

УДК 577.151+579.222

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.335-349

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ЩЕЛОЧНЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТОВ

*В.В. Ульянова, П.Ю. Ваньков, П.В. Зеленихин, Р. Шах Махмуд,
А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Многие рибонуклеазы (РНказы) обладают избирательным цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеткам. Особый интерес представляют ферменты, филогенетически далекие от РНказ млекопитающих, такие как РНказы амфибий, грибов и бактерий, нечувствительные к действию ингибитора РНказ млекопитающих. В настоящей работе проведен скрининг 15 изолятов микромицетов на наличие секретируемой щелочной рибонуклеазы. Наибольшей рибонуклеолитической активностью обладали 7 изолятов, самый активный из которых на основе филогенетического анализа был определен как *Fusarium sporotrichioides*. Максимальный уровень активности (19000 ед./мл) в культуральной жидкости *F. sporotrichioides* был зарегистрирован на третьи сутки роста гриба. Полученные данные о термостабильности секретируемой РНказы *F. sporotrichioides*, ее молекулярного веса (11 кДа) и биосинтезе на среде с низким содержанием фосфата позволяют полагать, что фермент относится к семейству РНказ T1/N1/U2. Культуральная жидкость *F. sporotrichioides*, выращенного на дефицитной по фосфату среде, снижала жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого человека A549 на 16.3%; при росте микромицета на среде с высоким содержанием фосфата токсичность культуральной жидкости не обнаружена. Таким образом, в цитотоксичность вносит вклад секретируемая РНказа. Всестороннее изучение свойств новой РНказы поможет установить механизмы ее цитотоксичности и обозначить области применения фермента.

Ключевые слова: микромицеты, *Fusarium*, рибонуклеаза, термостабильность, цитотоксичность, клетки аденокарциномы легких A549

Введение

Среди секретируемых микромицетами рибонуклеаз (РНказ) обширного семейства N1/T1/U2 наиболее известны риботоксины аспергиллов – узкоспецифичные катионные ферменты с молекулярной массой (ММ) около 17 кД – рестриктоцин, α -сарцин, митогиллин, Aspfl и пр. [1]. Их мишенью является высоко консервативная последовательность 23-28S субъединицы рибосомной РНК, так называемая сарцин-рициновая петля, в которой они расщепляют единственную фосфодиэфирную связь, нарушая процесс белкового синтеза. Область потенциального применения риботоксинов охватывает структурно-функциональные исследования рибосом, создание инсектицидных препаратов и противоопухолевых иммунотоксинов [2, 3]. Однако риботоксины, например Aspfl из *Aspergillus*

fumigatus, известны как сильнейшие аллергены, вовлеченные в патогенез пульмонарного аспергиллеза [4].

Многие микромицеты не являются продуцентами риботоксинов, но выделяют в среду неспецифичные кислые РНКазы, как то Phya и Phyb (Мм около 20 кД), секретируемые *Fusarium polycephalum* [5], кислые РНКазы с Мм 24 кД и выше, секретируемые некоторыми другими грибами [6], или щелочные гуанилпредпочитающие РНКазы, выделяемые *Penicillium chrysogenum* [7]. На сегодня сведений о таких РНКазах очень мало. В то же время щелочные низкомолекулярные РНКазы бацилл интенсивно изучаются как потенциальные противоопухолевые и противовирусные агенты [8–12], не обладающие иммуноотоксичностью [13]. В связи с этим в настоящей работе был проведен поиск микромицетов – продуцентов секретируемых щелочных низкомолекулярных РНКаз, обладающих цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток, с целью дальнейшей характеристики последних как перспективных противоопухолевых агентов селективного действия.

Материалы и методы

Микромицеты и условия культивирования. В работе исследовали следующие штаммы микромицетов: 7 представителей рода *Penicillium*, 4 из которых были выделены из почв Республики Татарстан, 3 – с внутренней поверхности стен корпусов Военного госпиталя г. Казани; 4 представителя рода *Aspergillus* (клинические изоляты, выделенные при онхиомикозах); 2 гриба рода *Fusarium* из пораженных томатов; 1 представитель рода *Trichoderma* из разлагающейся древесины и 1 представитель рода *Mucor*, выделенный из испорченной сметаны.

Для поддержания культур использовали агаризованную среду Чапека следующего состава (г/л): сахароза – 30, NaNO₃ – 2, K₂HPO₄ – 1, MgSO₄ – 1, KCl – 0.5, FeSO₄ – 0.01. Культивирование проводили в термостате при температуре 28 °С.

Для последующего определения рибонуклеазной активности и цитотоксического эффекта культуральной жидкости микромицеты культивировали в шейкере-инкубаторе (28 °С, 180 об./мин). Использовали модифицированную среду Огата (г/л): глюкоза – 50, пептон (низкофосфатный или обычный) – 10, соевая мука – 5, MgSO₄·7H₂O – 0.5, KNO₃ – 2, CaCl₂·2H₂O – 0.1. Стерильный раствор глюкозы добавляли отдельно после автоклавирования. Данная среда применяется для выращивания микроорганизмов с целью выделения внеклеточных РНКаз, поскольку не содержит неорганического фосфора, ингибирующего синтез этих ферментов [14]. Соотношение объема среды к объему колбы составляло 1:5. Засев среды проводили спорами в количестве 10⁵/мл среды.

