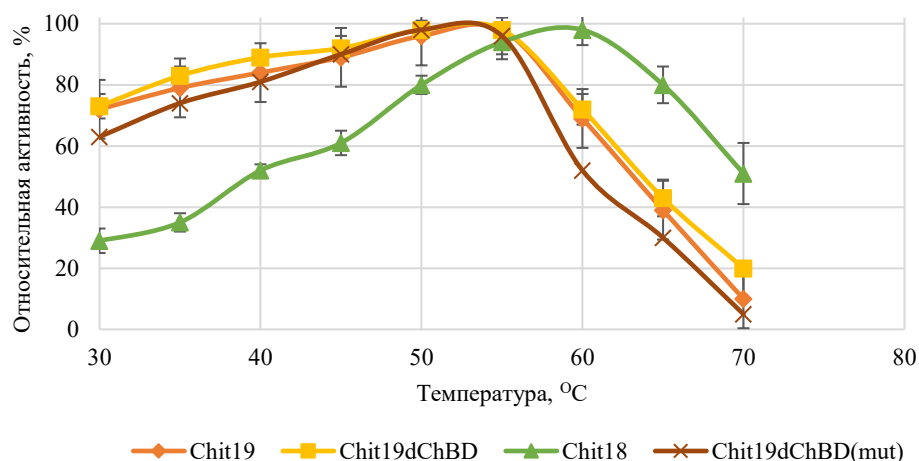


Рисунок 35 – Термостабильность различных форм хитиназ Chit19, Chit19ΔChBD, Chit19ΔChBD(mut) и Chit18

Все результаты, полученные в данном разделе приведены в таблице 18. Данные по температурному и pH оптимуму согласуются с уже известными свойствами хитиназ GH19. Так, хитиназа из риса имела pH оптимум 4.8 и температурный оптимум 65°C; для хитиназы из ячменя оптимальными являлись параметры 5.0 и 45°C, соответственно [196,197]. Хитиназа из росянки круглолистной имела оптимум действия при температуре 37°C и 4.5-5.0 pH [175].

Таблица 18 – Сводная таблица биохимических характеристик хитиназ

Параметр	Chit18	Chit19	Chit19ΔChBD	Chit19ΔChBD(mut)
pH-оптимум	5.0	55	55	52
Диапазон pH, активность ≥80%	4.0-6.0	4.5-6.5	4.5-5.8	4.5-5.8
Диапазон pH, активность ≥50%	3.5-7.0	4.0-7.5	4.0-7.5	3.5-7.5
Температурный оптимум, ° C	60	55	55	50-52
Температурный диапазон, активность ≥80%, ° C	52-65	35-58	35-58	40-56
Температурный диапазон, активность ≥50%, ° C	45-75	30-63	30-64	30-60
Остаточная активность после инкубации при 50°C, %	79	91	88	98
Остаточная активность после инкубации при 65°C, %	8	32	39	5

Подводя итог, следует отметить, что Chit19 - высокоспецифичный активный фермент - имеет удельную активность 360 ед/ г для коллоидного хитина и 84,5 ед / г для кристаллического хитина (таблица 17), что сопоставимо с активностью хитиназы из

Dionaëa muscipula [198]. Однако по активности полученная хитиназа существенно уступает хитиназе *Drosera rotundofolia*, что может быть связано с особенностями используемых субстратов измерения и свойствами самой хитиназы. Обладая значительно более высокой каталитической активностью, хитиназа *D. rotundofolia* имеет худшую термическую стабильность (время полуинактивации при 40°C – 30 минут), низкий температурный оптимум (32-37°C) и узкий оптимум pH (4.5-5.6), при котором активность [175]. Оптимум действия хитиназы *Drosera capensis* составляет 55° С и pH 5.5.

Удаление хитин-связывающего домена привело к снижению удельной каталитической активности более чем в 3 раза по коллоидному хитину. Следует отметить, что в аналогичном исследовании хитиназы GH19 из табака [199] удаление хитин-связывающего домена не привело к изменению каталитической активности, но значительно снизило фунгицидную активность. Такое противоречие не редкость в исследованиях влияния хитин-связывающего домена на активность. Вклад хитин-связывающего домена в каталитическую активность хитиназ семейства 19 может различаться и требует дополнительных исследований в каждом отдельном случае.

5.5.4 Способность гидролизовать клеточную стенку патогена

Рассматривая особенности клеточной стенки грибов (в разделе 3.1.3 обзора литературы), было отмечено, что грибы имеют ряд возможностей модификации клеточной стенки, препятствующей гидролизу. Для анализа способности хитиназ гидролизовать КГС проводили эксперименты обработки грибной биомассы хитиназами из двух семейств 18 и 19.

Грибная биомасса низшего гриба *Penicillium canescens* использовались в качестве источника грибного мицелия. По литературным данным, около 40% массы клеточной стенки представляет собой хитин, остальные полисахариды это преимущественно гликаны, доля которых доходит до 50%. Мицелий обрабатывали препаратами Chit19 и Chit18 в дозе 10 мг белка на 1 г влажной биомассы гриба (рисунок 36).

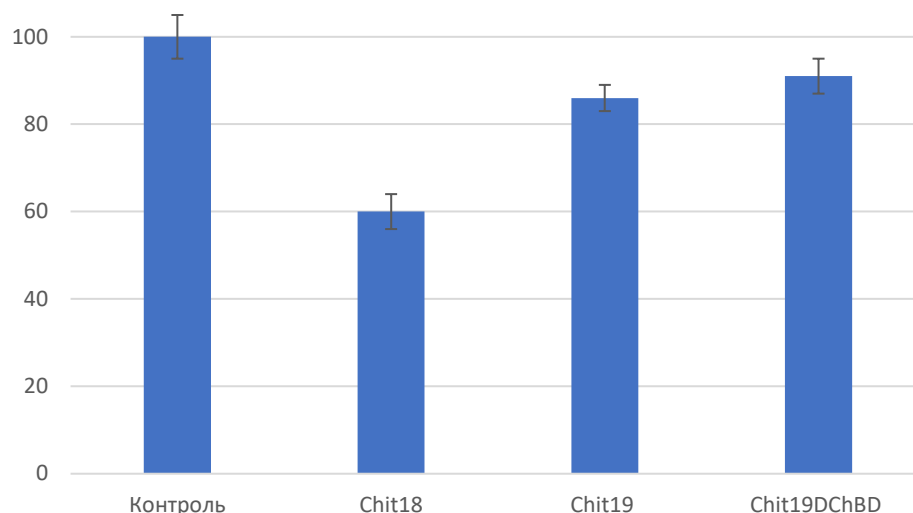


Рисунок 36 – потери массы мицелия при обработке различными препаратами хитиназ

Chit18 активно гидролизовала клеточную стенку гриба, масса *P. canescens* уменьшалась на 40% за 24 часа обработки. При этом препарат рекомбинантных хитиназ Chit19 и Chit19ΔChBD привел к уменьшению массы лишь на 10% при тех же условиях обработки. Если соотносить данные гидролиза очищенного хитина креветки и клеточной стенки гриба *P. canescens*, то четко прослеживаются схожая динамика эффективности гидролиза от измеренной удельной активности, независимо от субстрата.

5.6 Определение фунгицидной активности хитиназ

5.6.1 Исследование фунгицидной активности хитиназ против *Parastagonospora nodorum*

Использование рефолдинга позволяет получить полностью функциональную хитиназу с точки зрения ферментативной активности. Для установления фунгицидных свойств, на первом этапе, очищенные ферментные препараты Chit19 и Chit19ΔChBD, полученные в ходе рефолдинга, тестировали против патогена *P.nodorum*, вызывающего септориоз злаковых, винограда и подсолнечника. *P.nodorum* некротрофный гриб, который вызывает поражение листьев, и является одним из самых опасных патогенов растений на территории РФ, причиняя суммарно, более 50% от общего ущерба.

Для определения фунгицидной активности, листья пшеницы заражали спорами патогена и обрабатывали очищенными препаратами хитиназ в соответствии с 4.2.26 материалов и методов. Результаты представлены на рисунке 37.

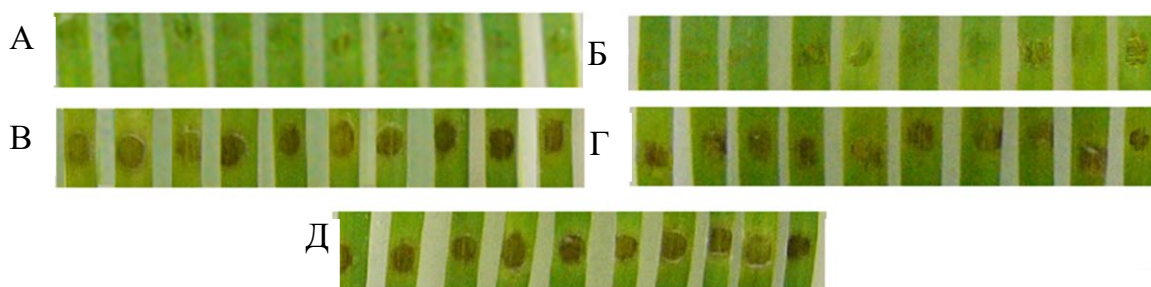


Рисунок 37 - Смягчение симптомов заболевания на срезах листьев из отделившихся листьев пшеницы в результате применения повторно свернутого фермента. Верхние (дистальные) части срезов листа, инокулированные суспензией конидий *P. nodorum*, содержащей: А) Chit19, б) Chit19ΔChBD; В), Г) - нижние (базальные) части тех же срезов листа, инокулированные конидиями, суспендированными в Na-ацетатном буфере; Д) базальные части контрольных срезов листьев, засеянные конидиями *P. nodorum*, суспендированными в дистиллированной воде

Хитиназа после рефолдинга эффективно предотвращала развитие болезни, вызванной известным фитопатогеном пшеницы *P. nodorum*, приводящим к некрозам, на листьях пшеницы (Рисунок 37Д). Chit19ΔChBD, приводила к значительному ослаблению симптомов заболевания (Рисунок 37А) по сравнению с контролем (рисунок 37Д).

