

**БЕЛКИ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ
ПРИ MALDI-TOF-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ КЛЕТОЧНОГО ЭКСТРАКТА**

© 2020 г. И. А. Рябинин^{1,*}, Н. В. Васильева^{1,**}, Т. В. Богданова^{1,***}

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России,
195196 Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: igor.ryabinin@szgmu.ru

**e-mail: mycobiota@szgmu.ru

***e-mail: tatiyana.bogdanova@szgmu.ru

Поступила в редакцию 22.03.2020 г.

После доработки 03.05.2020 г.

Принята к публикации 11.05.2020 г.

Работа посвящена анализу состава внутриклеточных белков *Penicillium chrysogenum* (на примере штамма-биодеструктора 04-1-2), доступных для обнаружения при линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии неразделенного клеточного экстракта. Кратко представлена медико-биологическая характеристика *Penicillium* spp. и *P. chrysogenum*. С помощью линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии с 4-гидроксикоричной кислотой исследовали этанольно-кислотный экстракт из мицелия 72-часовой культуры. Идентификацию белковых ионов в полученном масс-спектре в диапазоне m/z (Mr) 2–10 kDa выполнили с использованием биоинформационных ресурсов TagIdent и BLAST. В изученной фракции протеома удалось выявить следующие белки: пептид, сходный с рибосомальными белками семейства S27ae; рибосомальные белки S29e и L29, белок с CVNH-домен; субъединицы Tom6 и Tom7 митохондриальной транслоказы белков; белок суперсемейства Ost4, белок с CFEM-доменом, субъединица рибонуклеопротеидного комплекса с РНК типа H/ACA; цинк-связывающий белок семейства zf-met2; фактор сборки оксидазы цитохрома C; убиквитин-подобный белок семейства Nedd8; короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза (SDR) и белок семейства Gon7. Помимо этого, обнаружили еще 14 белков и пептидов с неустановленной функцией. Приведено описание биологической роли перечисленных белков в жизнедеятельности микроскопических грибов.

Ключевые слова: биоинформационное исследование, MALDI-TOF-масс-спектрометрия, протеомика, *Penicillium chrysogenum*

DOI: 10.31857/S0026364820060094

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Penicillium* Link являются микроскопическими грибами, которые в медицинском аспекте представляют интерес как продуценты микотоксинов, биодеструкторы различных материалов, возбудители заболеваний человека. С другой стороны, хорошо известен вклад этих грибов в фармацевтическую биотехнологию, как продуцентов природных пенициллинов.

Пенициллы занимают ведущую позицию по частоте выявления из воздуха жилых помещений вне зависимости от наличия визуальных признаков плесневого поражения. Особое значение этот факт приобретает в связи с участием компонентов гиф и спор *Penicillium* spp., а также их метаболитов в индукции микогенной аллергии. Сенсибилизация к пенициллам у больных бронхиальной астмой варьирует в широких пределах и по результатам различных исследований составляет от 18,7 до 52% от числа обследованных (Kozlova et al., 2008,

2015, 2016), а у больных муковисцидозом этот показатель составил 6% (Kozlova et al., 2017). Показано, что при atopическом дерматите сенсибилизация к аллегенами *Penicillium* spp. наряду с *Cladosporium* spp. и *Mucor* spp. коррелирует с тяжестью заболевания, а в целом у больных atopическим дерматитом частота обнаружения специфических антител-реагинов (IgE) к пенициллам составляет около 50% (Sobolev, Aak, 2012; Aak et al., 2013). Доли больных иными atopическими заболеваниями, у которых удалось обнаружить *Penicillium*-специфичные-IgE, составили 16,4% (ангионевротический отек); 10,8% (крапивница); 18,1% (аллергический ринит, Sobolev, Aak, 2012). Для выявления специфических IgE используют аллергены следующих видов пенициллов: *P. notatum* (устаревшее название, теперь *P. chrysogenum*), *P. roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. digitatum* (Алкор Био, Россия); *P. chrysogenum* и *P. glabrum* (Phadia АВ, Швеция); *P. chrysogenum* (Hitachi Chemical Diagnostics, США). В компании Hitachi Chemical Diagnostics в качестве

аллергенов для выявления сенсibilизации к пенициллам используют ферменты *P. chrysogenum*: щелочную сериновую протеазу (белок Pen n 13, массой 34 kDa), вакуолярную сериновую протеазу (белок Pen n 18, массой 32 kDa) и N-ацетилглюкозаминидазу (белок Pen n 20 массой 32 kDa).

P. chrysogenum Thom – один из наиболее распространенных видов микромицетов в окружающей среде и в жилых помещениях, продуцент микроаллергенов и низкомолекулярных биологически активных метаболитов (Meng et al., 2011). Представители данного вида способны утилизировать лигнин (Madadi, Abbas, 2017), целлюлозу (Nwodo et al., 2011), синтетические полимеры (Ojha et al., 2017), а также участвовать в биодеградации природных минеральных субстратов, например, на основе кальцита и кварца (Simonovicova et al., 2004). Адаптивные возможности представителей данного вида исключительно высоки, в частности, это подтверждается доминирующими позициями *P. chrysogenum* в составе микобиоты орбитальных станций “Салют”, “Мир” и ныне действующей международной космической станции (Viktorov et al., 1998; Alehova et al., 2009). Помимо этого, известны неоднократные находки штаммов *P. chrysogenum*, наряду с другими представителями рода *Penicillium*, в полярных регионах в образцах ледникового и подледникового льда, пробах из вечной мерзлоты, почвах тундры (Sonjak et al., 2006; Miller, Whyte, 2011; Matveeva et al., 2015). Интересно, что некоторые арктические штаммы *P. chrysogenum* оказались продуцентами ценных белковых продуктов – липазы (Bancerz et al., 2005) и “Рс-Арктина” – белка, обладающего противогрибковой активностью (Chen et al., 2013). Среди токсичных и антимикробных (помимо пенициллинов) метаболитов *P. chrysogenum* указывают секалоновые кислоты, сорбициллины, соррентанон, эмодиевые кислоты, PR-токсин, роквефортин С, мелеагрин, ксантоциллины, хризогин, хризогенин, квестиомицин, пенитриновую кислоту, негапиллин и фунгиспорин (Frisvad et al., 2004). В связи с заметным влиянием *P. chrysogenum* на различные стороны жизни человека, его актуальностью, для совершенствования экспериментальной работы с этим микромицетом необходима разработка протоколов, позволяющих экономично и быстро обнаруживать метаболиты, являющиеся маркерами различных физиологических процессов. Определенные перспективы в этой сфере открывают физико-химические методы, один из которых применен в данной работе.