Анализ рибонуклеолитической активности. Для первичного определения внеклеточных щелочных РНКаз были использованы РНК-содержащие агаризованные пластины, в лунки которых вносили культуральную жидкость микромицетов на 1-е, 2-е и 3-и сутки культивирования (рис. 1). На предметные стекла наносили раствор дрожжевой РНК (5 мг/мл) в 0.2 М трис-НСl буфере (рН 8) с добавлением 2% агара. После затвердевания геля в нем с помощью стеклянной трубочки делали лунки диаметром 4 мм. В лунки заливали 25 мкл культуральной жидкости микромицетов. Стекла помещали в чашки Петри, в которых для создания влажной атмосферы, препятствующей испарению культуральной жид-

кости, находились пропитанные водой ватные диски. Чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 30 мин, затем стекла с гелем заливали 1 н HCl. При кислотном значении pH высокополимерная РНК выпадает в осадок, а в местах, где произошел ее гидролиз, образуются зоны просветления, по диаметру которых судили об активности РНКаз.

Количественно РНКазную активность оценивали модифицированным методом Анфинсена [15]. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее увеличение оптической плотности на одну оптическую единицу при 260 нм в пересчете на 1 мл раствора фермента за 1 ч инкубации при 37 °С.

Определение таксономической принадлежности. Для определения таксономической принадлежности наиболее активных в отношении синтеза внеклеточных РНКаз микромицетов секвенировали последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) методом Сэнгера с использованием стандартных праймеров ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'). Полученные последовательности сравнивали с таковыми типовых штаммов. Референсные последовательности были получены из баз данных MucosBank и GenBank. Биоинформатический анализ производили в программе MEGA 7 (выравнивание осуществляли с помощью ClustalW, филогенетические деревья строили методом ближайшего соседа с поддержкой бутстрап в 1000 реплик).

Определение цитотоксичности культуральной жидкости микромицетов. Влияние культуральной жидкости микромицетов, проявивших наибольшую рибонуклеазную активность, на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого человека A549 осуществляли с помощью МТТ-теста, регистрирующего переход формазана в окрашенное производное под действием митохондриальных дегидрогеназ. Снижение активности последних свидетельствовало о токсическом действии исследуемых образцов. К клеткам, выращенным на среде HamF12K (Invitrogen, США) с добавлением 10%-ной телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина (по 100 ед.) при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO₂ до монослоя, добавляли культуральную жидкость микромицета в количестве 10% от объема среды. Через 48 ч дальнейшего роста клеток измеряли их жизнеспособность. Тест проводили в пяти повторностях, достоверность результатов оценивали с помощью дисперсионного анализа. Обработку результатов проводили в программах Rstudio и Excel.

Электрофорез и зимография. Электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле проводили согласно стандартной методике. Оценку каталитической активности фермента проводили путем разделения белков в 15%-ном полиакриламидном геле по модифицированной методике Лэммли [16], в качестве субстрата в разделяющий гель добавляли дрожжевую РНК (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 7 мг/мл. После электрофоретического разделения белков, гель отмывали по 10 мин в буфере I (10 мМ Трис-HCl, 20 % изопропанол, pH 7.5), буфере II (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5) и буфере III (100 мМ Трис-HCl, pH 7.5). Окрашивание гелей проводили в 0.2%-ном растворе толуидинового синего (Sigma-Aldrich, США).



Рис. 1. Рибонуклеазная активность культуральной жидкости семи микромицетов на 3-и сутки культивирования: (1) – *Fusarium* sp. изолят 1; (2) – *Penicillium* sp. изолят 1; (3) – *Mucor* sp.; (4) – *Penicillium* sp. изолят 2; (5) – *Penicillium* sp. изолят 3; (6) – *Fusarium* sp. изолят 2, (7) – контрольная лунка с 25 мкл стерильной среды Огато; (8) – *Penicillium* sp. изолят 4; (9) – контрольная лунка с 25 мкл воды. Наиболее активный в отношении синтеза внеклеточной рибонуклеазы изолят отмечен кружком

Результаты

Обнаружено, что из 15 выделенных штаммов микромицетов 7 изолятов обладали внеклеточной щелочной РНКазой, которая регистрировалась в культуральной жидкости спустя 2–3 сут культивирования. Визуализация активности РНКаз на 3-и сутки культивирования представлена на рис. 1.

Результаты количественного измерения активности секретируемых РНКаз соответствовали первичным данным луночного теста. Наибольший уровень РНКазы выявлен у грибов рода *Fusarium*, при этом самым активным оказался изолят № 2. Высокий уровень активности проявил также *Mucor* sp. Изолят *Penicillium* sp. 4 был выбракован из дальнейших исследований вследствие низкой активности секретируемой РНКазы (табл. 1).

Два микромицета с наибольшими значениями активности внеклеточных РНКаз были определены до вида с помощью филогенетического анализа на основе секвенирования области ITS (внутренний транскрибируемый спейсер), содержащей вариабельные последовательности ITS1 и ITS2, расположенные между последовательностями малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц в рибосомном опероне и окружающие ген 5.8S рРНК. Сконструированное филогенетическое дерево подтвердило принадлежность штаммов родам *Fusarium* и *Mucor*: изолят *Fusarium* sp. 2 кластеризовался с *Fusarium sporotrichioides*, в то время как *Mucor* sp. с *Mucor circinelloides* (рис. 2).