Параллельно с Chit19 тестировали Chit18, которая показывала в два раза более высокие значения активности по коллоидному хитину, однако была не эффективна для подавления роста фитопатогенов (Рисунок 38).

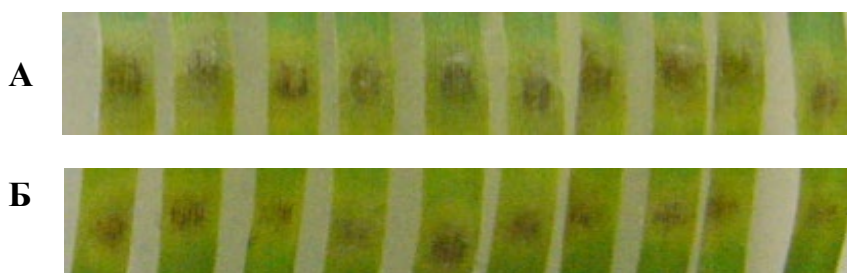


Рисунок 38 - Верхние (дистальные) части срезов листа, инокулированные суспензией конидий *P. nodorum*, содержащей: А) хитиназу Chit18 из *M. thermophila*.; Б) нижние (базальные) части тех же срезов листа, инокулированные конидиями, суспендированными в Na-ацетатном буферном растворе

Подавления роста *P. Nodorum* не наблюдалась в дозировках 0,1-10 мг/мл гомогенного ферментного препарата Chit18.

Анализируя полученные результаты, отмечено, что интенсивность симптомов снижалась более чем на 70% при рабочей концентрации фермента 0,5 мг/мл (для Chit19 и Chit19ΔChBD), что свидетельствует о высокой эффективности исследуемых хитиназ против патогена. К сожалению, практически все работы, посвященные исследованию защитного действия хитиназ осуществлялись не на листьях растений, а на синтетических средах, что сильно затрудняет количественное сравнение фунгицидных свойств хитиназ и их минимально действующие концентрации. Однако одна из пионерских работ по исследованию хитиназы из фасоли, показала, что минимальная дозировка хитиназы, которая обеспечивала защиту растения от септориоза, составила 2мг/мл в растворе для опрыскивания листьев [200].

5.6.2 Исследование фунгицидной активности хитиназ против спор *Fusarium culmorum*

Использование хитиназ для борьбы с патогенами на поверхности листа является хорошей стратегией, однако требует большого количества рекомбинантного ферментного препарата. Вероятнее всего на первых этапах внедрения БСЗР хитиназы будут использовать как протравочные агенты, для первичной обработки семян. Среди известных БСЗР нет пригодных для этого препаратов. При протравливании, основной задачей препарата является ингибирование прорастания спор патогенов, присутствующих на семенах.

Споры фитопатогенного гриба *F. culmorum* проращивали растворах с разной концентрацией препаратов хитиназы в лунках микропланшета в течение 24 часов. Затем подсчитывали число проросших спор в каждой лунке (Рисунок 39).

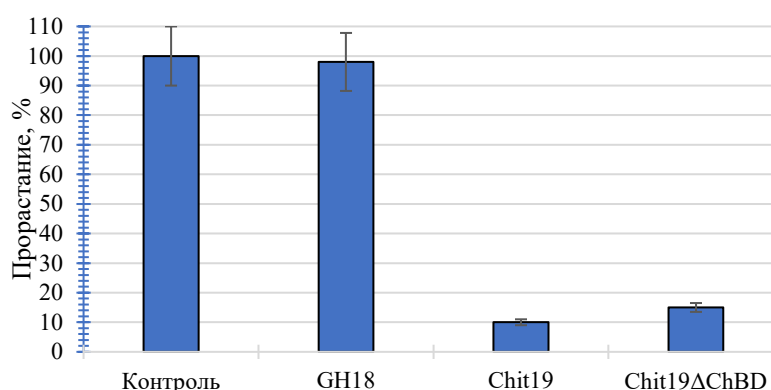


Рисунок 39 – Показатели прорастаемости спор *F. culmorum* после обработки различными типами хитиназ

При концентрации 0,1 мг/мл хитиназы Chit19, независимо от наличия ChBD домена проявляли высокую фунгицидную активность, эффективно подавляя прорастание спор патогена. Хитиназа 18 семейства, как и в случае с экспериментами по подавлению вегетативного роста *P.nodorum*, показала эффективность сравнимую с контролем.

Хитиназы 19 семейства гораздо менее активно гидролизуют колючую клетку грибов (как показано разделе 5.5), однако их фунгицидная активность на порядок превосходит активность Chit18. Результаты анализа фунгицидной активности против *P.nodorum* и *F.culmorum*, не показали корреляции с каталитическими активностями, что стало неожиданным результатом, так как именно каталитическая активность хитиназ считается основным драйвером возникновения хитин-индуцируемого иммунитета растений. Вероятно, существуют иные механизмы, воздействия хитиназы на патогенные грибы, не связанные с каталитической активностью.

5.9.3 Мутагенез каталитического центра.

Для подтверждения гипотезы наличия негидролитического механизма ингибирования роста фитопатогенов, был произведен мутагенез остатков двух консервативных глутаминовых кислот в положении 130 и 152. Полученный мутант Chit19 (E130G, E152G) демонстрировал отсутствие ферментативной активности по коллоидному и кристаллическому хитину. Однако при тестировании против патогенов он был способен подавлять рост патогена *P.nodorum* с той же эффективностью, что и каталитически активная Chit19 (Рисунок 40).

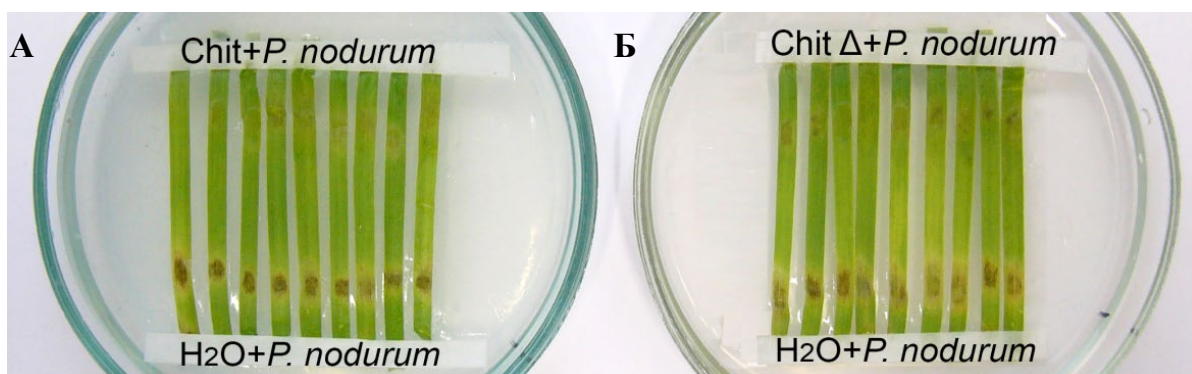


Рисунок 40 - Листья инокулированные суспензией конидий *P.nodorum*, содержащей: А) активную хитиназу 19 семейства из *D.capensis* ; Б) каталитически не активный мутант Chit19 (E130G, E152G) из *D.capensis*, нижние (базальные) части тех же срезов листа, инокулированные конидиями, суспендированными в Na-ацетатном буферном растворе.

Из полученных результатов, очевидно, что дуализм активность является важной характеристикой в дополнение к их каталитическим свойствам. Фунгицидная активность Chit19, по-видимому, не связана с каталитической активностью хитиназы и объясняется другими механизмами. Предположительно, хитиназа с инактивированным каталитическим центром может работать подобно хитолектинам растений [200], ингибируя рост патогена за счет адресного действия хитиназы на кончики растущего гифа, благодаря чему угнетается рост патогена. Хитиназы 18 семейства, несмотря на высокую каталитическую активность, не способны угнетать развитие фитопатогена, что в свою очередь может объясняться природными механизмами защиты грибов, которые позволяют им избегать «самопереваривания» родственным, гомологичным хитиназам.

5.7 Экспрессия Chit19 в *Pichia pastoris*

Полученные в п.5.6 результаты показывают, что хитиназа из *D.capensis* является перспективным БСЗР и эффективно ингибирует рост фитопатогенов, однако проблема получения растворимой формы полноразмерной хитиназы, без применения процедуры рефолдинга, не была решена на предыдущих этапах.

Для решения данной задачи была применена экспрессионная система на основе дрожжей *Pichia pastoris*. Так как дрожжи являются эукариотами, то им доступен весь спектр возможностей высших эукариот по посттрансляционной модификации белка, что позволит получать растительную хитиназу в растворимой форме. Для получения рекомбинантных белков в дрожжах существуют коммерчески доступные вектора серии pGAPz. Однако они обеспечивают низкое число интеграций экспрессионной кассеты и хорошо подходят для лабораторных условий, однако добиться высокой продуктивности рекомбинантных штаммов при использовании данных систем – затруднительно [201].

5.7.1 Получение вектора pPIG

Базовая идея вектора состоит в конструировании модульной системы, позволяющей быстро собирать плазмидные вектора и варьировать промоторы, сигнальные пептиды и маркеры селекции. В качестве точки интеграции были выбраны гены 18S rRNA. Известно, что в геноме дрожжей несколько локусов 18S rRNA находящихся на концах каждой хромосомы. По разным оценкам количество этих генов варьируется от 8 до 25 [202]. Рекомбинация по сайтам 18S rRNA должна иметь несколько преимуществ по сравнению со стандартными сайтами интеграции (промотор AOX1 или ген His4): увеличенное количество копий и более высокий уровень транскрипции.