Цель исследования – идентифицировать белки и пептиды, потенциально формирующие детектируемые ионы при MALDI-TOF-масс-спектрометрии клеточного экстракта *P. chrysogenum*, а также описать их биологические функции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм биодеструктора. Штамм *P. chrysogenum* 04-1-2 выделили на среде Сабуро в модификации Ч. Эммонса из серии первичных посевов материала поврежденной деревянной конструкции совместно с некоторыми другими микроскопическими грибами (*P. rugulosum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. verrucosum*, *Fusarium* sp., *Aspergillus sydowii*, *Acremonium* sp.). Чистую культуру получили путем последовательных пассажей на агаре Чапека с дрожжевым экстрактом. Культурально-микроскопическую видовую идентификацию штамма выполнили с использованием определителя “Food and Indoor Fungi” (Samson et al., 2012), а также электронного ресурса “Species and strains of subgenus *Penicillium* Database”, раздел “Polyphasic Identification” (<http://www.westerdijkinstituut.nl/Penicillium/Bioinformatics.aspx>).

Масс-спектрометрическое исследование. Для подготовки к исследованию получили пленчатую субкультуру *P. chrysogenum* 04-1-2 на 0.5 мл жидкой среды Сабуро в пробирках типа “Эппендорф” объемом 1.5 мл путем инкубации инокулюма (1 бактериологическая петля № 2, заполненная споровой массой штамма) 72 ч при 25°C. Далее выполнили отмывку материала культуры от питательной среды, затем провели экстракцию белков, как описано ранее (Ryabinin et al., 2015). MALDI-TOF-масс-спектрометрию экстракта провели на инструментах LaserToF LT2Plus (Scientific Analysis Instruments, Великобритания) с программным обеспечением и базой типовых масс-спектропрофилей VactoSCREEN (ООО НПФ Литех, Россия), а также на Autoflex speed TOF/TOF с программным обеспечением MALDI Biotyper и базой типовых масс-спектропрофилей Fungi Library (Bruker Daltonik GmbH, Германия). На обоих инструментах аналиты, обработанные насыщенным раствором α -циано-4-гидроксициннамовой кислоты в комбинированном растворителе ТАЗО, исследовали в линейном режиме с детекцией положительно заряженных ионов в диапазоне m/z 2000–20000 (данный диапазон детекции является стандартным для видовой идентификации микроорганизмов по масс-спектрометрическому белково-пептидному профилю). Калибровку обоих приборов провели стандартами производителей оборудования, включающими белковый экстракт штамма *E. coli* DH5 α с добавлением рекомбинантных препаратов миоглобина и РНКазы человека (Rausch et al., 2013). Масс-листы из полученных масс-спектров сгенерировали с использованием встроенного программного обеспечения с включением характеристик пиков с величиной отношения интенсивности сигнал : шум (S : N) не менее 3.

Аннотирование масс-спектра по показателям масс-листа произведено с помощью сетевого редактора TagIdent (<http://web.expasy.org/tagident/>),

как описано ранее (Gasteiger et al., 2005; Riabinin, Vasilyeva, 2016). Функциональную принадлежность идентифицированных белков и пептидов установили на основании (1) результатов первичного поиска по авторской информации в UniProt; (2) поиска гомологичных белков у других грибов в BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) по результатам обнаружения доменов и/или принадлежности к семействам белков, а также на основании (3) близкого сходства с белками установленной функции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам масс-спектрометрического исследования для дальнейшего анализа выбран масс-спектр (H18) с которым получили наивысшие показатели достоверности идентификации: бальная оценка (score value) 2.089, категория идентификации A (приведены показатели для системы MALDI Biotyper; для VastoSCREEN-ID с аналогичным образцом показатель “спектр” составил 0.81). Наиболее схожим с оригинальным масс-спектро-профилем оказались типовые масс-спектро-профили штаммов *P. chrysogenum* F74 LLH (Fungi Library, MVZ Labor Dr. Limbach, Гейдельберг, Германия) и *P. chrysogenum* LT2832 (VastoSCREEN, неуточненного происхождения). Во flexAnalysis сформирован масс-лист, включающий характеристики 62 пиков. При аннотировании удалось найти белки и пептиды, соответствующие 26 пикам (42%), прочие пики, очевидно, сформированы полипептидами, которые образуются из предшественников в результате протеолиза. Поэтому их формирование невозможно спрогнозировать с использованием данных полногеномного секвенирования, что включает в себя процедура работы в TagIdent. Тем не менее, у 5 “спектрообразующих” полипептидов выявлен факт происхождения от предшественников за счет наличия в аминокислотной цепи последних так называемых “сигнальных” концевых пептидных последовательностей, которые типично отщепляются на этапе посттрансляционной модификации. Результат аннотирования масс-спектра представлен в табл. 1.

Для пиков с m/z , равной 7992.416 и 8872.475 выявили по два полипептида, которые могут их формировать альтернативно в силу близких молекулярных масс. При аннотировании сделали допущение превышения значений молекулярных масс пептидов над величинами m/z пиков не более, чем на 2 Da, что мы объясняем особенностями изотопного состава белков изученного штамма и процессами, возникающими при MALDI-ионизации полипептидов, которые еще не вполне изучены. Как оказалось при анализе, все обнаруженные белки и пептиды депонированы в международной базе UniProt в результате исследования генома ти-

пового штамма *P. chrysogenum* CBS 306.48. У 5 белков и пептидов имеются трансмембранные домены. Функциональные свойства в разной степени подробности идентифицированы у 14 полипептидов (не включая тех представителей, у которых найден только трансмембранный домен).

