

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СПОСОБНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ МИКРОМИЦЕТОВ *ASPERGILLUS FLAVIPES*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS* И *ASPERGILLUS SYDOWII* ВОЗДЕЙСТВОВАТЬ НА БЕЛКИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ЧЕЛОВЕКА**А.А. Осмоловский^{1,*}, А.В. Кураков², В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров³**¹ Кафедра микробиологии и ² кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12;³ Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12;

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучена способность внеклеточных протеиназ *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 проявлять активность по отношению к белкам системы гемостаза человека. Показано, что протеиназы *A. fumigatus* D1 способны гидролизовать широкий набор специфичных хромогенных пептидных субстратов протеиназ системы гемостаза человека, а протеиназы, образуемые *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1, проявляют более узкую специфичность, в основном — по отношению к субстратам тромбина и плазмина. Было впервые показано, что протеиназы *A. flavipes* A17 способны активировать протеин С и фактор Х. Внеклеточные протеиназы *A. sydowii* 1 проявляли большую фибринолитическую активность, чем протеиназы *A. flavipes* A17 и *A. fumigatus* D1.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, аспергиллы, белки системы гемостаза, фибринолитические ферменты, протеиназы — активаторы белков системы гемостаза, амидолитическая активность.

Протеолитические ферменты, встречающиеся во всех без исключения живых организмах, как служат для расщепления белковых субстратов, так и выполняют регуляторную функцию. Например, ключевые звенья системы гемостаза человека — свертывание крови и фибринолиз, представляют собой многокомпонентные протеолитические процессы, в которых, как известно, продукт предыдущей реакции служит ферментом для следующей [1]. Участвующие в этих реакциях белки представляют собой протеиназы, для которых характерны высокая скорость и специфичность проводимых реакций. Их использование в случае нарушений существующего равновесия между реакциями свертывания и разжижения крови позволяет проводить терапию тромбозов и тромбоэмболических заболеваний. Активность, подобная активности протеиназ системы гемостаза, была найдена у протеиназ, содержащихся в яде змей и в культуральной жидкости микроорганизмов. Полученные на их основе препараты используются в составе диагностических наборов и терапевтических средств для выявления и лечения подобного рода осложнений [2–4].

Внеклеточные протеолитические ферменты микромицетов обладают способностью воздействовать на белки системы гемостаза в качестве активаторов (запуская прокоагулянтные и антикоагулянтные процессы) или прямых фибринолитиков (расщепляя образованные тромбы) [4–6]. Наиболее активными продуцентами таких протеиназ считаются микромицеты рода *Aspergillus* [6]. Для некоторых аспергиллов было показано, что образуемые ими протеи-

назы проявляют специфичность по отношению к некоторым белкам системы гемостаза, таким как протеин С (*A. ochraceus* L-1), фактор Х (*A. ochraceus* L-1), прекалликреин (*A. terreus* 2), фибрин (*A. ochraceus* L-1, *A. oryzae*, *A. versicolor* 1, *A. ustus* 1, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735, *A. flavus* AUMC 9736, *A. japonicum* KSS05, *A. niger*), фибриноген (*A. ochraceus* L-1) [6–10]. Таким образом, микромицеты образуют протеиназы, способные либо осуществлять протеолиз белков системы гемостаза, либо, наряду с гидролитической активностью, проявлять способность активировать проферменты этой системы, переводя их в активную форму (“активаторная активность”). В связи с этим актуальным представляется выявление спектра протеолитического действия по отношению к белкам системы гемостаза внеклеточных протеиназ микромицетов — их потенциальных продуцентов.

Специфическая активность протеиназ аспергиллов по отношению к белкам системы гемостаза человека позволяет считать их перспективными заменителями компонентов в соответствующих диагностических и терапевтических препаратах.

Целью работы было изучение воздействия протеиназ *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 на белки системы гемостаза человека.

Материалы и методы

Объекты исследования и условия культивирования. Использовали штаммы *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1 из коллекции кафедры микологии и альгологии

МГУ и *A. fumigatus* D1 из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Микромицеты культивировали в глубинных условиях на орбитальной качалке (200 об/мин) в колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [11], после чего часть полученного посевного материала переносили в среду следующего состава (в %): глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO₃ — 0,2, KН₂PO₄ — 0,05, MgSO₄ — 0,05 с последующим культивированием в течение 5 сут. Засев осуществляли смывом спор микромицетов, выращенных в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут.

Определение протеолитической активности. Активность внеклеточных протеиназ микромицетов определяли в фильтрате культуральной жидкости. Фильтрацию проводили под вакуумом через фильтровальную бумагу марки “ФС” (Россия). Определение активности протеиназ осуществляли с помощью хромогенных пептидных субстратов без добавления плазмы крови (прямая амидолитическая активность) и с ее добавлением (активаторная активность), а также с бычьим фибрином (фибринолитическая активность) и казеином (общая протеолитическая активность).

Для определения гидролитической активности внеклеточных протеиназ к 200 мкл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 0,05%-ного раствора (в 0,05 М Трис-НСl-буфере, pH 8,2) следующих хромогенных субстратов: H-D-Val-Leu-Lys-pNA — для определения плазмина, Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA — для определения активированного фактора X плазмы крови человека (фактор Ха), Glp-Pro-Arg-pNA — для определения активированного протеина C, Glp-Gly-Arg-pNA — для определения урокиназы, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA и Tos-Gly-Pro-Arg-pNA — для определения тромбина [12]. Реакцию проводили при 37°C в соответствии с описанной ранее методикой [6].