Для создания вектора за основу был взят фрагмент из коммерческой плазмиды pUC19 [203]. Фрагмент ДНК размером 1747 п.о., кодирующий последовательность *ori* и гена устойчивости к ампицилину *bla* получали при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы (Thermo Fisher Scientific) и праймеров N3865F и N16R (таблица 19).

Таблица 19 – Структура олигонуклеотидов, использованных при получении интеграционного вектора pPIG-1

Название	Последовательность 5'→3'
N1F	TGGAAAAACGGGCCCCGCAGGTTACCTACGGAA
N16R	CGGGCCCGTTTTTCCATAGGCTCCGC
N749F	CTGGGGTACCATCCTTTTTTGTAGAAATGTCTTGG
N763R	AGGATGGTACCCAGATACCGTCGTAGTCTT
N1237F	CTATCCATATGGAAATGAGATTTCTTCAATT
N1254R	TCATTTCCATATGGATAGTTGTTCAATTGAT
N1520F	TGCAGGCGGCCGCGAGCTCATCATCATCATCATTG
N1534R	TCGCGGCCCGCCTGCAGAAGCTTCAGCCTCTCTTTTC
N3062F	ATTTGCTCATCTTCGATCCCCTAAC
N3077R	CGAAGATGAGCAAATTAAAGCCTTCGAGC
N3865F	GAGACAAGGGCCCGCGGAACCCCTATTTGTT
N3882R	TCCGCGGGCCCTTGTCTCAAAGATTAAGC

На 5'-концах олигонуклеотидов добавлены последовательности, кодирующие сайты рестрикции AраI. В качестве матрицы для ПЦР используют плазмиду pUC19.

Фрагмент ДНК, кодирующий кассету обеспечивающую устойчивость трансформантов к Зеоцину, который состоит из: фрагмента множественного сайта клонирования, 6xHis-Tag метки, AOX1 терминатора, дрожжевого TEF1 промотора, бактериального промотора EM7, гена *ble*, CYC1 терминатор размером 1558 п.о. получали при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N749F и N1254R. В качестве матрицы для ПЦР использовали коммерческую плазмиду pPICZAα (Thermo Fisher Scientific Каталожный номер: V19020). Фрагмент получали при помощи ПЦР с использованием Phusion™ High-Fidelity DNA полимеразы и праймеров N1520F и N3077R.

Фрагмент ДНК, кодирующий сигнал секреции α-фактора и часть множественного сайта клонирования длиной 298 п.о. получали при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов N1237F и N1534R. В качестве матрицы для ПЦР использовали коммерческую плазмиду pPICZAα.

Для получения нижеперечисленных элементов конструкции, из штамма *Pichia pastoris* GS115 (Thermo Fisher Scientific cat. № C18100) выделяли хромосомную ДНК (пункт 4.2.3), которая служит матрицей для синтеза GAP промотора, и фрагментов гена 18S рРНК.

Фрагмент ДНК кодирующий промотор глицеральдегид-3-фосфат – дегидрогеназы (*GAP промотор*) [GenBank NC_012964.1] длиной 506 п.о. фланкированный сайтами рестрикции *KpnI* и *NdeI*, получили при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов N749F и N1254R. В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК штамма *Pichia pastoris* GS115. Фрагмент, кодирующий 3' конец 18S рРНК получали при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов N1F и N763R. В качестве матрицы для ПЦР использовали геномную ДНК штамма *Pichia pastoris* GS115. Фрагмент, кодирующий 5'-конец 18S рРНК получали при помощи ПЦР с использованием олигонуклеотидов N3062F и N3882R. В качестве матрицы для ПЦР используют геномную ДНК штамма *Pichia pastoris* GS115.

Аmplified фрагменты ДНК очищали из геля при помощи набора Qiagen (Qiagen). Далее очищенные фрагменты смешивали в эквимольных количествах и лигировали по методу Гибсона с применением Gibson Assembly® Master Mix (NEB cat. № E2611S). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* One Shot™ Mach1™ (Thermo Fisher Scientific cat. № C862003), после чего, ампициллин-резистентные колонии выращивали в 5 мл среды LB и выделяли плазмидную ДНК. Правильность сборки всех элементов проверяли путем секвенирования по методу Сэнгера (выполнено в компании ООО «Синтол»). При расщеплении рестриктазами: *ApaI*, *KpnI*, *HindIII* и *NdeI*, вектор pPIG-1 дает фрагменты массой 2363, 1733, 743 и 270 п.о., что позволяет надежно идентифицировать данную конструкцию.

Схема интеграционного вектора pPIG-1 приведено на Рисунке 41.

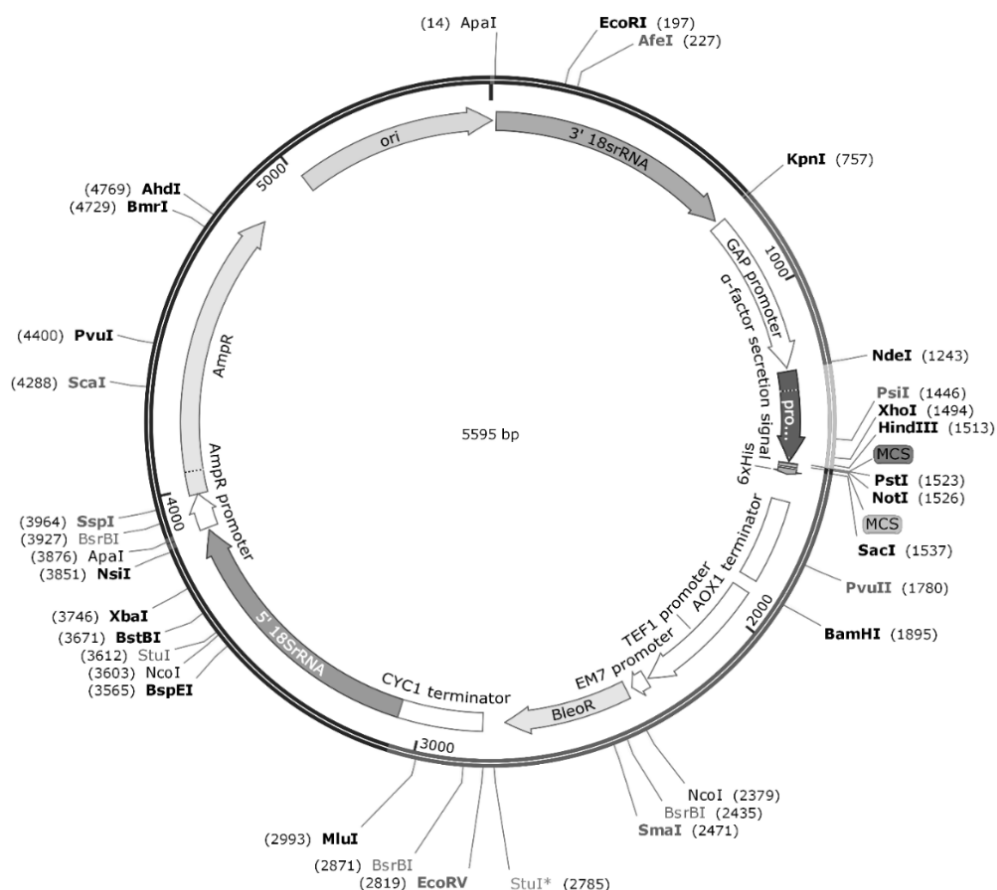


Рисунок 41 – Схема вектора pPIG-1

5.7.2 Получение плазмид pPIG_Chit19 и pPIG_Chit19ΔChBD

Синтетический ген растительной хитиназы Chit19 с оптимизированными кодонами (Евроген, Россия) амплифицировали при помощи Phusion™ High-Fidelity полимеразы и ген-специфичных олигонуклеотидов (таблица 12). Полученные ПЦР-фрагменты обрабатывали рестриктазами HindIII и NotI и выделяли из геля.

Вектор pPIG-1 обрабатывали рестриктазами HindIII и NotI, после чего очищали из геля. Вектор и вставку смешивали в соотношении 1 к 5 и лигировали T4 лигазой. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli One Shot™ Mach1™*, после стандартной процедуры трансформации, ампициллин-резистентные колонии выращивали в 5 мл среды LB, после чего выделяли плазмидную ДНК. Правильность сборки плазмидной ДНК проверяли путем секвенирования по методу Сэнгера в обоих направлениях. В результате была получена конструкция pPIG_Chit19 и pPIG_Chit19ΔChBD.

Полученные конструкции трансформировали в реципиентный штамм *Pichia pastoris* GS115 в соответствии с процедурой (пункт 4.2.18). В результате были получены штаммы продуценты *P. pastoris* pPIG_Chit19 и pPIG_Chit19ΔChBD.

Далее проводили скрининг 15-ти клонов, анализируя продуктивность рекомбинантных штаммов по Chit19. Штаммы культивировали в 10 мл стандартной среды YPD с добавлением 3% глицерина в течение 36 часов и анализировали культуральную жидкость методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Рисунок 42).