Обращает на себя внимание тот факт, что при проведении нами обратного анализа (по методу (Serova et al., 2019)) оказалось, что в протеоме *P. chrysogenum* в рассматриваемом здесь диапазоне M_r возможно определить свыше 1500 белков и кодируемых пептидов. В данном же исследовании напротив, состав спектрообразующих белков оказался ограниченным. Причинами данного феномена, гипотетически, могут быть следующие явления: 1) конкурентный принцип взаимодействия белков и пептидов с молекулами матрицы; 2) влияние на процесс MALDI-ионизации иных (особенно ароматических) соединений, возбуждающихся от действия ионизационного УФ-лазера; 3) неравномерная ионизация белков и пептидов исследуемого диапазона M_r в силу различия концентраций в клетке, а также действия факторов (1) и (2): в данном случае ионы самых разнообразных белков и пептидов оказываются на детекторе MALDI-TOF-масс-спектрометра, однако, “контур” масс-спектра формируют пики ионов с максимальной интенсивностью, а прочие не удается определить на их фоне. Установить достоверность этих явлений и их фактический вклад в процесс линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии на данный момент невозможно в силу не вполне достаточных знаний о процессе MALDI-ионизации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Следует остановиться на биологической роли отдельных обнаруженных пептидов и белков, а также их групп, в аспекте значения для поддержания жизнеспособности изученного микроорганизма.

Группа белков, участвующих в биогенезе рибосом, включает субъединицу рибонуклеопротеидного комплекса с РНК типа H/ACA, а также рибосомальные белки S29e, L29 и вероятный пептид семейства S27ae. Последние три представителя входят в структуру рибосом непосредственно, а у первого названного белка иная роль в данной группе. Субъединица рибонуклеопротеидного комплекса H/ACA является представителем белков семейства Nor10p. Данные белки (совместно с другими) ассоциированы с ядрышковой РНК типа H/ACA, участвуют в формировании 18S рибосомальной РНК, а также в процессе псевдоуридинирования ядрышковой РНК (Yu et al., 2014).

Митохондриальные белки среди найденных представлены субъединицами Tom6 и Tom7 транслоказного комплекса наружной митохон-

Таблица 1. Результаты аннотирования масс-спектра *Penicillium chrysogenum* 04-1-2

m/z	Mr	ΔMr	N а/к	Аминокислотная последовательность (FASTA)	Примечание
2179.953	Не поддается аннотированию.				
2675.213	2680	5	30	MNGHAAСRКCGAAADGAGKSCGACGATCPV	Пептид, сходный с рибосомальными белками семейства S27ac (?) ¹ .
В диапазоне 2727.833 – 3106.834 серия из 4-х пиков, не поддающихся аннотированию.					
3141.584	3153	11	30	MDISFKIAEMEKLTGDVSPNGEQDGP SLGS	Функция неизвестна.
В диапазоне 3249.662 – 3697.175 серия из 9-ти пиков, не поддающихся аннотированию.					
4421.512	4451	29	58	ARTGPGGLGLGGAGTSLGGGGGGGGGAGSSLGAGLGGAGDGF	Предшественник из 76 а/к мас-сой 6361 Da.
Пики 4535.111 и 4820.080 не поддаются аннотированию.					
5000.053	5061	61	50	VPVPNQGDVSVANRDVGDIDAAAADANVSGDASVNVKRDEVAIILNEEAN	Предшественник из 67 а/к мас-сой 6802 Da.
5172.783	5218	45	49	MADTALEACVYVAITDAAAAPLASALPAPATALRNKSPIWARWFEPFKE	Функция неизвестна.
5854.945	5903	48	55	MSKRTLEESRAGAHMSPDADNGLLPIQDLLSPGEEHGGSSGSPKPRNFIATV	Функция неизвестна.
5950.690	5950	0	54	MSDVSPQPTELICYSTARVIPKAKARISTSQNRGHSHTTHERKDHNSLPSLPP	Функция неизвестна.
5998.490	6014	16	54	GPSKFADTCQDIDGEGTTLRAQCQERENGQLRWSSLDLNRICKNNKGTLLKCGKK	Несет CVNH-домен.
					Предшественник из 72 а/к мас-сой 7915 Da.
6023.234	6078	44	56	MCMKATCSTCNKVTTWWGCGNHIPSVMDSVPEGDWCSCSTPQVEKDGKКYPPKAAKAA	Функция неизвестна.
6139.960	Не поддается аннотированию.				
6167.880	6168	0	53	MVEFSEETKERVSKVIDISRVAIHGYLPLIVLYGTYSEPKPTLRLFSPLA	Рецепторная субъединица Том7 митохондриальной транслоказы белков ТОМ. Несет трансмембранный домен.
В диапазоне 6210.141 – 6295.047 серия из 3-х пиков, не поддающихся аннотированию.					
6495.554	6513	17	59	MPGRTRPVEKIAKASAQCSVEVAAYGKCWTDYNSVHKDMCVKEFMRLKNCYLAASKKG	Функция неизвестна.
6518.940	6522	3	60	MAPNQRIVPSGSRPQKGFVSTLYDEATNPENKTIVRSLVFGAGIAFLHSSFGFLLPPM	Субъединица Том6 митохондриальной транслоказы белков ТОМ ² . Несет трансмембранный домен.
Пики 6558.432 и 6588.466 не поддаются аннотированию.					
6619.238	6629	10	64	MGAVVSCIQSVFRAIGSCLMGIVNAIGSVCHAIISGWTVIDVHISCLTCGYCGKRRRRRSAAV	Несет 2 трансмембранных домена.
6639.024	6650	11	61	MASTLKTAPSPPLSRARNGNHMINLAGSPNELICALWRTSKHYSKCDEEGSSGIGHK-MLW	Функция неизвестна.
6666.516	Не поддается аннотированию.				
6720.846	6721	0	56	MTHESVWYSRPRKYGKGSRECRVCSHRAGLRKYGMNICRQCREFREKSTDIGFSKYR	Рибосомальный белок малой субъединицы (40S). Белок S29e (семейство S14p/S29e).
В диапазоне 6763.136 – 6825.619 серия из 4-х пиков, не поддающихся аннотированию.					