Табл. 1

Уровень рибонуклеолитической активности семи наиболее активных микромицетов – продуцентов внеклеточных щелочных РНКаз

Род	№ изолята	Время культивирования, сутки			Активность, опт. ед./мл·ч
		1-е	2-е	3-и	
<i>Fusarium</i> sp.	1	–	7 ± 0.5	8 ± 0.5	166 ± 16
<i>Fusarium</i> sp.	2	–	8 ± 0.5	9 ± 1.0	306 ± 12
<i>Mucor</i> sp.	–	–	7 ± 0.4	7 ± 0.5	158 ± 14
<i>Penicillium</i> sp.	1	–	6 ± 0.3	6 ± 0.5	63 ± 7
<i>Penicillium</i> sp.	2	–	6 ± 0.3	7 ± 0.4	60 ± 7
<i>Penicillium</i> sp.	3	–	7 ± 0.5	6.5 ± 0.4	107 ± 10
<i>Penicillium</i> sp.	4	–	–	0.4 ± 0.2	43 ± 8

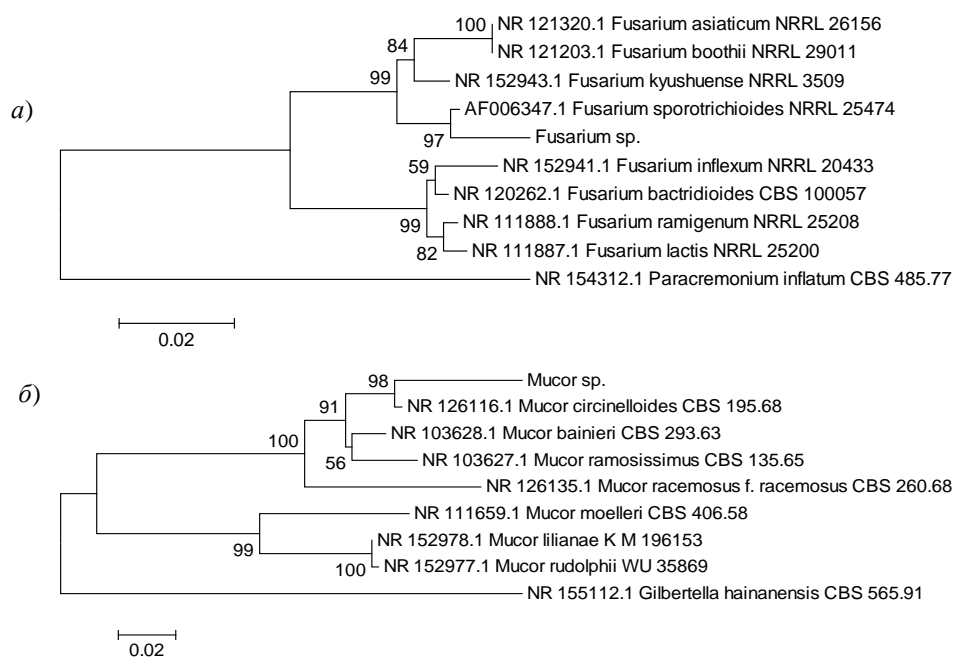


Рис. 2. Таксономическая принадлежность двух микромицетов – *Fusarium* sp. 2 (а) и *Mucor* (б), проявивших наибольшую рибонуклеазную активность. Неукорененное филогенетическое дерево было построено на основе области ITS1-ITS4 методом ближайшего соседа. Числа в узлах дерева указывают значения бутстрап, полученные на основе 1000 реплик, масштаб – количество замен на нуклеотидную позицию

Поскольку для разработки перспективных биотехнологических и медицинских препаратов особенное значение имеет термостабильность РНКаз, был проверен уровень их активности после прогревания при температуре от 30 °C до 100 °C в течение 5 мин. Выявлено, что РНКазы *Mucor circinelloides* инактивировались уже при 50 °C. РНКазы пенициллов различались по устойчивости к нагреванию, однако только один изолят № 3 обладал РНКазой, активность которой сохранялась при 55 °C. Дальнейшее повышение температуры вплоть до 100 °C выдерживали только РНКазы обоих изолятов *Fusarium* (табл. 2).

Увеличение времени культивирования наиболее активных продуцентов РНКаз на среде Огата с фосфатом показало, что *F. sporotrichioides* накапливает максимальное количество РНКазы на четвертые сутки культивирования; затем ее уровень снижается. Активность РНКазы *M. circinelloides* возрастала пропорционально времени культивирования (рис. 3). В целом уровень активности РНКаз на такой среде невысок и не превышает 800 ед./мл (рис. 3).

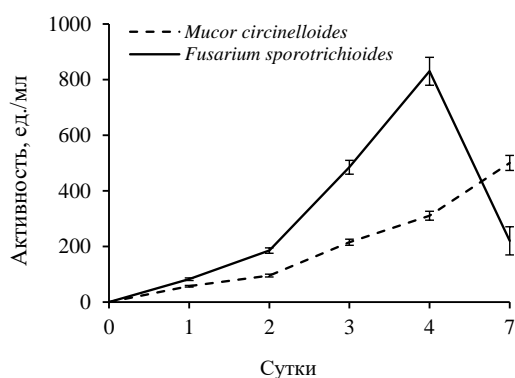
На основании полученных данных самым перспективным продуцентом оказался *F. sporotrichioides*, в связи с чем была предпринята попытка повысить уровень его секретируемой РНКазы за счет модификаций среды культивирования.

Известно, что основным фактором, влияющим на синтез микроорганизмами внеклеточных РНКаз, является количество доступного неорганического фосфора в среде [14]. Кроме того, в некоторых случаях положительное влияние на активность оказывает дефицит азота и присутствие Ca^{2+} [17]. Мы модифицировали

Табл. 2

Активность РНКаз культуральной жидкости микромицетов после прогревания

Род	Температура, °С										
	30	35	40	45	50	55	60	70	80	90	100
	Диаметр зон гидролиза, мм										
<i>Fusarium</i> sp. 1	8	7.5	8	8	7	7	6	6	6	5	5
<i>Fusarium sporotrichioides</i> (sp. 2)	9	8	8.5	8	8	8.5	7	6	6	6	6
<i>Mucor circinelloides</i>	6	6.5	6.5	6	–	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium</i> sp. 2	6	7	6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium</i> sp. 1	7	6	7	6	6	–	–	–	–	–	–
<i>Penicillium</i> sp. 3	7	7	7	7	6	6	–	–	–	–	–

Рис. 3. Динамика уровня рибонуклеолитической активности в культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides* и *Mucor circinelloides* на среде Огата без модификаций

среду Огата тремя способами: 1) заменили обычный пептон на низкофосфатный, 2) уменьшили концентрацию нитратов в 5 раз, 3) добавили 0.1 г/л CaCO₃. Анализ РНКазной активности *F. sporotrichioides* при выращивании на указанных средах показал, что замена обычного пептона низкофосфатным позволила многократно увеличить экспрессию РНКазы. Уменьшение количества азота в среде также способствовало увеличению ее активности, но в значительно меньшей степени. Добавление карбоната кальция не оказало стимулирующего эффекта (рис. 4).