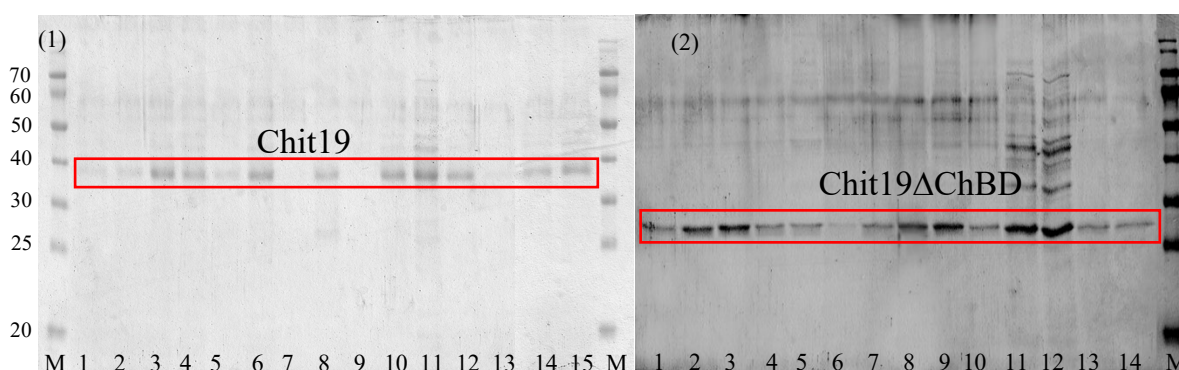


Рисунок 42 – SDS-PAGE электрофорез образцов культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, продуцентов полноразмерной хитиназы GH19 (1) и хитиназы без ChBD (2)

По сравнению с векторными системами pGAPz (Invitrogen, США), имели более разнообразный профиль экспрессии. За 36 часов культивирования, наблюдался выход рекомбинантной GH19 в диапазоне от 20 до 150 мг/л для Chit19 и от 50 до 240мг/мл для Chit19ΔChBD. В случае использования коммерческих векторов, полученные клоны давали продуктивность в диапазоне 80-100 мг/л. Вероятнее всего подобная дисперсия может быть объяснена различным количеством копий. Для дальнейшей работы отобраны штаммы pPPIG_Chit19/11 и pPPIG_Chit19ΔChBD/12, характеризующиеся наибольшей продуктивностью и ферментативной активностью по коллоидному хитину.

5.7.3 Определение частоты интеграции структурных элементов вектора pPIG-1_chit19 в геном *P.pastoris*

Для измерения частоты интеграции конструкции *pPIG_Chit19* в геном *P.pastoris* используют ПЦР - в реальном времени. В штаммах продуцентах pPIG_Chit19/11 и pPPIG_Chit19ΔChBD/11. анализировали количество последовательностей *pAOX1* (промотор алкогольоксидазы 1) *chit19* (хитиназа *D.capensis*), *pGAP* (промотор

глицеральдегид-3-фосфат – дегидрогеназы) и *act* (актин) в геноме трансформантов, показавших наибольшую продуктивность. В качестве контроля и образца для построения калибровочных кривых использовали родительский штамм *Pichia pastoris* GS115. Для анализа зависимости продуктивности штамма от количества интегрированных экспрессионных кассет так же были проанализированы *Pichia pastoris* показывающие меньшую продуктивность. Результаты представлены в Таблице 20.

Таблица 20 - Количество копий структурных элементов в геноме продуцентов хитиназы 19 семейства pPIG_Chit19 и pPIIG_Chit19ΔChBD

Штамм <i>P.pastoris</i>	Продуктивность, мг/л	Количество копий			
		<i>pAOX1</i>	<i>pGAP</i>	<i>chit19</i>	<i>act</i>
GS115	0	1	1	0	1
<i>pPIG_chit19/12</i>	150±13	1	14	12	1
<i>pPIG_chit19/1</i>	23±4	1	8	7	1
<i>pPIG_chit19/15</i>	104±3	1	6	4	1
<i>pPIG_chit19/8</i>	52±9	1	12	11	1
<i>pPIIG_Chit19ΔChBD/11</i>	240±8	1	11	10	1
<i>pPIIG_Chit19ΔChBD/4</i>	52±3	1	5	4	1
<i>pPIIG_Chit19ΔChBD/2</i>	104±10	1	7	6	1
<i>pPIIG_Chit19ΔChBD/9</i>	187±8	1	12	11	1

Для проверки точности и стабильности количественного определения были построены стандартные кривые для всех генов. Значения коэффициента вариации (CV) для данных последовательностей составили от 0,55% до 6,15%, а значения стандартного отклонения (SD) варьировалось от 0,03 до 0,16. Эти данные показали, что значения CV и SD незначительно различались в экспериментах, указывая на достоверность полученных результатов.

Анализируя полученные данные, можно заметить, что нет прямой зависимости между титром гена и продуктивностью штамма. Так, например, *pPIIG_Chit19ΔChBD/11* имеет 10 копий *Chit19ΔChBD* против 11 копий у *pPIIG_Chit19ΔChBD/9*, однако продуктивность штамма *ChBD/11* выше в полтора раза. Данное несоответствие возможно объяснить, тем что интеграция происходит в разные хромосомы, вследствие чего вклад каждой копии в конечный результат неравномерен. Таким образом, показано, что локализация экспрессионной кассеты в геноме является важным фактором, влияющим на конечный выход рекомбинантного фермента.

5.7.4 Ферментация штаммов продуцентов *Pichia pastoris*

Управляемая ферментация в условиях хемостата, с контролем параметров, позволяет увеличить выход рекомбинантного фермента в *Pichia pastoris* в 2-20 раз [204]. На первом этапе использовали богатую среду BMGY (пункт 3.3 материалов и методов) с добавкой 0,1 г/л гистидина (штамм является ауксотрофом по гистидину). Стартовая культура засеивалась в однолитровый ферментер в соотношении 1:10 в среду BMGY с содержанием глюкозы 4% по массе и выращивалась до истощения субстрата ($OD_{600}=46$) при 30°C. После чего, в ферментер дробно подавали 40% раствор глюкозы до 1% каждые два часа (30°C, сатурация > 30%, корректировка pH серной кислотой и аммиаком).

Ферментация проводилась 96 часов, в ходе эксперимента периодически осуществлялся анализ оптической плотности (OD_{600}), ферментативной активности по коллоидному хитину (ед/мл), определялось количества белка ($[C_B]$, г/л) и проводился SDS-PAGE электрофорез проб культуральной жидкости. Результаты представлены в Таблицах 21 и 22 и на Рисунке 43.

Таблица 21 – Результаты культивирования для pPPIG_Chit19/10

Время культивирования, ч					
	24	34	48	72	96
OD_{600}	38	47	104	134	160
$[C_B]$, г/л	1,0	-	1,6	2,0	2,2
Активность*, ед/мл	0,46	-	0,57	0,63	0,73

Таблица 22 – Результаты культивирования в pPPIG_Chit19 Δ ChBD/11

Время культивирования, ч					
	24	34	48	72	96
OD_{600}	52	78	137	164	198
$[C_B]$, г/л	1,3	-	2,1	2,3	2,7
Активность*, ед/мл	0,21	-	0,31	0,35	0,47

*- Ферментативная активность определялась по коллоидному хитину (pH 5.0, температура 55°C)

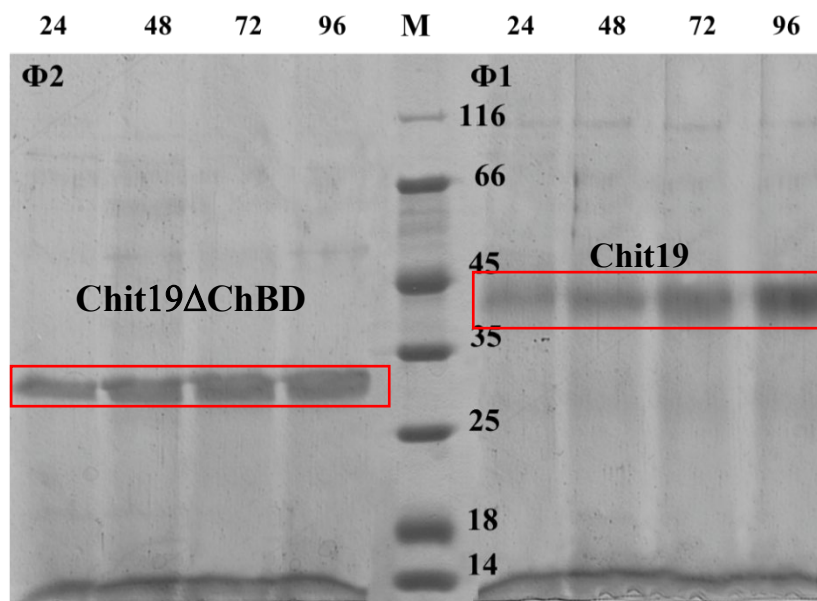


Рисунок 43 – ДСН-ПААГ электрофорез культуральной жидкости в процессе ферментации для pPIIG_Chit19/10 и pPIIG_Chit19ΔChBD/11

Выход полноразмерной Chit19 составил 2,21 г/л, для Chit19 без ChBD выход составил 2,74 г/л. Анализируя гель электрофорез следует отметить, что обе формы фермента явно подвергаются гликозилированию: для полноразмерной хитиназы увеличение молекулярной массы составило около 6 кДа, для хитиназы без домена около 2~3 кДа. В литературе имеется лишь одно свидетельство успешной экспрессии растительной хитиназы гороха в *Pichia pastoris*, однако выход фермента составил 18 мг/л культуральной жидкости при использовании классических коммерческих векторов семейства pPIC [205].

Таким образом было показано, что использование альтернативных точек интеграции в геном *Pichia pastoris* является хорошей стратегией для многокопийной интеграции экспрессионной кассеты. Применив вектор pPIG удалось осуществить экспрессию растворимой формы полноразмерной хитиназы и хитиназы с удаленным хитин-связывающим доменом, обладающей активностью по коллоидному хитину. Благодаря более совершенному трансляционному аппарату, фолдинг хитиназ, вероятно не является сложным для *Pichia pastoris*. Причем количество секретируемого белка через 96 часов ферментации соизмеримо для обеих форм.

Полученная рекомбинантная хитиназа из *P.pastoris* имела рН оптимум 5.5 и температурный оптимум 55°C. Уровни каталитической активности по коллоидному хитину для полноразмерной Chit19 и Chit19ΔChBD составили 331±4 ед/г и 154±9 ед/г

соответственно. Таким образом, полученная хитиназа имела идентичные свойства с хитиназами, полученными методом рефолдинга из телец включения.

5.7.5 Тестирование неочищенной хитиназы, полученной в *P. pastoris*

Для оценки перспектив использования ферментного препарата, осуществляли обработку листьев пшеницы, зараженной фитопатогеном, непосредственно разбавленной культуральной жидкостью после культивирования *P.pastoris* - продуцента рекомбинантной Chit19. В качестве контроля использовалась непосредственно культуральная среда, для оценки ее влияния на патоген (Рисунок 44).