Таблица 1. Окончание

m/z	Mг	δMг	N a/к	Аминокислотная последовательность (FASTA)	Примечание
7207.057	7206	1*	67	MISDDDDLYRLAIFLGSCAMLMIVLYHFHFLDVNASEEEEEPEVESANQIKASGAVPAVSTDKVVS ASRKGN	Белок суперсемейства Ost4. Несет трансмембранный домен.
Пики 7365.270 и 7375.514 не поддаются аннотированию.					
7392.075	7394	2	62	MKGTPTFVRGIYEKGLGTMKQLVASFLFHYFRNRKKNFRLEDEEMVLVNYGNGVALIDFL- WIRY	Функция неизвестна.
7418.948	7429	10	72	DPLDDASPDLIRKINEASAVAGCISVDYKCTCPSPAFKDTLGLACLDASGSPEDFEVAGELH KERCGGSPQP	Несет домен CFEM. Предшественник из 90 а/к мас- сой 9409 Da
Пики 7445.659 и 7456.779 не поддаются аннотированию.					
7479.841	7478	2*	65	MHLMYTLDNEGKRVYTLKKVNLNGEVTKSAHPARFSPDDKYSRHRVTLKKRYGLLLTQQS KASAKA	Субъединица рибонуклеопроте- идного комплекса с РНК типа H/ACA.
7521.707	7522	0	65	MAKSKNASQHNSQKAHRNGIKPKNTNRYPSLKGVDPKFRRNRHRAHGTMKALKERK EGKREVA	Рибосомальный белок L29 боль- шой субъединицы (60S).
7992.416	8003	11	73	MGNKAKANMKRERNAKDTKTAKSQTSEKAMNIQCQVCRQTFLQTTKAPALLEHAS NKHNKGLPECFFGISA	Представитель семейства zf-met2 (цинк-связывающие белки).
8006	8006	14	72	MATGIFNSTYYGKDYRAGAALLRARRPYLFKNITITGFGFLFAFTIAYTYTTLKAVGQEEFAD VKVPEAPADKK	Вероятно, несет домен DUF1909 ³ . Фактор сборки оксидазы цито- хрома С. Несет трансмембранный домен.
8843.974	8851	7	86	MPATGPLRNGARRKPHAVIARRRELENEFAADMVRRANARLAEEFGPEAARGGGAPA HGNFRGGARGGRGGGGPPPGWQ	Функция неизвестна.
8872.475	8874	2	80	KKINMHCKFAEDNTGMVQPYCCRDMPARGNPKANEALDCDQLKVPQLCEDQSRPAC CYTIGPKKICTGHVIFQDAADV	Предшественник из 97 а/к массой 10562 Da.
8875	8875	3	79	MQFLIVRPKNLHVAEFIGLSPDRVTFVKTVIQSGMSAFQLDFVAISSLKLGNLCCERTIHS VTKTLRLQALSAMLYQ	Функция неизвестна.
9070.808	9086	16	82	MLIKVRTLTKKEIIEIDIERPDYKVSRIKERVEEKEGIPPVQQRLLIFGGKQMADDDKTASEYNLE GGATLHLVLAALRGGCAAKSM	Убиквитин-подобный белок семейства Nedd8.
9948.169	9947	1*	92	MFPNQIVLVSGASGFVATHVLDAFLSAGYSVQGMVRSVKVADKVLRTCPQYKVKLSFAIVS DIGKPNVAVDGGCREARRQYHSHNESGVPGER	Короткоцепочная дегидроге- наза/редуктаза (SDR).
9997.682	9999	1	91	MASNTSLSAVYTAPOQTETFEHVISTTTGTLAAKQAHLSALQSLVPKLQDQINVFLTERMEE DKKVQGGQLSAQEAKEEENYGEVWEDMIA	Белок семейства Gon7.
10286.687	Не поддается аннотированию.				
Пики в диапазоне более высоких значений m/z имели значение индекса отношения S/N < 3, поэтому в аннотацию не включены.					

Примечание: m/z – отношение массы ионов заряду, относительная величина из масс-листа; Mг – ближайшая молекулярная масса пептида или белка; δMг – разница молекулярной массы пептида и величина m/z его иона по модулю с округлением до целых значений, знаком отмечены значения в случаях, когда m/z > Mг (о данных исключениях см. ниже в тексте); N a/к – число аминокислот в пептиде. Примечания: 1 – на основании сходства с рибосомальным белком S30 (семейство S27ae) у *Talaromyces marneffii* PM1 (идентичность 70%, перекрытие последовательности 90%). Оба пептида короче типичных представителей семейства. 2 – на основании сходства с белком Tom6 *P. digitatum* Pd1 (идентичность 90%, перекрытие последовательности 98%). 3 – на основании сходства с DUF1909-домен-несущим белком *Ustilaginoides virens* (идентичность 73%, перекрытие последовательности 100%).

дриальной мембраны (ТОМ), и фактором сборки оксидазы цитохрома С.

Первые две группы белков являются эссенциальными для поддержания пластического и энергетического обмена у эукариотических организмов, равно как и для адаптации в различных условиях существования. В связи с этим обстоятельством не вызывает вопрос их обнаружение в составе низкомолекулярной фракции протеома в количествах, достаточных для детекции масс-спектрометром.