Культуральную жидкость *F. sporotrichioides*, выращенного в течение трех суток на среде Огата с заменой обычного пептона на низкофосфатный, проверили на возможность ингибирования жизнеспособности клеток аденокарциномы легких А549. Для обнаружения концентрационной зависимости культуральную жидкость разводили средой Огата в 5, 2.5, 1.7 и 1.25 раз, сохраняя общий объем добавленного образца на уровне 10% от объема ростовой среды клеток. Установлено, что добавление 10% среды Огата к клеткам А549 не изменяет их жизнеспособности, в то время как с увеличением концентрации культуральной жидкости *F. sporotrichioides* с 4% до 10% от объема среды жизнеспособность клеток снижалась, вплоть до 80% в присутствии неразбавленной культуральной жидкости (рис. 5).

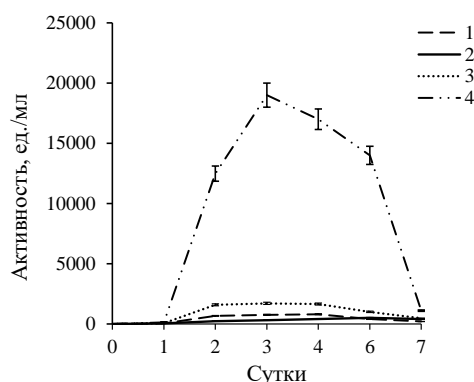


Рис. 4. Изменение активности РНКазы культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides*, выращенного на среде Огата с модификациями: Условные обозначения: 1 – среда Огата, 2 – среда Огата с добавлением 0.1 г/л CaCO₃, 3 – среда Огата с уменьшением количества нитратов в 5 раз, 4 – среда Огата с заменой обычного пептона на низкофосфатный

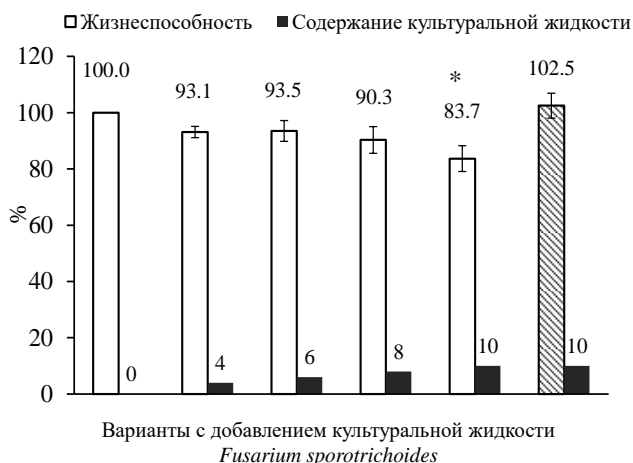


Рис. 5. Изменение жизнеспособности клеток A549 в зависимости от количества внесённой культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides*, выращенного в течение трех суток на низкофосфатной среде Огата. За 100% принят рост клеток с добавлением чистой среды Огата. Доля внесённой культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides* указана в процентах от общего объема ростовой среды клеток (черные столбики). Заштрихованный столбец – жизнеспособность клеток при добавлении 10%-ной культуральной жидкости микромицета, выращенного на среде Огата с фосфатом. Данные представляют собой средние значения ± стандартное отклонение; * $p < 0.05$ по сравнению с контрольным вариантом

Если же к клеткам A549 была добавлена в аналогичном объеме культуральная жидкость гриба, выращенного на высокофосфатной среде, то токсический эффект отсутствовал, что свидетельствует о вкладе секретируемой РНКазы в цитотоксичность.

Электрофорез культуральной жидкости *F. sporotrichioides* выявил значительное количество секретируемых белков в культуральной жидкости гриба, выращенного без фосфата, причем их количество возрастало на 7-е сутки культивирования (рис. 6, а). Однако анализ РНКазной активност методом зимографии