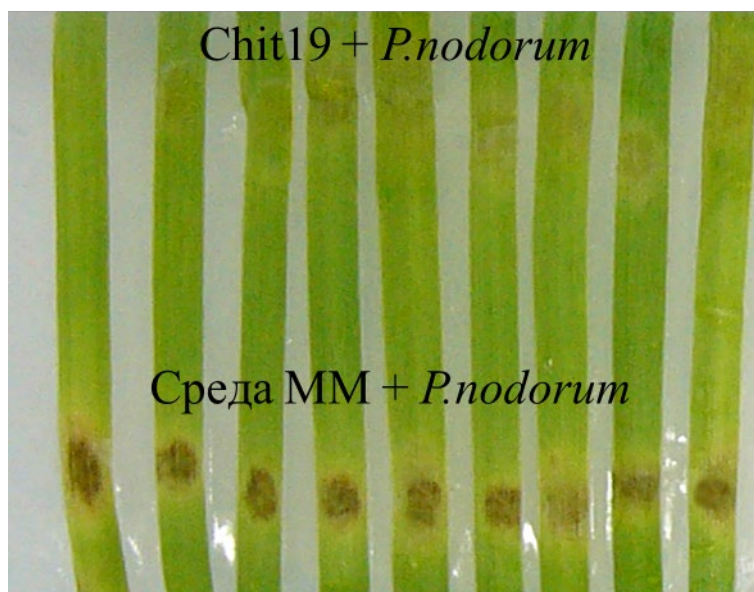


Рисунок 44 – Листья пшеницы обработанные разбавленной культуральной жидкостью, содержащей Chit19 (верхняя часть) и средой MM (нижняя часть).

Таким образом показано, что ферментный препарат, полученный из дрожжей, может применяться непосредственно для обработки растений, без предварительной очистки, что существенно упрощает его применения в качестве БСЗР

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе осуществлен полный цикл разработки нового БСЗР на основе растительного фермента – хитиназы GH19. Был произведен поиск и клонирование генетической последовательности новой хитиназы из *Drosera capensis*, реализована экспрессия в клетках *E.coli*. Сложности в получении растворимой формы фермента были решены путем рационального дизайна белковой глобулы. Определены физико-химические и фунгицидные свойства гомогенной формы ферментов Chit19 и Chit19ΔChBD. В рамках работы была оптимизирована векторная система для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Полученные результаты демонстрируют, что хитиназы действительно могут являться эффективным БСЗР, эффективно подавляя рост патогенов и развитие симптомов заражения. Более того в отличии от БСЗР, основанных на живых организма, возможно комбинированное использование химических фунгицидов в смеси с ферментными препаратами. Возможные перспективы развития работы состоят в: разработке фьюжн конструкций Chit19 с анкерными пептидами для иммобилизации хитиназы на поверхности растения и обеспечения пролонгированного действия; достоверное определение механизмов ингибирования роста фитопатогенов по негидролитическому механизму и разработки методологии поиска новых БСЗР.

ВЫВОДЫ:

- 1) Клонирован ген *chit19* размером 1661 пар оснований, кодирующий новую хитиназу 19 семейства гликозил-гидролаз из хищного растения *D.capensis*. Последовательность гена *chit19* депонирована (GenBank AN: MK093978).
- 2) Осуществлена экспрессия рекомбинантной хитиназы Chit19 с и без хитин-связывающего домена в бактериях *E.coli*, разработана схема рефолдинга хитиназы Chit19. Выход каталитически активного фермента составил 56 мг для полноразмерной хитиназы (Chit19) и 84 мг для хитиназы с удалённым хитин-связывающим доменом (Chit19ΔChBD) с 1 литра культуральной жидкости.
- 3) Проведено молекулярное моделирование поверхности белковой глобулы хитиназы Chit19 и осуществлен сайт-направленный мутагенез поверхностных цистеинов. Показано, что замены C191A, C231S и C286T привели к получению растворимой формы каталитически активной хитиназы в случае Chit19ΔChBD. Выход растворимого рекомбинантного фермента составил 50 мг с 1 литра культуральной жидкости.

- 4) Получены в гомогенном виде хитиназы Chit19 и Chit19 Δ ChBD и определены их биохимические свойства в сравнении с хитиназой Chit18 из *M.thermophila*. Показано, что Chit19 и Chit19 Δ ChBD проявляют высокую фунгицидную активность и способны уменьшать проявления симптомов заражения септориозом пшеницы на 70%, в отличие от хитиназы Chit18.
- 5) Замена каталитически активных остатков глутаминовых кислот в положениях E130G и E152G активного центра хитиназы Chit19 показало, что каталитическая активность хитиназы не является определяющим фактором в её фунгицидной активности и существуют иные механизмы ингибирования роста растительных фитопатогенов.
- 6) На основе модифицированной экспрессионной системы *P.pastoris* созданы новые штаммы-продуценты хитиназы Chit19; продуктивность штаммов *P.pastoris* Chit19 и *P.pastoris* Chit19 Δ ChBD составила 2,2 г/л и 2,7 г/л, соответственно. Полученные Chit19 и Chit19 Δ ChBD обладали фунгицидной активностью по отношению к стандартным фитопатогенам зерна.

VII. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Oerke E.C. Crop losses to pests // Journal of Agricultural Science. 2006. Vol. 144, № 1. P. 31–43.
2. Stetkiewicz S. et al. The impact of fungicide treatment and Integrated Pest Management on barley yields: Analysis of a long term field trials database // European Journal of Agronomy. Elsevier, 2019. Vol. 105. P. 111–118.
3. Geiger F. et al. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland // Basic and Applied Ecology. Urban & Fischer, 2010. Vol. 11, № 2. P. 97–105.
4. Stern V.M. et al. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: The integrated control concept // Hilgardia. University of California Agriculture and Natural Resources (UC ANR), 1959. Vol. 29, № 2. P. 81–101.
5. Appu M. et al. An overview of plant defense-related enzymes responses to biotic stresses // Plant Gene. Elsevier, 2021. Vol. 27. P. 100302.
6. Kitajima S., Sato F. Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function // Journal of Biochemistry. Japanese Biochemical Society, 1999. Vol. 125, № 1. P. 1–8.
7. Karlsson P.S., Pate J.S. Contrasting effects of supplementary feeding of insects or mineral nutrients on the growth and nitrogen and phosphorous economy of pygmy species of *Drosera* // Oecologia. 1992. Vol. 92, № 1. P. 8–13.
8. Синельников И.Г. Клонирование и экспрессия хитиназы (GH19) семейства из *drosera capensis* // Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов: направление подготовки 06.06.01 “Биологические науки”, . 2019. P. 90–93.
9. Vu G.T.H. et al. Comparative genome analysis reveals divergent genome size evolution in a carnivorous plant genus // The Plant Genome. John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 8, № 3. P. plantgenome2015.04.0021.
10. McDonald B.A., Stukenbrock E.H. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: Global threats to agricultural sustainability and food security // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society of London, 2016. Vol. 371, № 1709.
11. Liu X. et al. In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold of strawberry and green mold of citrus by *Aureobasidin A* // International Journal of Food Microbiology. Int J Food Microbiol, 2007. Vol. 119, № 3. P. 223–229.
12. Singh R.P. et al. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control // Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews Inc., 2016. Vol. 54. P. 303–322.
13. Joshi R. A Review on *Colletotrichum spp.* Virulence mechanism against host plant defensive factors // Journal of Medicinal Plants Studies. AkiNik Publications, 2018. Vol. 6, № 6. P. 64–67.
14. Wang Y.-Y. et al. Arbuscular mycorrhiza-mediated resistance in tomato against *Cladosporium fulvum* - induced mould disease // Journal of Phytopathology. Blackwell Publishing Ltd, 2018. Vol. 166, № 1. P. 67–74.

15. Saremi H., Okhovvat S.M., Ashrafi S.J. *Fusarium* diseases as the main soil borne fungal pathogen on plants and their control management with soil solarization in Iran // African Journal of Biotechnology. Academic Journals, 2011. Vol. 10, № 80. P. 18391–18398.
16. Nikitin M. et al. Preserved microarrays for simultaneous detection and identification of six fungal potato pathogens with the use of real-time PCR in matrix format // Biosensors. MDPI AG, 2018. Vol. 8, № 4.
17. Dean R. et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology // Molecular Plant Pathology. 2012. Vol. 13, № 4. P. 414–430.
18. Doehlemann G. et al. Plant Pathogenic Fungi // The Fungal Kingdom. American Society of Microbiology, 2017. Vol. 5, № 1. P. 703–726.
19. Orton E.S., Deller S., Brown J.K.M. *Mycosphaerella graminicola*: From genomics to disease control // Molecular Plant Pathology. Wiley-Blackwell, 2011. Vol. 12, № 5. P. 413–424.
20. Godfray H.C.J., Mason-D'croz D., Robinson S. Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Royal Society of London, 2016. Vol. 371, № 1709.
21. Zhong Y. et al. Mycophenolic Acid as a Promising Fungal Dimorphism Inhibitor to Control Sugar Cane Disease Caused by *Sporisorium scitamineum* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. American Chemical Society, 2019. Vol. 67, № 1. P. 112–119.
22. Barnabas L. et al. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum* // Proteomics., 2016. Vol. 16, № 7. P. 1111–1122.
23. Cools H.J., Fraaije B.A. Are azole fungicides losing ground against Septoria wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola* // Pest Management Science. Pest Manag Sci, 2008. Vol. 64, № 7. P. 681–684.
24. Ribas e Ribas A.D. et al. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review // Brazilian Journal of Microbiology. Elsevier Editora Ltda, 2016. Vol. 47, № 4. P. 793–799.
25. Chowdhury S., Basu A., Kundu S. Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases // Scientific Reports 2017 7:1. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–17.
26. De Silva N.I. et al. Mycosphere Essays 9: Defining biotrophs and hemibiotrophs // *Mycosphere*. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, 2016. Vol. 7, № 5. P. 545–559.
27. Spanu P.D., Panstruga R. Editorial: Biotrophic Plant-Microbe Interactions // Frontiers in Plant Science. Frontiers, 2017. Vol. 0. P. 192.
28. Li W. et al. Cell Death in Plant Immune Response to Necrotrophs // J Plant Biochem Physiol. 2013. Vol. 1. P. 103.
29. Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators // International Journal of Environmental Research and Public Health. Int J Environ Res Public Health, 2011. Vol. 8, № 5. P. 1402–1419.