Впервые CFEM-домен-несущий белок (Common in Fungal Extracellular Membrane protein) описали в 2003 г. R.D. Kulkarni и соавторы (2003). Этот домен, богатый цистеином, свойственен внеклеточным мембранным белкам микроскопических грибов. Уже при открытии авторы предположили у CFEM-белков особую роль в реализации патогенности микромицетов, в частности, у вредителя риса *Magnaporthe grisea*. Как установили позднее, домен CFEM встречается только у представителей отделов *Ascomycota* (кроме подотдела *Taphrinomycotina*) и *Basidiomycota*, но не у других живых организмов. У патогенных и условно-патогенных грибов CFEM-белков больше, чем у непатогенных, хотя фитопатогенные грибы имеют больше генов, кодирующих CFEM-белки, чем грибы, имеющие медицинское значение (20 у *M. grisea*, 10 у *Sclerotinia sclerotiorum*; только по 3 гена у *Histoplasma capsulatum* и *Cryptococcus neoformans*; Zhang et al., 2015). Механизмы действия CFEM-белков, как и биологические функции, очевидно, различаются. Так у *Candida albicans* одним из CFEM-несущих белков является гемофор Csa2, участвующий в захвате ионов Fe^{+3} в тканях человека, иные белки этого типа у данного гриба связаны с формированием биопленки (Nasser et al., 2016). У *Aspergillus fumigatus*, напротив, захват железа такими белками не опосредован, CFEM белки у данного гриба представлены тремя гликофосфатидилинозитол-якорными белками, которые связывают клеточную стенку гриба с цитоплазматической мембраной (Vaknin et al, 2014). У “нокаутированных” штаммов утрата этих белков, как оказалось, серьезно не нарушает клеточную организацию гриба, также показано, что данные белки не связаны с вирулентностью *A. fumigatus*. В отношении обнаруженного здесь CFEM-белка функциональную принадлежность с использованием поиска гомологов в BLAST уточнить не удалось: десятки ближайших сходных белков у других грибов еще не снабжены подробными характеристиками.

Белок семейства Gon7 является частью комплекса KEOPS (Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size), которому приписывают участие в трансляции, процессах, затрагивающих теломеры, а также разделении хромосом. Важнейшим действием данного комплекса является модификация транспортной РНК с образованием

треонил-карбамоил-аденозина (Srinivasan et al., 2011).

Убиквитин-подобный белок семейства Nedd8 является необходимым компонентом для активации мультибелкового комплекса куллин-RING-лигазы. Конъюгирование Nedd8 с белками называют “неддияция”. Куллин-RING-лигаза является убиквитин-лигазой, участвующей в посттрансляционной модификации белков для маркирования молекул, подлежащих протеасомному разрушению, либо в качестве иного регуляторного воздействия. Роль ферментов семейства куллин-RING-лигаз в обеспечении жизнедеятельности микроскопических грибов исключительна. Так на мутантных штаммах *Schizosaccharomyces pombe* показано, что утрата Nedd8, либо субстрата для лигирования с ним — куллина, либо лигирующих ферментов оказывает летальный эффект, а некоторые мутации в генах куллинов вызывают остановку клеточного цикла в фазе G2 (Osaka et al., 2000). Выявлена регуляторная роль неддияции в работе центросомы. В последние 2 десятилетия открыли еще несколько типов белков, подвергшихся неддияции, из них особый интерес вызывает работа, в которой сообщают о стабилизирующей роли Nedd8 при конъюгации с рибосомальными белками, хотя у микроскопических грибов этот процесс еще не подтвердили (Rabut, Peter, 2008).

Следует также заметить, что в результате экспрессии генов, кодирующих рибосомальные белки семейства S27ae (вероятный представитель обнаружен нами при аннотировании), происходит синтез убиквитина из общего с S27 белка-предшественника. Интенсивный биосинтез убиквитина и Nedd8 указывает на активацию регуляторных процессов, сопутствующих росту и дифференцировке молодой культуры гриба. Совместное присутствие Nedd8 и Gon7 является индикатором процесса клеточного деления, также сопутствующего росту *P. chrysogenum*.

Циановирин-подобный белок (CyanoVirin-N Homology domain) известен у некоторых видов цианей, аскомицетов и водных папоротников; он способен связывать различные биогенные молекулы с открытыми (доступными для взаимодействия) остатками маннозы или полисахаридными фрагментами. Широкую известность приобрела антивирусная активность CVNH-белков, лучше изученная у родоначальника данной группы циановирина-N, которая проявляется во взаимодействии с поверхностными структурами вирионов (Singh et al., 2017). Собственная функция циановирина-подобных белков и микроскопических грибов еще не определена. У фитопатогена *Magnaporthe grisea* белок с доменом CVNH в клеточной стенке закрывает остатки N-ацетилглюкозамина в составе хитина, таким образом скрывая его от хитиназ организма хозяина (риса; Koharudin et al.,

2011). Можно предположить, что у грибов CVNH-белки участвуют в защите от миковирусов (в частности, у *P. chrysogenum* такие агенты известны) (Caston et al., 2013), но эта гипотеза нуждается в экспериментальной проверке.

Белок суперсемейства Ost4 — одна из субъединиц фермента олигосахарилтрансферазы (у *Saccharomyces cerevisiae* комплекс включает 9 неидентичных субъединиц) (Hese et al., 2009). Олигосахарилтрансфераза осуществляет посттрансляционное превращение широкого круга белков (несколько тысяч у высших эукариот) посредством их N-гликозилирования с олигосахаридами. У эукариот данный комплекс сосредоточен вблизи рибосом на шероховатой эндоплазматической сети. Из всех компонентов Ost4 является наименьшим, этот пептид выполняет функцию стабилизатора в субкомплексе Stt3p-Ost4p-Ost3p (первая из этих трех субъединиц является собственно каталитической). У штаммов *S. cerevisiae* мутации Ost4, приводящие к замене аминокислотных остатков в положении 18–24 на заряженные аминокислоты, проявляются в резком снижении или прекращении роста культур при 37°C (Chaudhary et al., 2017). Также и у *Aspergillus fumigatus* дефект олигосахарилтрансферазы ведет к резкому снижению темпов роста культуры (Li et al., 2011).

Цинк-связывающий белок семейства zf-met2, исходя из большого круга гомологов, является представителем группы, довольно широко встречающейся у эукариот. Среди прокариот отдаленно сходный белок есть только у *Acinetobacter baumannii*. Не удалось найти работ, в которых обсуждают биологические свойства zf-met2-несущих белков. Помимо цинк-связывающего домена у найденного белка имеется домен DUF1909. По единственному сообщению о белках такого типа известно, что DUF1909-несущий белок предположительно кодируется одним из *vic*-генов, необходимых для развития миковирусной инфекции у мицелиального гриба *Cryphonectria parasitica* (Zhang et al., 2014).