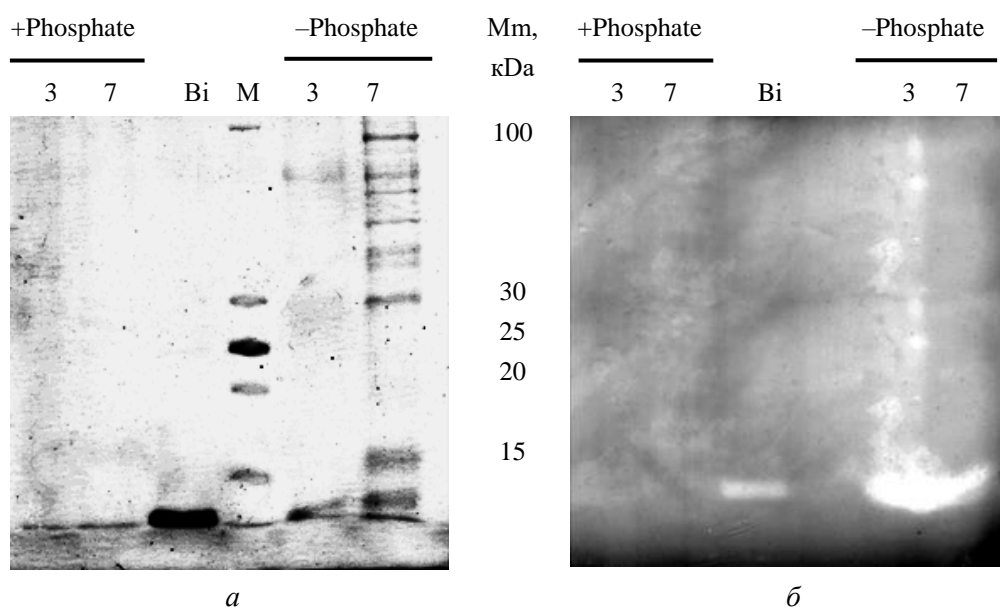


Рис. 6. Детекция РНКазы в культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides* методом электрофореза в денатурирующих условиях (*a*) и зимографии (*б*). Цифрами обозначена продолжительность культивирования микромицета на среде Огата с обычным пептоном (+Phosphate) и низкофосфатным пептоном (-Phosphate): 3 – трое суток, 7 – семь суток. Vi – препарат биназы, секретируемой щелочной РНКазы *Bacillus pumilus*. М – маркер молекулярных масс (Mm) белков

показал, что максимальная активность фермента проявляется именно на 3-е сутки культивирования, как было установлено при определении динамики активности фермента в культуральной жидкости; причем РНКазная активность так высока, что гидролизует содержащуюся в геле РНК на всей «дорожке» пробега белка. Отметим, что в присутствии фосфата в среде *F. sporotrichioides* РНКазу не синтезирует. Молекулярная масса грибной РНКазы приблизительно равна 11–12 кДа, что сходно с таковой у биназы, секретируемой щелочной РНКазы *Bacillus pumilus* (рис. 6, *б*).

Обсуждение

По сравнению с РНКазами аспергиллов РНКазы фузариумов менее изучены. Данные о цитотоксичности фузариумных РНКаз в литературе отсутствуют. Цитотоксичность секретируемых грибных низкомолекулярных РНКаз семейства T1 была установлена только при включении РНКазы гриба *Aspergillus oryzae* в специфический вектор оболочки гемагглютинирующего японского вируса (hemagglutinating virus of Japan envelope vector, HVJ), что позволило конструкции проникнуть в опухолевую клетку [18].

В настоящей работе установлено, что в условиях дефицита фосфата *F. sporotrichioides* синтезирует внеклеточную РНКазу с молекулярной массой около 11 кДа. Ранее в чистом виде из фузариумов были выделены гуанилспецифичные РНКазы *F. lateritium* и *F. moniliforme* – представители семейства РНКаз T1 [19]. РНКазы F1 *F. moniliforme* (10.98 кДа) имеет оптимум pH около 7, РНКазы F1₁

Табл. 3

Свойства секретируемых рибонуклеаз, закодированных в геноме *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3299

Название	Семейство РНКаза	Число а.о.	Молекулярный вес, Да	pI
Рибонуклеаза fl2	T1	241	26929.28	7.07
Рибонуклеаза fl1	T1	112	11653.54	6
Рибонуклеаза семейства T2	T2	236	26195.67	4.46
Рибонуклеаза trv	T2	259	29286.31	4.86

F. lateritium (10.85 кДа) – рН 7.6. РНКазы F1 *F. moniliforme* была кристаллизована [20]. По сравнению с РНКазой T1 *A. oryzae*, у РНКазы F1 имеются различия во вторичной структуре, обусловленные разным расположением цистеиновых остатков, хотя активный центр ферментов консервативен [21].

Биоинформатический анализ генома *F. sporotrichioides* выявил наличие кодирующих последовательностей четырех внеклеточных рибонуклеаз: F1, F12, РНКазы семейства T2 и РНКазы trv. Сопоставив свойства этих РНКаз (табл. 3), мы пришли к выводу, что нами экспериментально подтверждено наличие секретируемой рибонуклеолитической активности РНКазы fl1.

Индукция биосинтеза РНКазы fl1 в условиях недостатка фосфата приводит к повышению ее уровня в 3 раза, с 800 до 19000 ед./мл культуральной жидкости (рис. 3, 4). Ранее мы показали, что в таких условиях уровень секретируемой РНКазы *Bacillus licheniformis*, также относящейся к семейству T1 (бальназы), в культуральной жидкости изначально составлял 763 ед./мл [22], а уровень гомологичной РНКазы *Bacillus altitudinis* – 1250 ед./мл [23]. Следовательно, *F. sporotrichioides* является активным продуцентом секретируемой РНКазы и может быть эффективно использован для дальнейшего выделения и очистки этого фермента.

Не только высокая каталитическая активность, но и установленная устойчивость РНКазы fl1 к высоким температурам (фермент сохраняет около 70% активности даже при кипячении в течение 5 мин (табл. 2)) позволяют предполагать, что новая РНКазы перспективна для дальнейшего изучения. Отсутствие термостабильности секретируемых РНКаз других исследованных микромицетов (табл. 2) снижает потенциал их практического применения. Особенно важно, что РНКазы fl1 *F. sporotrichioides* вносит вклад в цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам аденокарциномы легких A549 (рис. 5), хотя классическая грибная РНКазы T1 из *A. oryzae* при экзогенном внесении не угнетает рост раковых клеток [18].

Таким образом, на основании вышеописанных свойств РНКазы fl1 *F. sporotrichioides* может претендовать на роль потенциального противоопухолевого агента наряду с известными бациллярными РНКазами семейства T1 [8, 9, 10, 23]. Дальнейшее исследование свойств этого белка после выделения и очистки позволит установить спектр его действия в отношении различных линий раковых клеток и выявить его возможную избирательную цитотоксичность, необходимую для разработки новых противоопухолевых препаратов направленного действия.