30. Lucas J.A., Hawkins N.J., Fraaije B.A. The evolution of fungicide resistance // *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 2015. Vol. 90. P. 29–92.
31. Fernández-Ortuño D. et al. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi // *International Microbiology*. Sociedad Espanola de Microbiologia, 2008. Vol. 11, № 1. P. 1–9.
32. Ma Z., Michailides T.J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi // *Crop Protection*. 2005. Vol. 24, № 10. P. 853–863.
33. Walker A.-S. et al. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains // *Pest Management Science*., 2009. Vol. 65, № 8. P. 906–915.
34. L S. et al. Fragments of a Wheat Hevein-Like Antimicrobial Peptide Augment the Inhibitory Effect of a Triazole Fungicide on Spore Germination of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* // *Antibiotics*., 2020. Vol. 9, № 12. P. 1–17.
35. Free S.J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis // *Advances in Genetics*. Academic Press Inc., 2013. Vol. 81. P. 33–82.
36. Latgé J.P., Beauvais A. Functional duality of the cell wall // *Current Opinion in Microbiology*., 2014. Vol. 20. P. 111–117.
37. Abo Elsoud M.M., el Kady E.M. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan // *Bulletin of the National Research Centre*., 2019. Vol. 43, № 1. P. 59.
38. P P., W S. Fungal chitosan production and its characterization // *Letters in applied microbiology*., 2002. Vol. 35, № 1. P. 17–21.
39. Orlean P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall // *Genetics*. 2012. Vol. 192, № 3. P. 775–818.
40. Martín-Udíroz M., Madrid M.P., Roncero M.I.G. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum* // *Microbiology*. 2004. Vol. 150, № 10. P. 3175–3187.
41. Bressendorff S. et al. An Innate Immunity Pathway in the Moss *Physcomitrella patens* // *The Plant Cell*. 2016. Vol. 28, № 6. P. 1328–1342.
42. Felix G., Regenass M., Boller T. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state // *Plant Journal*. Blackwell Publishing Ltd., 1993. Vol. 4, № 2. P. 307–316.
43. Shibuya N. et al. Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells // *FEBS Letters*. 1993. Vol. 329, № 1–2. P. 75–78.
44. Kaku H. et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006. Vol. 103, № 29. P. 11086–11091.
45. Fesel P.H., Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants // *Fungal Genetics and Biology*. 2016. Vol. 90. P. 53–60.

46. Klarzynski O. et al. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco // Plant Physiology. American Society of Plant Biologists, 2000. Vol. 124, № 3. P. 1027–1037.
47. Pusztahelyi T. Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions // Mycology., 2018. Vol. 9, № 3. P. 189–201.
48. Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // Gene. Gene, 2013. Vol. 513, № 1. P. 1–13.
49. Kombrink A., Sánchez-Vallet A., Thomma B.P.H.J. The role of chitin detection in plant-pathogen interactions // Microbes and Infection. 2011. Vol. 13, № 14–15. P. 1168–1176.
50. Shibuya N. et al. Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells // FEBS Letters. 1993. Vol. 329, № 1–2. P. 75–78.
51. Kouzai Y. et al. CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers // Plant Molecular Biology. 2014. Vol. 84, № 4–5. P. 519–528.
52. Cao Y. et al. The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1 // eLife. 2014. Vol. 3.
53. Gong B.Q. et al. Cross-Microbial Protection via Priming a Conserved Immune Co-Receptor through Juxtamembrane Phosphorylation in Plants // Cell Host & Microbe. Cell Press, 2019. Vol. 26, № 6. P. 810-822.e7.
54. Gong B.-Q., Wang F.-Z., Li J.-F. Hide-and-Seek: Chitin-Triggered Plant Immunity and Fungal Counterstrategies // Trends in Plant Science. Elsevier, 2020. Vol. 25, № 8. P. 805–816.
55. De Jonge R. et al. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants // Science. 2010. Vol. 329, № 5994. P. 953–955.
56. Marshall R. et al. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat // Plant Physiology. 2011. Vol. 156, № 2. P. 756–769.
57. Wang F.Z. et al. Split Nano luciferase complementation for probing protein-protein interactions in plant cells // Journal of Integrative Plant Biology. Blackwell Publishing Ltd, 2020. Vol. 62, № 8. P. 1065–1079.
58. El Gueddari N.E. et al. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi // New Phytologist. 2002. Vol. 156, № 1. P. 103–112.
59. Fujikawa T. et al. Surface α -1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants // PLoS Pathogens. 2012. Vol. 8, № 8.
60. Beauvais A. et al. Deletion of the α -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus* // PLoS Pathogens. 2013. Vol. 9, № 11.
61. Kombrink A., Sánchez-Vallet A., Thomma B.P.H.J. The role of chitin detection in plant-pathogen interactions // Microbes and Infection. 2011. Vol. 13, № 14–15. P. 1168–1176.

62. Rovenich H., Boshoven J.C., Thomma B.P.H.J. Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes // *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 20. P. 96–103.
63. De Jonge R., Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. How filamentous pathogens co-opt plants: The ins and outs of fungal effectors // *Current Opinion in Plant Biology*. 2011. Vol. 14, № 4. P. 400–406.
64. Van Den Burg H.A. et al. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Mol Plant Microbe Interact, 2006. Vol. 19, № 12. P. 1420–1430.
65. Thomma B.P.H.J. et al. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae* // *Molecular Plant Pathology*. Mol Plant Pathol, 2005. Vol. 6, № 4. P. 379–393.
66. Stergiopoulos I. et al. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107, № 16. P. 7610–7615.
67. Sánchez-Vallet A. et al. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization // *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd, 2013. Vol. 2013, № 2.
68. Mentlak T.A. et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease // *Plant Cell*. 2012. Vol. 24, № 1. P. 322–335.
69. Sánchez-Vallet A., Mesters J.R., Thomma B.P.H.J. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions // *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press, 2015. Vol. 39, № 2. P. 171–183.
70. Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K. Bacterial chitinases: Properties and potential // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2007. Vol. 27, № 1. P. 21–28.
71. Sahai A.S., Manocha M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction // *FEMS Microbiology Reviews*. 1993. Vol. 11, № 4. P. 317–338.
72. Levasseur A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes // *Biotechnology for Biofuels*. 2013. Vol. 6, № 1.
73. Javed S. et al. Chitinases: An update // *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2013. Vol. 5, № 1. P. 21.
74. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M. V. Chitinolytic enzymes: An exploration // *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Science Inc, 2000. Vol. 26, № 7. P. 473–483.
75. Vaaje-Kolstad G. et al. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - A model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides // *FEBS Journal*. 2013. Vol. 280, № 13. P. 3028–3049.
76. Vocadlo D.J., Davies G.J. Mechanistic insights into glycosidase chemistry // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008. Vol. 12, № 5. P. 539–555.

77. Duo-Chuan L. Review of fungal chitinases // *Mycopathologia*. 2006. Vol. 161, № 6. P. 345–360.
78. Hamel F. et al. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants // *Journal of Molecular Evolution*. 1997. Vol. 44, № 6. P. 614–624.
79. Udaya Prakash N.A. et al. Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases // *Journal of Molecular Evolution*. 2010. Vol. 70, № 5. P. 466–478.
80. Samac D.A. et al. Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 1990. Vol. 93, № 3. P. 907–914.
81. Broglie K. et al. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* // *Science*. 1991. Vol. 254, № 5035. P. 1194–1197.
82. Han B. et al. Characterization of the first fungal glycosyl hydrolase family 19 chitinase (NbchiA) from *Nosema bombycis* (Nb) // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. Blackwell Publishing Inc., 2016. Vol. 63, № 1. P. 37–45.
83. Kezuka Y. et al. Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2010. Vol. 78, № 10. P. 2295–2305.
84. Ohnuma T. et al. Crystal structure of a “loopless” GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2014.
85. Ubhayasekera W. et al. The first crystal structures of a family 19 class IV chitinase: The enzyme from *Norway spruce* // *Plant Molecular Biology*. 2009. Vol. 71, № 3. P. 277–289.
86. Tanaka J., Fukamizo T., Ohnuma T. Enzymatic properties of a GH19 chitinase isolated from rice lacking a major loop structure involved in chitin binding // *Glycobiology*. Oxford University Press, 2017. Vol. 27, № 5. P. 477–485.
87. Collinge D.B. et al. Plant chitinases // *Plant Journal*. Blackwell Publishing Ltd., 1993. Vol. 3, № 1. P. 31–40.
88. Schultze M. et al. Plant chitinase/lysozyme isoforms show distinct substrate specificity and cleavage site preference towards lipochitooligosaccharide Nod signals // *Plant Journal*. 1998. Vol. 16, № 5. P. 571–580.
89. Melchers L.S. et al. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants // *Plant Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, 1993. Vol. 21, № 4. P. 583–593.
90. Büchter R. et al. Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato // *Plant Molecular Biology*. Springer, 1997. Vol. 35, № 6. P. 749–761.
91. Lawrence C.B., Joosten M.H.A.J., Tuzun S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Academic Press, 1996. Vol. 48, № 6. P. 361–377.