Короткоцепочная дегидрогеназа/редуктаза (SDR) — фермент, у которого в данном случае трудно установить достаточно точную функциональную принадлежность. На основании поиска в структуре данного представителя консервативных белковых доменов можно утверждать, что он является НАДФН-зависимой эписимеразой, взаимодействующей с субстратом(ами) типа “углевод — нуклеотид”. Обнаруженному ферменту в разной степени присущи аминокислотные сайты, свойственные группам оксидоредуктаз различного иерархического положения: альдегидредуктазы, SDR расширенного типа (е-уровень 4.51e-16); нуклеотиддифосфат-углевод-эписимеразы типа WcaG, ассоциированные с биосинтезом поверхностных структур клетки (е-уровень 7.68e-05); гопаноид-ассоциированные эписимеразы сахаров типа HrpA (не характерные ферменты у эукариот, е-уровень

1.31e-05); НАД-зависимые эписимеразы/дегидрогеназы (е-уровень 4,29e-04); дигидрофлавоин-4-редуктазы (е-уровень 1.1e-03).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее обстоятельное исследование протеома *P. chrysogenum* выполнила группа испанских исследователей, применивших традиционный подход к изучению состава внутриклеточных белков, принципиально включающий 2D-гель-электрофорез, трипсинолиз и масс-спектрометрическую идентификацию (MALDI-TOF-MS в тандемном режиме; Jami et al., 2010). В сравнении с исследованиями у других условно-патогенных микромицетов, результаты, полученные авторами у *P. chrysogenum*, можно считать исключительными — выявили 549 различных белков, если учитывать количество с изофомами, то 976. При детальном анализе приведенного списка белков оказалось, что наиболее легкие из них имеют массу около 11 kDa. Таким образом, несмотря на то, что приведенное здесь упрощенное белково-пептидное профилирование позволило получить очень небольшой набор идентифицированных белков, его можно рассматривать в качестве дополнительного подхода к изучению полного протеома микроорганизмов, в том числе — мицелиальных грибов. Теоретически, используя другие матрицы для MALDI-TOF-MS, позволяющие ионизировать высокомолекулярные белки, представляется вероятным расширить возможности метода. Однако поскольку с возрастанием Mг (до некоторого предела) увеличивается количество белков, образующих ионы с очень близкими m/z, очевидно, для выявления высокомолекулярной части протеома в любом случае потребуется предварительное фракционирование клеточного экстракта. Наиболее сложно видится дальнейшее исследование пептидома *P. chrysogenum*: экспериментальное исследование полного комплекса внутриклеточных и/или секретиремых пептидов этого гриба еще не проводили. Часть пептидома удается предсказать в результате аннотации данных полногеномного секвенирования, обычно благодаря этому в базах данных появляются сведения о предполагаемых пептидах, которые часто относятся к относительно консервативным “сигнальным” последовательностям, высвобождающихся после протеолиза пребелка на этапе посттрансляционной модификации. Помимо этого, описывают гипотетические пептидные последовательности, которые кодируются, как самостоятельные метаболиты. Существование таких последовательностей спорно: кодирующие их локусы чаще распознаны только как открытые рамки считывания (ORF), их принадлежность к истинным структурным генам требует доказательств.

Несомненными достоинствами линейной MALDI-TOF-масс-спектрометрии являются определенное сочетание возможностей разделения и детекции белков (белковых ионов), сосредоточенных в одном исследовании, минимальная трудозатратность в сравнении с традиционными технологиями протеомики, относительная устойчивость к наличию примесных соединений и отсутствие (во многих случаях) необходимости проводить сложные процедуры очистки аналита(ов). В связи с этими обстоятельствами наработка кратких протеомных карт микромицетов, что нами проведено для *P. chrysogenum*, в дальнейшем позволит проводить исследования на крупных выборках штаммов, в том числе на уровне межлабораторного взаимодействия. Однако уже сегодня можно констатировать:

1) Линейная MALDI-TOF-масс-спектрометрия с биоинформационным анализом результатов позволяют выявлять белковые метаболиты *P. chrysogenum*, участвующих в критических физиологических актах его клеток;

2) MALDI-ионизация клеточного экстракта *P. chrysogenum*, как и в отношении других микроорганизмов (микромицетов), отличается высокой селективностью по набору формируемых и детектируемых белковых ионов;

3) Среди прочих, в изученной фракции протеома *P. chrysogenum* удалось выявить белки, потенциально связанные с миковирусной инфекцией, косвенно указывающие на активацию эндогенного миковируса (хризовируса);