Благодарности. Авторы благодарны кандидату биологических наук, доценту кафедры микробиологии КФУ Яковлевой Галине Юрьевне за предоставленные для работы штаммы микромицетов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-00-00060 (КОМФИ)), также за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. Kao R., Davies J. Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin // FEBS Lett. – 2000. – V. 466, No 1. – P. 87–90. – doi: 10.1016/s0014-5793(99)01753-6.
2. Olombrada M., Martínez-del-Pozo A., Medina P., Budia F., Gavilanes J.G., García-Ortega L. Fungal ribotoxins: Natural protein-based weapons against insects // Toxicon. – 2014. – V. 83. – P. 69–74. – doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.022.
3. Olombrada M., Lázaro-Gorines R., López-Rodríguez J.C., Martínez-Del-Pozo Á., Oñaderra M., Maestro-López M., Lacadena J., Gavilanes J.G., García-Ortega L. Fungal ribotoxins: A review of potential biotechnological applications // Toxins (Basel). – 2017. – V. 9, No 2. – Art. 71, P. 1–21. – doi: 10.3390/toxins9020071.
4. Lacadena J., Alvarez-García E., Carreras-Sangrà N., Herrero-Galán E., Alegre-Cebollada J., García-Ortega L., Oñaderra M., Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A. Fungal ribotoxins: Molecular dissection of a family of natural killers // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – V. 31, No 2. – P. 212–237. – doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00063.x.
5. Inokuchi N., Koyama T., Sawada F., Irie M. Purification, some properties, and primary structure of base non-specific ribonucleases from *Physarum polycephalum* // J. Biochem. – 1993. – V. 113, No 4. – P. 425–432. – doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124062.
6. D'Alessio G., Riordan J.F. (eds.) Ribonucleases: Structures and Functions. – San Diego: Acad. Press, 1997. – 670 p.
7. Yakovlev G.I., Karpeisky M.Y., Bezborodova S.I., Beletskaja O.P., Sakharovsky V.G. Guanyl-specific ribonuclease from the fungus *Penicillium chrysogenum* strain 152 and its complex with guanosine 3'-phosphate studied by nuclear magnetic resonance // Eur. J. Biochem. – 1980. – V. 109, No 1. – P. 75–85. – doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04769.x.
8. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other RNases as potential anti-cancer agents // BioEssays. – 2008. – V. 30, No 8. – P. 781–790. – doi: 10.1002/bies.20789.
9. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death // Toxicon. – 2013. – V. 69. – P. 219–226. – doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.015.
10. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res. – 2016. – V. 1863, No 7, Pt. A. – P. 1559–1567. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
11. Shah Mahmud R., Ilinskaya O.N. Antiviral activity of binase against the pandemic influenza A (H1N1) virus // Acta Nat. – 2013. – V. 5, No 4. – P. 44–51. – doi: 10.32607/20758251-2013-5-4-44-51.

12. *Shah Mahmud R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O.* Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – V. 2017. – Art. 5279065, P. 1–11. – doi: 10.1155/2017/5279065.
13. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A.* Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 361, No 4. – P. 1000–1005. – doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143.
14. *Ежов В.А., Санцевич Н.И., Безбородова С.И.* Влияние ортофосфата на биосинтез внеклеточных фосфогидролаз *Penicillium brevicompactum* // *Микробиология.* – 1976. – Т. 45, № 2. – P. 253–258.
15. *Колпаков А.И., Ильинская О.Н.* Оптимизация метода определения активности РНКазы с использованием высокополимерной РНК // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 1999. – № 5. – С. 14–16.
16. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685. – doi: 10.1038/227680a0.
17. *Hasunuma K., Ishikawa T.* Control of the production and partial characterization of repressible extracellular 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase in *Neurospora crassa* // *Biochim. Biophys. Acta. – Enzymol.* – 1977. – V. 480, No 1. – P. 178–193. – doi: 10.1016/0005-2744(77)90332-1.
18. *Yuki S., Kondo Y., Kato F., Kato M., Matsuo N.* Noncytotoxic ribonuclease, RNase T1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of Japan envelope vector // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – V. 271, No 17. – P. 3567–3572. – doi: 10.1111/j.0014-2956.2004.04293.x.
19. *Shliapnikov S.V., Bezborodova S.I., Chepurnova N.K., Dement'ev A.A.* A new isoform of intracellular RNAase of F12 *Fusarium lateritium*. Characteristics and determining the primary structure // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* – 1989. – V. 30, No 6. – P. 1496–1499.
20. *Vassilyev D.G., Katayanagi K., Ishikawa K., Tsujimoto-Hirano M., Danno M., Pähler A., Matsumoto O., Matsushima M., Yoshida H., Morikawa K.* Crystal structures of ribonuclease F1 of *Fusarium moniliforme* in its free form and in complex with 2'GMP // *J. Mol. Biol.* – 1993. – V. 230, No 3. – P. 979–996. – doi: 10.1006/jmbi.1993.1214.
21. *Takeuchi H., Harada I., Yoshida H.* Raman spectroscopic study on the structure of ribonuclease F₁ and the binding mode of inhibitor // *Biochim. Biophys. Acta. – Protein Struct. Mol. Enzymol.* – 1991. – V. 1078, No 3. – P. 307–312. – doi: 10.1016/0167-4838(91)90148-s.
22. *Sokurenko Y., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O.* Extracellular ribonuclease from *Bacillus licheniformis* (Balifase), a new member of the N1/T1 RNase superfamily // *Biomed Res. Int.* – 2016. – V. 2016. – Art. 4239375, P. 1–9. – doi: 10.1155/2016/4239375.
23. *Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O.* Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease // *FEBS Open Bio.* – 2016. – V. 6, No 1. – P. 24–32. – doi: 10.1002/2211-5463.12023.
24. *Makarov A.A., Ilinskaya O.N.* Cytotoxic ribonucleases: Molecular weapons and their targets (review) // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 540, No 1–3. – P. 15–20. – doi: 10.1016/s0014-5793(03)00225-4.