92. Esaka M. et al. Purification and characterization of abundant secreted protein in suspension-cultured pumpkin cells: Abundant secreted protein may be a chitinase // *Plant Physiology. American Society of Plant Biologists*, 1990. Vol. 93, № 3. P. 1037–1041.
93. Dore I. et al. Subcellular localization of acidic and basic PR proteins in tobacco mosaic virus-infected tobacco // *Archives of Virology. Springer-Verlag*, 1991. Vol. 120, № 1–2. P. 97–107.
94. Melchers L.S. et al. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exochitinases displays antifungal activity // *The Plant Journal*. 1994. Vol. 5, № 4. P. 469–480.
95. Iseli B. et al. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms // *FEBS Letters. Elsevier B.V.*, 1996. Vol. 382, № 1–2. P. 186–188.
96. Bishop J.G., Dean A.M., Mitchell-Olds T. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences*, 2000. Vol. 97, № 10. P. 5322–5327.
97. Fu X. et al. An acidic, thermostable exochitinase with β -N-acetylglucosaminidase activity from *Paenibacillus barengoltzii* converting chitin to N-acetyl glucosamine // *Biotechnology for Biofuels. BioMed Central Ltd.*, 2014. Vol. 7, № 1.
98. Chrispeels M.J., Raikhel N. V. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles // *Cell*. 1992. Vol. 68, № 4. P. 613–616.
99. Iseli B., Boller T., Neuhaus J.M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity // *Plant Physiology. American Society of Plant Biologists*, 1993. Vol. 103, № 1. P. 221–226.
100. Li H., Greene L.H. Sequence and structural analysis of the chitinase insertion domain reveals two conserved motifs involved in chitin-binding // *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5, № 1.
101. Yeh S. et al. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals // *Plant Physiology. American Society of Plant Biologists*, 2000. Vol. 124, № 3. P. 1251–1263.
102. Chase M.W. et al. Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory // *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009. Vol. 161, № 4. P. 329–356.
103. Синельников И.Г. et al. Клонирование и экспрессия новой хитиназы из хищных растений *Drosera Capensis* // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. 2020. Vol. 61, № 5. P. 361–368.
104. Ravee R., Salleh F.I.M., Goh H.H. Discovery of digestive enzymes in carnivorous plants with focus on proteases // *PeerJ. PeerJ Inc.*, 2018. Vol. 2018, № 6.
105. Eilenberg H. et al. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana* // *Journal of Experimental Botany*. 2006. Vol. 57, № 11. P. 2775–2784.
106. Rajinex M., Libantova J., Jopcik M. Optimisation of expression conditions for production of round-leaf sundew chitinase (*Drosera rotundifolia* L.) in three *E. coli* expression strains // *Journal of Central European Agriculture*. 2016.

107. Michalko J. et al. Glucan-rich diet is digested and taken up by the carnivorous sundew (*Drosera rotundifolia* L.): Implication for a novel role of plant β -1,3-glucanases // *Planta*. 2013. Vol. 238, № 4. P. 715–725.
108. Rottloff S. et al. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes* // *Journal of Experimental Botany*. 2011. Vol. 62, № 13. P. 4639–4647.
109. Gruber S., Kubicek C.P., Seidl-Seiboth V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77, № 20. P. 7217–7226.
110. Norberg A.L. et al. Substrate positioning in chitinase A, a processive chito-biohydrolase from *Serratia marcescens* // *FEBS Letters*. 2011. Vol. 585, № 14. P. 2339–2344.
111. Shin K.S. et al. Differential roles of the chib chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans* // *Eukaryotic Cell*. 2009. Vol. 8, № 5. P. 738–746.
112. Kamerewerd J. et al. PcchiB1, encoding a class V chitinase, is affected by PcVelA and PcLaeA, and is responsible for cell wall integrity in *Penicillium chrysogenum* // *Microbiology*. 2011. Vol. 157, № 11. P. 3036–3048.
113. Jaques A.K. et al. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product // *Microbiology. Society for General Microbiology*, 2003. Vol. 149, № 10. P. 2931–2939.
114. Gruber S.G., Seidl-Seiboth V. Self versus non-self: Fungal cell wall degradation in *Trichoderma* // *Microbiology*. 2012. Vol. 158, № 1. P. 26–34.
115. Seidl-Seiboth V. et al. Spore germination of *Trichoderma atroviride* is inhibited by its LysM protein TAL6 // *The FEBS Journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013. Vol. 280, № 5. P. 1226–1236.
116. De Las Mercedes Dana M., Pintor-Toro J.A., Cubero B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents // *Plant Physiology*. 2006. Vol. 142, № 2. P. 722–730.
117. de las Mercedes Dana M. et al. Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum* // *Current Genetics*. 2001. Vol. 38, № 6. P. 335–342.
118. Fiorin G.L. et al. Suppression of plant immunity by fungal chitinase-like effectors // *Current Biology. Cell Press*, 2018. Vol. 28, № 18. P. 3023-3030.e5.
119. Martínez-Caballero S. et al. Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain // *FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd*, 2014. Vol. 281, № 19. P. 4535–4554.
120. Hamre A.G. et al. Thermodynamics of tunnel formation upon substrate binding in a processive glycoside hydrolase // *Archives of Biochemistry and Biophysics. Academic Press Inc.*, 2017. Vol. 620. P. 35–42.
121. Zees A.C., Pyrpassopoulos S., Vorgias C.E. Insights into the role of the ($\alpha + \beta$) insertion in the TIM-barrel catalytic domain, regarding the stability and the enzymatic activity of Chitinase A from *Serratia marcescens* // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2009. Vol. 1794, № 1. P. 23–31.

122. Ohnuma T. et al. Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum* // FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd, 2011. Vol. 278, № 21. P. 3991–4001.
123. Ohnuma T. et al. Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a “loopful” family GH19 chitinase from rye, *Secale cereale*, seeds // FEBS Journal. 2012. Vol. 279, № 19. P. 3639–3651.
124. Neuhaus J.M. et al. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, 1991. Vol. 88, № 22. P. 10362–10366.
125. Vaaje-Kolstad G. et al. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - A model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides // FEBS Journal. 2013. Vol. 280, № 13. P. 3028–3049.
126. Li Q. et al. Putative exposed aromatic and hydroxyl residues on the surface of the N-terminal domains of Chi1 from *Aeromonas caviae* CB101 are essential for chitin binding and hydrolysis // Applied and Environmental Microbiology. Appl Environ Microbiol, 2005. Vol. 71, № 11. P. 7559–7561.
127. Homthong M. et al. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. // Elsevier.
128. Van Aalten D.M.F. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. Vol. 98, № 16. P. 8979–8984.
129. Umemoto N. et al. Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class v chitinases: The cycad enzyme exhibits unique structural and functional features // Plant Journal. Blackwell Publishing Ltd, 2015. Vol. 82, № 1. P. 54–66.
130. Gloster T.M. et al. Divergence of Catalytic Mechanism within a Glycosidase Family Provides Insight into Evolution of Carbohydrate Metabolism by Human Gut Flora // Chemistry and Biology. Chem Biol, 2008. Vol. 15, № 10. P. 1058–1067.
131. Jitonnorn J. et al. A DFT study of the unusual substrate-assisted mechanism of *Serratia marcescens* chitinase B reveals the role of solvent and mutational effect on catalysis // Journal of Molecular Graphics and Modelling. Elsevier Inc., 2015. Vol. 56. P. 53–59.
132. Oyeleye A., Normi Y.M. Chitinase: Diversity, limitations, and trends in Engineering for suitable applications // Bioscience Reports. Portland Press Ltd, 2018. Vol. 38, № 4. P. 2018032300.
133. Takenaka S., Ohnuma T., Fukamizo T. Insertion of a Loop Structure into the “Loopless” GH19 Chitinase from *Bryum coronatum* // Journal of applied glycoscience. J Appl Glycosci (1999), 2017. Vol. 64, № 2. P. 39–42.
134. Hoell I.A. et al. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes // FEBS Journal. 2006. Vol. 273, № 21. P. 4889–4900.

135. Itoh T. et al. Crystal structure of chitinase ChiW from *Paenibacillus sp. str. FPU-7* reveals a novel type of bacterial cell-surface-expressed multi-modular enzyme machinery // PLoS ONE. Public Library of Science, 2016. Vol. 11, № 12.
136. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // Structure. Structure, 1995. Vol. 3, № 9. P. 853–859.
137. Fukamizo F. Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application // Current Protein & Peptide Science. Bentham Science Publishers Ltd., 2005. Vol. 1, № 1. P. 105–124.
138. Payne C.M. et al. Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases // Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem, 2012. Vol. 287, № 43. P. 36322–36330.
139. Zakarlassen H. et al. Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency // Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem, 2009. Vol. 284, № 16. P. 10610–10617.
140. Madhuprakash J. et al. Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation // International Journal of Biochemistry and Molecular Biology. e-Century Publishing Corporation, 2013. Vol. 4, № 4. P. 166–178.
141. Yang J. et al. Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine // Microbiology. 2010. Vol. 156, № 12. P. 3566–3574.
142. Neeraja C. et al. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants // Critical Reviews in Biotechnology. Crit Rev Biotechnol, 2010. Vol. 30, № 3. P. 231–241.
143. Taira T. et al. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: The different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2002. Vol. 66, № 5. P. 970–977.
144. de la Fuente-Salcido N.M. et al. The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* // MicrobiologyOpen. Blackwell Publishing Ltd, 2016. Vol. 5, № 5. P. 819–829.
145. Slimene I. Ben et al. Isolation of a Chitinolytic *Bacillus licheniformis* S213 Strain Exerting a Biological Control Against *Phoma medicaginis* Infection // Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press Inc., 2015. Vol. 175, № 7. P. 3494–3506.
146. Ghasemi S. et al. Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* sg2: Preliminary report // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 26, № 8. P. 1437–1443.
147. Hjort K. et al. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics // Applied Microbiology and Biotechnology. Springer Verlag, 2014. Vol. 98, № 6. P. 2819–2828.
148. Kawase T. et al. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2) // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2006. Vol. 70, № 4. P. 988–998.