4) Ограничение в возможности аннотировать отдельные пики – идентифицировать формирующие их полипептиды по функциональной принадлежности – связано в определенной степени с неполной аннотацией геномов типовых штаммов *P. chrysogenum*, которую следует дополнить для достижения максимальных возможностей использованного протокола исследования.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минздрава России “Молекулярно-биологические особенности грибковых патогенов и молекулярные механизмы иммунопатогенеза микозов как основа разработки новых методов диагностики, профилактики и лечения микотических заболеваний” (№ АААА-А16-116062810086-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aak O.V., Frolova E.V., Filippova L.V. et al. Mold sensitization and the severity of atopic dermatitis. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2013. V. 15 (3). P. 10–13 (in Russ.).
- Alehova T.A., Alexandrova A.V., Zagustina N.A. et al. Microfungi in the Russian segment of the international space station (ISS RS). *Mikologiya i fitopatologiya*. 2009. V. 43 (5). P. 377 (in Russ.).
- Bancerz R., Ginalska G., Fiedurek J. et al. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 32 (6). P. 253–260.
- Caston J.R., Luque D., Gomez-Blanco J. et al. *Chrysovirus* structure: repeated helical core as evidence of gene duplication. *Advances in Virus Research*. 2013. V. 86. P. 87–108.
- Chaudhary B., Mazumder S., Mohanty S. Production and biophysical characterization of a mini-membrane protein, Ost4V23D: A functionally important mutant of yeast oligosaccharyltransferase subunit Ost4p. *Protein Expression and Purification* 2017. V. 139. P. 43–48.
- Chen Z., Ao J., Yang W. et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment. *Applied microbiology and biotechnology* 2013. V. 97 (24). P. 10381–10390.
- Food and Indoor Fungi. CBS laboratory manual series. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, 2012.
- Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 2004. 49: 201–241.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: J.M. Walker (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, 2005, pp. 571–607.
- Hese K., Otto C., Roitner F.H. et al. The yeast oligosaccharyltransferase complex can be replaced by STT3 from *Leishmania major*. *Glycobiology*. 2009. V. 19 (2). P. 160–171.
- Jami M.S., Barreiro C., Garcia-Estrada C. et al. Proteome analysis of the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Cell. Proteomics*. 2010. V. 9 (6). P. 1182–1198.
- Koharudin L.M.I., Viscomi A.R., Montanini B. Structure-function analysis of a CVNH-LysM lectin expressed during plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Structure*. 2011. V. 19 (2). P. 662–674.
- Kozlova J.I., Frolova E.V., Filippova L.V. et al. Mycogenic sensitization in the patients with bronchial asthma in Saint-Petersburg. *Medical Immunology*. 2015. V. 17. P. 97 (in Russ.).
- Kozlova J.I., Sobolev A.V., Borzova Yu.V. et al. Mycogenic sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients: results of prospective study. *Farmateka*. 2017. V. 4 (337). P. 44–49 (in Russ.).
- Kozlova J.I., Sobolev A.V., Frolova E.V. et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients suffering with bronchial asthma: dynamics of immunological characteristics on the background of the antimicrobial therapy usage. *Russian Allergology Journal*. 2016. V. 6. P. 37–42 (in Russ.).
- Kozlova J.I., Vasilyeva N.V., Chilina G.A. et al. Mycogenic allergy at inhabitants of premises, contaminated by microfungi. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2008. V. 10 (2). P. 17–21 (in Russ.).
- Kulkarni R.D., Kelkar H.S., Dean R.A. et al. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003. V. 28 (3). P. 118–121.

- Li K., Ouyang H., Lu Y., Liang J. et al. Repression of N-glycosylation triggers the unfolded protein response (UPR) and overexpression of cell wall protein and chitin in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 2011. V. 157 (7). P. 1968–1979.
- Madadi M., Abbas A. Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2017. V. 8 (2). <https://www.omicsonline.org/peer-reviewed/lignin-degradation-by-fungal-pretreatment-a-review-86511.html>. Accessed 15 November 2017.
- Matveeva N.V., Zanolka L.L., Afonina O.M. et al. Plants and fungi of the polar deserts of the northern hemisphere. Marafon, Saint-Petersburg, 2015 (in Russ.).
- Meng L., Sun P., Tang H. Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2011. V. 39 (2). P. 163–165.
- Miller R.V., Whyte L. Polar microbiology: Life in a Deep Freeze. ASM Press, Washington, 2012.
- Nasser L., Weissman Z., Pinsky M. Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nature Microbiol.* 2016. V. 1 (11). <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016156>.
- Nwodo S., Chinedu S.N., Okochi V.I. Cellulase production by wild-type *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Trichoderma harzianum* using waste cellulosic materials. *IFE J. Sci.* 2011. V. 13 (1). P. 57–62.
- Ojha N., Pradhan N., Singh S. et al. Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*. 2017. V. 7. <https://www.nature.com/articles/srep39515>. Accessed 5 November 2017
- Osaka F., Saeki M., Katayama S. et al. Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast. *The EMBO Journal*. 2000. V. 19 (13). P. 3475–3484.
- Rabut G., Peter M. Function and regulation of protein neddylation. Protein modifications: beyond the usual suspects. Review Series. *EMBO Reports*. 2008. V. 9 (10). 969–976.
- Raush E.R., Vasilyeva N.V., Shagdilyeva E.V. et al. Species identification of etiologic agents of invasive candidosis: in search of quick decision. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2013. V. 15 (4). P. 87–91 (in Russ.).
- Ryabinin I.A., Vasilyeva N.V. Polypeptides from *Aspergillus* spp. forming mass-spectra during MALDI-TOF-mass-spectrometry. In: Wu Lien-Teh Forum. The 3rd China-Russian international conference on microbiology, immunology and related diseases (CRICMID 2016). Harbin, Beijing, 2016, pp. 36–38.
- Ryabinin I.A., Erschova A.I., Bataeva X.D. Analysis of the identification and grouping of mass-spectra obtained by MALDI-TOF-mass-spectrometry of protein extracts from *Aspergillus fumigatus* Fres. cultures. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2015. V. 17 (1). P. 52–57 (in Russ.).
- Serova N.Y., Pravdivets A.S. Reconstruction of the spectra-forming proteins' composition of *Coccidioides immitis*, forming the mass-spectrum during MALDI-TOF-mass-spectrometry. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2019. V. 21 (2). P. 127–128 (in Russ.).
- Simonovicova A., Godyova M., Sevc J. Airborne and soil microfungi as contaminants of stone in a hypogean cemetery. *International Biodeterior. Biodegrad.* 2004. V. 54 (1). P. 7–11.
- Singh R.S., Walia A.K., Khattar J.S. et al. Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. *International J. Biological Macromolecules*. 2017. V. 102. P. 475–496.
- Sobolev A.V., Aak O.V. Clinic, diagnosis and treatment of mycogenic allergy. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2012. V. 14 (1). P. 37–39 (in Russ.).
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. *Penicillium* mycobiota in arctic subglacial ice. *Microbial Ecology*. 2006. V. 52 (2). P. 207–216.
- Srinivasan M., Mehta P., Yu Y. et al. The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *The EMBO Journal*. 2011. V. 30 (5). P. 873–881.
- Vaknin Y., Shadkchan Y., Levdansky E. et al. The three *Aspergillus fumigatus* CFEM-domain GPI-anchored proteins (CfmA-C) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal virulence. *Fungal Genet. Biol.* 2014. V. 63. P. 55–64.
- Viktorov A.N., Novikova N.D., Deshevaya E.A. et al. Residential colonization of the orbital complex “Mir” environment by *Penicillium chrysogenum* and the problem of ecological safety in long-term space flight. *Aerospace and Environmental Medicine*. 1998. V. 32 (5). P. 57–62 (in Russ.).
- Yu Y.T., Meier U.T. RNA-guided isomerization of uridine to pseudouridine – pseudouridylation. *RNA Biology*. 2014. V. 11 (12). P. 1483–1494.
- Zhang D.X., Spiering M.J., Dawe A.L. et al. Vegetative incompatibility loci with dedicated roles in allorecognition restrict mycovirus transmission in chestnut blight fungus. *Genetics*. 2014. V. 197 (2). P. 701–714.
- Zhang Z.N., Wu Q.Y., Zhang G.Z. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. *Scientific Reports* 5. 2015. <http://www.nature.com/articles/srep13032>. Accessed 23 November 2017
- Aak O.B., Фролова Е.В., Учеваткина А.Е. и др. (Aak et al.) Микогенная сенсбилизация и степень тяжести атопического дерматита // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. № 3. С. 10–13.
- Алехова Т.А., Александрова А.В., Загустина Н.А. и др. (Alekhova et al.) Микроскопические грибы на российском сегменте международной космической станции // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. № 5. С. 377.
- Викторов А.Н., Новикова Н.Д., Дешева Е.А. и др. (Viktorov et al.) Резидентное заселение среды на орбитальном комплексе “Мир” *Penicillium chrysogenum* и проблема экологической безопасности в длительном космическом полете // Авиакосмическая и экологическая медицина. Т. 32. № 5. 1998. С. 57–62.
- Козлова Я.И., Васильева Н.В., Чилина Г.А. и др. (Kozlova et al.) Микогенная аллергия у жителей помещений, пораженных микромицетами // Проблемы медицинской микологии. 2008. Т. 10. № 2. С. 17–21.
- Козлова Я.И., Соболев А.В., Борзова Ю.В. и др. (Kozlova et al.) Микогенная сенсбилизация и аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных муковисцидозом: результаты проспективного исследования // Фарматека. 2017. № 4 (337). С. 44–49.