Ульянова Вера Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab Маркеры патогенеза

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ulyanova.vera@gmail.com

Ваньков Петр Юрьевич, магистр кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: vankov93@bk.ru

Зеленихин Павел Валерьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: pasha_mic@mail.ru

Шах Махмуд Раихан, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: raihan.shah@gmail.com

Колпаков Алексей Иванович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab Маркеры патогенеза

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ljoscha@mail.ru

Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Ilinskaya_kfu@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2020, vol. 162, no. 3, pp. 335–349

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.335-349

Secreted Alkaline Ribonucleases of Micromycetes

V.V. Ulyanova^{*}, *P.Yu. Vankov*^{**}, *P.V. Zelenikhin*^{***},
R. Shah Mahmud^{****}, *A.I. Kolpakov*^{*****}, *O.N. Ilinskaya*^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}ulyanova.vera@gmail.com, ^{**}vankov93@bk.ru, ^{***}pasha_mic@mail.ru,
^{****}raihan.shah@gmail.com, ^{*****}ljoscha@mail.ru, ^{*****}Ilinskaya_kfu@mail.ru

Received April 8, 2019

Abstract

Many ribonucleases (RNases) have a selective cytotoxic effect on tumor cells. Of particular interest are enzymes that are phylogenetically distant from mammalian RNases, such as amphibian, fungal, and bacterial RNases, all insensitive to the action of the mammalian RNase inhibitor. We screened 15 micro-

mycete isolates for the presence of secreted alkaline ribonuclease. Seven isolates demonstrated the highest ribonucleolytic activity. Based on the phylogenetic analysis, the most active of them were identified as *Fusarium sporotrichioides*. The maximum level of activity (19000 units/mL) in the culture fluid of *F. sporotrichioides* was recorded on the third day of growth of the fungus. The obtained data on the thermal stability of the secreted *F. sporotrichioides* RNase, its molecular weight (11 kDa), and biosynthesis on a medium with a low phosphate content suggest that the enzyme belongs to the RNase T1/N1/U2 family. The culture fluid of *F. sporotrichioides* grown on the phosphate-deficient medium reduced the viability of A549 human lung adenocarcinoma cells by 16.3%; if the micromycete was grown on a medium with a high phosphate content, no toxicity of the culture fluid was detected. Thus, the secreted RNase contributes to cytotoxicity. Further description and comprehensive study of the properties of the new RNase will help to establish the mechanisms of its cytotoxicity and identify the areas of application of the enzyme.

Keywords: micromycetes, *Fusarium*, ribonuclease, thermostability, cytotoxicity, A549 lung adenocarcinoma cells

Acknowledgements. We are grateful to Galina Yurievna Yakovleva (PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Microbiology of Kazan Federal University) for the gift of strains of micromycetes needed for this research.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-00-00060 (KOMFI)), as well as performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Figure Captions

Fig. 1. Ribonucleolytic activity exhibited by the culture fluid of seven micromycetes on the third day of cultivation; (1) – *Fusarium* sp. isolate 1; (2) – *Penicillium* sp. isolate 1; (3) – *Mucor* sp.; (4) – *Penicillium* sp. isolate 2; (5) – *Penicillium* sp. isolate 3; (6) – *Fusarium* sp. isolate 2, (7) – control well with 25 μ L of Ogato's sterile medium; (8) – *Penicillium* sp. isolate 4; (9) – control well with 25 μ L of water. The isolate, which is most active in relation to the extracellular ribonuclease synthesis, is marked with a circle.

Fig. 2. Taxonomic positions of two micromycetes – *Fusarium* sp. 2 (a) and *Mucor* (b), which had the highest ribonucleolytic activity. Unrooted phylogenetic tree was inferred from the ITS1-ITS4 fragments by the neighbor-joining method. Numbers in the tree nodes indicate bootstrap support indices generated using 1000 replicates. Scale – substitutions per nucleotide position.

Fig. 3. Dynamics of the ribonucleolytic activity level in the culture fluid of *Fusarium sporotrichioides* and *Mucor circinelloides* in unmodified Ogato's medium.

Fig. 4. Changes in the RNase activity of the culture fluid of *Fusarium sporotrichioides* grown on Ogato's medium with modifications: Key: 1 – Ogato's medium, 2 – Ogato's medium with 0.1 g/L CaCO₃, 3 – Ogato's medium with the nitrate concentration reduced by 5 times, 4 – Ogato's medium with regular peptone replaced by the phosphate-deficient one.

Fig. 5. Changes in the viability of A549 cells depending on the concentration of the culture fluid of *Fusarium sporotrichioides* grown on Ogato's phosphate-deficient medium for three days. Cell growth upon the addition of unmodified Ogato's medium was taken as 100%. The proportion of the introduced culture fluid of *Fusarium sporotrichioides* is given as a percentage of the total volume of the culture medium of cells (black columns). Shaded column – the viability of cells upon the addition of 10% culture fluid of the micromycete grown on Ogato's medium with phosphate. Mean values \pm standard deviations are shown; * $p < 0.05$ compared with the control variant.

Fig. 6. RNase detection in the culture fluid of *Fusarium sporotrichioides* by the denaturing gradient gel electrophoresis (a) and zymography (b). Numbers indicate the culturing time of the micromycete on Ogato's medium with regular (+Phosphate) and phosphate-deficient (–Phosphate) peptone: 3 – three days, 7 – seven days. Bi – preparation of binase, a secreted alkaline RNase of *Bacillus pumilus*. M – protein molecular weight marker (Mm).