149. Taira T. et al. Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*) // Glycobiology. Glycobiology, 2011. Vol. 21, № 5. P. 644–654.
150. Ohnuma T. et al. Molecular cloning, functional expression, and mutagenesis of cDNA encoding class I chitinase from rye (*Secale cereale*) seeds // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2004. Vol. 68, № 2. P. 324–332.
151. Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles // Critical Reviews in Plant Sciences. 2012. Vol. 31, № 1. P. 57–73.
152. Karthik N., Binod P., Pandey A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces sp.* // Bioresource Technology. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 188. P. 195–201.
153. Kirubakaran S.I., Sakthivel N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli* // Protein Expression and Purification. 2007. Vol. 52, № 1. P. 159–166.
154. Schoffemeer E.A.M. et al. The cell wall of *Fusarium oxysporum* // Fungal Genetics and Biology. Academic Press Inc., 1999. Vol. 27, № 2–3. P. 275–282.
155. Banasiuk R., Kawiak A., Krölicka A. In vitro cultures of carnivorous plants from the *Drosera* and *Dionaea* genus for the production of biologically active secondary metabolites // Biotechnologia. 2012. Vol. 93, № 2. P. 87–96.
156. Lööke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // BioTechniques. Biotechniques, 2011. Vol. 50, № 5. P. 325–328.
157. Jia X., Lin X., Chen J. Linear and exponential TAIL-PCR: a method for efficient and quick amplification of flanking sequences adjacent to Tn5 transposon insertion sites // AMB Express. Springer Berlin Heidelberg, 2017. Vol. 7, № 1.
158. Sinelnikov I.G. et al. Cloning and expression of a new chitinase from carnivorous plants *Drosera capensis* // Moscow University Chemistry Bulletin. 2020. Vol. 75, № 5. P. 286–292.
159. Laskowski R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // Journal of Applied Crystallography. International Union of Crystallography (IUCr), 1993. Vol. 26, № 2. P. 283–291.
160. Savitsky P. et al. High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience // Journal of Structural Biology. Elsevier, 2010. Vol. 172, № 1. P. 3–13.
161. Froger A., Hall J.E. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method // Journal of Visualized Experiments : JoVE. MyJoVE Corporation, 2007. Vol. 6, № 6.
162. Денисенко Ю.А. Белковая инженерия грибных ксиланаз 10-й семьи гликозидгидролаз: дис. канд. хим. наук. МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2018.
163. Hsu S.C., Lockwood J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil // Applied Microbiology. American Society for Microbiology, 1975. Vol. 29, № 3. P. 422–426.
164. Margoutidis G. et al. Mechanochemical Amorphization of α -Chitin and Conversion into Oligomers of N-Acetyl-d-glucosamine // ACS Sustainable Chemistry and Engineering. American Chemical Society, 2018. Vol. 6, № 2. P. 1662–1669.

165. Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A. V. Properties and N-glycosylation of recombinant endoglucanase II from *Penicillium verruculosum* // Moscow University Chemistry Bulletin. Allerton Press Incorporation, 2015. Vol. 70, № 6. P. 283–286.
166. Синицына О.А. et al. Создание продуцента хитиназы и использование её препарата для разрушения клеточной стенки микроскопических грибов // Биохимия. The Russian Academy of Sciences, 2020. Vol. 85, № 6. P. 840–848.
167. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // The Journal of biological chemistry. J Biol Chem, 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
168. He F. Laemmli-SDS-PAGE // Bio-protocol. Bio-Protocol, LLC, 2011. Vol. 1, № 11.
169. Stanke M. et al. Gene prediction in eukaryotes with a generalized hidden Markov model that uses hints from external sources // BMC Bioinformatics. 2006. Vol. 7.
170. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // Plant Molecular Biology Reporter. International Society for Plant Molecular Biology, 1997. Vol. 15, № 1. P. 8–15.
171. Allen G.C. et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide // Nature Protocols. 2006. Vol. 1, № 5. P. 2320–2325.
172. Broekaert W.F. et al. Antimicrobial Peptides from *Amaranthus Caudatus* Seeds with Sequence Homology to the Cysteine/Glycine-Rich Domain of Chitin-Binding Proteins // Biochemistry. 1992. Vol. 31, № 17. P. 4308–4314.
173. Price N.P.J. et al. Structure and disulfide bonding pattern of the hevein-like peptide domains from plant class IV chitinases // Physiological and Molecular Plant Pathology. Academic Press, 2015. Vol. 89, № 1. P. 25–30.
174. Rajnec M., Libantovi J., Jopcik M. Optimisation of expression conditions for production of round-leaf sundew chitinase (*Drosera rotundifolia* L.) in three *E. coli* expression strains // Journal of Central European Agriculture. Journal of Central European Agriculture, 2016. Vol. 17, № 4. P. 1104–1118.
175. Rajnec M. et al. Biochemical and antifungal characteristics of recombinant class I chitinase from *Drosera rotundifolia* // International Journal of Biological Macromolecules. Elsevier B.V., 2020. Vol. 161. P. 854–863.
176. Bao X. et al. Optimization of dilution refolding conditions for a camelid single domain antibody against human beta-2-microglobulin // Protein expression and purification. Protein Expr Purif, 2016. Vol. 117. P. 59–66.
177. Hudson D.A., Gannon S.A., Thorpe C. Oxidative protein folding: From thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum // Free Radical Biology and Medicine. Elsevier Inc., 2015. Vol. 80. P. 171–182.
178. Yamaguchi S. et al. Protein refolding using chemical refolding additives // Biotechnology Journal. Biotechnol J, 2013. Vol. 8, № 1. P. 17–31.
179. Alibolandi M., Mirzahosei H. Retracted: Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies // American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. Science Alert, 2011. Vol. 1, № 3. P. 310–318.

180. Moghadam M. et al. Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model. // Reports of biochemistry & molecular biology. Varastegan Institute for Medical Sciences, 2015. Vol. 4, № 1. P. 19–24.
181. Xia Y. et al. The protective effects of osmolytes on arginine kinase unfolding and aggregation // International Journal of Biological Macromolecules. 2007. Vol. 40, № 5. P. 437–443.
182. Bastings M.M.C. et al. One-step refolding and purification of disulfide-containing proteins with a C-terminal MESNA thioester // BMC Biotechnology. BioMed Central, 2008. Vol. 8, № 1. P. 76.
183. Wang S.S.S. et al. Effect of glutathione redox system on lysozyme refolding in size exclusion chromatography // Food and Bioproducts Processing. Institution of Chemical Engineers, 2006. Vol. 84, № 1 C. P. 18–27.
184. Berkmen M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli // Protein Expression and Purification. Academic Press, 2012. Vol. 82, № 1. P. 240–251.
185. Zhang L., Moo-Young M., Chou C.P. Effect of aberrant disulfide bond formation on protein conformation and molecular property of recombinant therapeutics // Pure and Applied Chemistry. 2010. Vol. 82, № 1. P. 149–159.
186. Krieger E., Vriend G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations // Bioinformatics (Oxford, England). Bioinformatics, 2014. Vol. 30, № 20. P. 2981–2982.
187. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field // Proteins: Structure, Function and Genetics. Proteins, 2002. Vol. 47, № 3. P. 393–402.
188. Kezuka Y. et al. Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. John Wiley and Sons Inc., 2010. Vol. 78, № 10. P. 2295–2305.
189. Bowie J.U., Lüthy R., Eisenberg D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure // Science. Science, 1991. Vol. 253, № 5016. P. 164–170.
190. Lüthy R., Bowie J.U., Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles // Nature. Nature, 1992. Vol. 356, № 6364. P. 83–85.
191. Huet J. et al. X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases // Biochemistry. American Chemical Society, 2008. Vol. 47, № 32. P. 8283–8291.
192. Mach R.L. et al. Expression of Two Major Chitinase Genes of *Trichoderma atroviride* (*T. Harzianum* PI) Is Triggered by Different Regulatory Signals // Applied and environmental microbiology. 1999. Vol. 65, № 5. 1858–1863 p.
193. Sinitsyna O.A. et al. Creation of Chitinase Producer and Disruption of Micromycete Cell Wall with the Obtained Enzyme Preparation // Biochemistry (Moscow). 2020. Vol. 85, № 6. P. 717–724.

194. Truong N.H. et al. Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2003. Vol. 67, № 5. P. 1063–1070.
195. Kirubakaran S.I., Sakthivel N. Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli* // *Protein Expression and Purification*. 2007. Vol. 52, № 1. P. 159–166.
196. Taira T. et al. Antifungal activity of chitinases: The different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002. Vol. 66, № 5. P. 970–977.
197. Malik A., Preety. Purification and properties of plant chitinases: A review // *Journal of Food Biochemistry*. 2019. Vol. 43, № 3. P. 1–11.
198. Paszota P. et al. Secreted major Venus flytrap chitinase enables digestion of Arthropod prey // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2014. Vol. 1844, № 2. P. 374–383.
199. Iseli B., Boller T., Neuhaus J.M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity // *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 1993. Vol. 103, № 1. P. 221–226.
200. Schlumbaum A. et al. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth // *Nature* 1986 324:6095. Nature Publishing Group, 1986. Vol. 324, № 6095. P. 365–367.
201. Aw R., Polizzi K.M. Liquid PTVA: a faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris* // *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 2016. Vol. 15, № 1.
202. Küberl A. et al. High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435 // *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 2011. Vol. 154, № 4. P. 312–320.
203. Norrander J., Kempe T., Messing J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis // *Gene*. Gene, 1983. Vol. 26, № 1. P. 101–106.
204. Canales M. et al. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick // *Vaccine*. Elsevier, 1997. Vol. 15, № 4. P. 414–422.
205. Landim P.G.C. et al. Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): Insights into sugar binding mode and hydrolytic action // *Biochimie*. 2017. Vol. 135. P. 89–103.