- Козлова Я.И., Соболев А.В., Фролова Е.В. и др. (Kozlova et al.) Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой: динамика иммунологических характеристик на фоне применения антимикробной терапии // Российский аллергологический журнал. 2016. № 6. С. 37–42.
- Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В. и др. (Kozlova et al.) Микогенная сенсибилизация у пациентов с бронхиальной астмой в Санкт-Петербурге // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. С. 97.
- Матвеева Н.В., Заноха Л.Л., Афонина О.М. и др. (Matveeva et al.) Растения и грибы полярных пустынь северного полушария. Санкт-Петербург: Изд-во Марафон, 2015. 320 с.
- Раух Е.Р., Васильева Н.В., Полищук А.Г. и др. (Rausch et al.) Определение видов возбудителей инвазивного кандидоза: в поиске быстрых решений // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. № 4. С. 87–91.
- Рябинин И.А., Еришова А.И., Батаева К.Д. (Ryabinin et al.) Анализ процессов идентификации и группировки масс-спектров, получаемых при MALDI-TOF-масс-спектрометрии белковых экстрактов из культур *Aspergillus fumigatus* Fres. // Проблемы медицинской микологии. 2015. Т. 17. № 1. С. 52–57.
- Серова Н.Ю., Правдивец А.С. (Serova, Pravdivets) Реконструкция спектрообразующих белков *Soccidioides immitis*, формирующих масс-спектр при MALDI-TOF-масс-спектрометрии // Проблемы медицинской микологии. 2019. Т. 21. № 2. С. 127–128.
- Соболев А.В., Аак О.В. (Sobolev, Aak) Клиника, диагностика и лечение микогенной аллергии // Проблемы медицинской микологии. 2012. Т. 14. № 1. С. 37–39.

***Penicillium chrysogenum* Proteins Detected by MADI-TOF-Mass-Spectrometry of Cellular Extract**

I. A. Ryabinin^{a,#}, N. V. Vasilyeva^{a,##}, and T. V. Bogdanova^{a,###}

^a *I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: igor.ryabinin@szgmu.ru*

^{##}*e-mail: mycobiota@szgmu.ru*

^{###}*e-mail: tatiyana.bogdanova@szgmu.ru*

The work is devoted to the analysis of the composition of *Penicillium chrysogenum* intracellular proteins (using of biodestructor strain 04-1-2 as an example), which are available for detection in linear MALDI-TOF mass-spectrometry of undivided cellular extract. Characteristics of *Penicillium* spp. and *P. chrysogenum* in medical and biological aspects are briefly presented. Ethanolic/acidic extract from the mycelium of 72-hour culture was studied using linear MALDI-TOF-mass spectrometry with 4-hydroxycinnamic acid. Identification of protein ions in the resulting mass spectrum in m/z (Mr) range 2–10 kDa was performed using the bioinformatics resources TagIdent and BLAST. The following proteins were detected in the studied fraction of the proteome: a peptide similar to the ribosomal proteins of the S27ae family; ribosomal proteins S29e and L29, CVNH-domain-containing protein; Tom6 and Tom7 mitochondrial translocase subunits; Ost4 superfamily protein, CFEM-domain-containing protein, H/ACA ribonucleoprotein complex subunit; zinc-binding protein of the zf-met2 family; cytochrome C oxidase assembly factor; Nedd8 family ubiquitin-like protein; short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) and Gon7 family protein. In addition, 14 proteins and peptides with an unidentified function were found. The biological role of listed proteins in the vital activity of microscopic fungi is described.

Keywords: MALDI-TOF-mass-spectrometry, proteomics, *Penicillium chrysogenum*, research in bioinformatics