References

1. Kao R., Davies J. Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin. *FEBS Lett.*, 2000, vol. 466, no. 1, pp. 87–90. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01753-6.

2. Olombrada M., Martínez-del-Pozo A., Medina P., Budia F., Gavilanes J.G., García-Ortega L. Fungal ribotoxins: Natural protein-based weapons against insects. *Toxicon*, 2014, vol. 83, pp. 69–74. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.022.
3. Olombrada M., Lázaro-Gorines R., López-Rodríguez J.C., Martínez-Del-Pozo Á., Oñaderra M., Maestro-López M., Lacadena J., Gavilanes J.G., García-Ortega L. Fungal ribotoxins: A review of potential biotechnological applications. *Toxins* (Basel), 2017, vol. 9, no. 2, art. 71, pp. 1–21. doi: 10.3390/toxins9020071.
4. Lacadena J., Alvarez-García E., Carreras-Sangrà N., Herrero-Galán E., Alegre-Cebollada J., García-Ortega L., Oñaderra M., Gavilanes J.G., Martínez del Pozo A. Fungal ribotoxins: Molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007, vol. 31, no. 2, pp. 212–237. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00063.x.
5. Inokuchi N., Koyama T., Sawada F., Irie M. Purification, some properties, and primary structure of base non-specific ribonucleases from *Physarum polycephalum*. *J. Biochem.*, 1993, vol. 113, no. 4, pp. 425–432. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124062.
6. D'Alessio G., Riordan J.F. (Eds.) *Ribonucleases: Structures and Functions*. San Diego, Acad. Press, 1997. 670 p.
7. Yakovlev G.I., Karpeisky M.Y., Bezborodova S.I., Beletskaja O.P., Sakharovsky V.G. Guanyl-specific ribonuclease from the fungus *Penicillium chrysogenum* strain 152 and its complex with guanosine 3'-phosphate studied by nuclear magnetic resonance. *Eur. J. Biochem.*, 1980, vol. 109, no. 1, pp. 75–85. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04769.x.
8. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*, 2008, vol. 30, no. 8, pp. 781–790. doi: 10.1002/bies.20789.
9. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death. *Toxicon*, 2013, vol. 69, pp. 219–226. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.015.
10. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 2016, vol. 1863, no. 7, pt. A, pp. 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
11. Shah Mahmud R., Ilinskaya O.N. Antiviral activity of binase against the pandemic influenza A (H1N1) virus. *Acta Nat.*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 44–51. doi: 10.32607/20758251-2013-5-4-44-51.
12. Shah Mahmud R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses. *Biomed. Res. Int.*, 2017, vol. 2017, art. 5279065, pp. 1–11. doi: 10.1155/2017/5279065.
13. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, vol. 361, no. 4, pp. 1000–1005. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143.
14. Ezhov V.A., Santsevich N.I., Bezborodova S.I. Effect of orthophosphate on biosynthesis of extracellular phosphorylases by *Penicillium brevicompactum*. *Microbiology*, 1976, vol. 45, no. 2, pp. 224–229.
15. Kolpakov A.I., Il'inskaia O.N. The optimization of a method for determining RNase activity by using high-polymer RNA. *Klin. Lab. Diagn.*, 1999, no. 5, pp. 14–16.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
17. Hasunuma K., Ishikawa T. Control of the production and partial characterization of repressible extracellular 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta – Enzymol.*, 1977, vol. 480, no. 1, pp. 178–193. doi: 10.1016/0005-2744(77)90332-1.
18. Yuki S., Kondo Y., Kato F., Kato M., Matsuo N. Noncytotoxic ribonuclease, RNase T1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of Japan envelope vector. *Eur. J. Biochem.*, 2004, vol. 271, no. 17, pp. 3567–3572. doi: 10.1111/j.0014-2956.2004.04293.x.
19. Shliapnikov S.V., Bezborodova S.I., Chepurnova N.K., Dement'ev A.A. A new isoform of intracellular RNAase of F12 *Fusarium lateritium*. Characteristics and determining the primary structure. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1989, vol. 30, no. 6, pp. 1496–1499.

20. Vassilyev D.G., Katayanagi K., Ishikawa K., Tsujimoto-Hirano M., Danno M., Pähler A., Matsumoto O., Matsushima M., Yoshida H., Morikawa K. Crystal structures of ribonuclease F1 of *Fusarium moniliforme* in its free form and in complex with 2'GMP. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 230, no. 3, pp. 979–996. doi: 10.1006/jmbi.1993.1214.
21. Takeuchi H., Harada I., Yoshida H. Raman spectroscopic study on the structure of ribonuclease F₁ and the binding mode of inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta – Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1991, vol. 1078, no. 3, pp. 307–312. doi: 10.1016/0167-4838(91)90148-s.
22. Sokurenko Y., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O. Extracellular ribonuclease from *Bacillus licheniformis* (Balifase), a new member of the N1/T1 RNase superfamily. *BioMed Res. Int.*, 2016, vol. 2016, art. 4239375, pp. 1–9. doi: 10.1155/2016/4239375.
23. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease. *FEBS Open Bio*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 24–32. doi: 10.1002/2211-5463.12023.
24. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: Molecular weapons and their targets (review). *FEBS Lett.*, 2003, vol. 540, nos. 1–3, pp. 15–20. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00225-4.

Для цитирования: Ульянова В.В., Ваньков П.Ю., Зеленихин П.В., Шах Махмуд Р., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Секретируемые щелочные рибонуклеазы микромицетов // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 3. – С. 335–349. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.335-349.

For citation: Ulyanova V.V., Vankov P.Yu., Zelenikhin P.V., Shah Mahmud R., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Secreted alkaline ribonucleases of micromycetes. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 3, pp. 335–349. doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.335-349. (In Russian)