Активаторную активность определяли аналогичным способом, прединкубируя культуральную жидкость с 50 мкл человеческой плазмы крови, разведенной в 2 раза 0,05М Трис-НСl-буфером, pH 8,2 [7].

Реакции останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. За единицу активности (Е) принимали количество мкМ п-нитроанилина, отщепившегося от субстрата за 1 мин.

Фибринолитическую и общую протеолитическую активности определяли с помощью модифицированного метода Ансона — Хагихары, инкубируя при 37°C 200 мкл культуральной жидкости и 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина или раствора казеина, приготовленных на 0,1 М Трис-НСl-буфере, pH 8,2, как описано ранее [10, 13] Активность выражали в мкМ тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости (Е_{тип}).

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 (“BioSan”, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония).

Результаты и их обсуждение

Способность *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 образовывать внеклеточные протеолитические ферменты, обладающие активностями некоторых протеиназ системы гемостаза человека, была изучена по расщеплению специфических для протеиназ гемостаза хромогенных пептидных субстратов в соответствии с разработанной методикой [6]. При определении спектра расщепляемых субстратов особое внимание обращали на те субстраты, которые не расщеплялись протеиназами исследованных микромицетов. В таких случаях культуральную жидкость микромицетов дополнительно инкубировали с плазмой крови человека и таким образом выявляли активаторное воздействие протеиназы на предполагаемый профермент плазмы крови.

Результаты определения активности внеклеточных протеиназ исследованных микромицетов с хромогенными пептидными субстратами протеиназ системы гемостаза приведены в табл. 1. Данные показывают, что все три штамма в разной степени обладают протеолитической активностью и способны расщеплять использованные субстраты. Так, *A. fumigatus* D1 был способен образовывать протеиназы, расщеплявшие все перечисленные субстраты, и по этому свойству он сходен с другими аспергиллами — *A. ustus* 1 и *A. versicolor* 1 [6].

Наибольшую активность протеиназы *A. fumigatus* D1 проявили с субстратами тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), плазмина (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) и активированного протеина C (Glp-Pro-Arg-pNA). Эти значения активности были в среднем в 13–15 раз больше, чем значения активности, определенные с другими субстратами — H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, pGlu-Gly-Arg-pNA и Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA. Интересно отметить, что по гидролизу протеиназами аспергиллов хромогенных субстратов выявляется специфичность протеиназ *A. fumigatus* D1 к хромогенным пептидным субстратам: из двух субстратов тромбина и двух субстратов фактора Ха они эффективно гидролизуют лишь один. По-видимому, на проявление субстратной специфичности протеиназ *A. fumigatus* D1, как и протеиназ других аспергиллов, существенное значение оказывают как последовательность аминокислотных остатков в субстрате, так и их количество: одни протеиназы активно гидролизуют более короткие пептиды, а другие — более длинные [6].

Микромицеты *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1 также образовывали протеиназы, способные расщеплять субстрат плазмина и один из субстратов тромбина — Tos-Gly-Pro-Arg-pNA. Однако их активность была ниже, чем активность протеиназ *A. fumigatus* D1

Таблица 1

Расщепление хромогенных пептидных субстратов белков системы гемостаза внеклеточными протеиназами аспергиллов

Хромогенный субстрат	Фермент, расщепляющий субстрат	Значение активности, Е/мл · 10 ⁻³		
		<i>A. flavipes</i> A17	<i>A. fumigatus</i> D-1	<i>A. sydowii</i> 1
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	Тромбин	6,6	49,9	8,4
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	Тромбин	0	2,0	0
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	Плазмин	27,9	29,8	16,3
pGlu-Gly-Arg-pNA	Урокиназа	0	6,0	4,6
Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA	Активированный фактор X	0	3,6	0
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	Активированный фактор X	0	30,9	0
pGlu-Pro-Arg-pNA	Активированный протеин C	0	35,9	2,2

(табл. 1). Внеклеточные протеиназы обоих микромицетов оказались неспособны расщеплять субстраты фактора Ха, что может отличать их субстратную специфичность от субстратной специфичности протеиназ *A. fumigatus* D1. Аналогичные свойства протеиназ были ранее показаны у *A. ustus* 1 и *A. versicolor* 1 [6]. Образующие *A. sydowii* 1 протеиназы также, но в меньшей степени, чем протеиназы *A. fumigatus* D1, расщепляли субстраты урокиназы и активированного протеина C (на 23,3% и на 93,8%, соответственно).

В табл. 2 представлены результаты определения с хромогенными пептидными субстратами активаторной активности протеиназ аспергиллов по отношению к проферментам системы гемостаза. Эти субстраты не расщеплялись протеиназами *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1. Как видно из таблицы, протеиназы, образующие *A. sydowii* 1, не были способны активировать проферменты системы гемостаза с образованием ферментов, расщепляющих использованные субстраты. Протеиназы *A. flavipes* A17 проявили активаторную активность по отношению к проферментам — фактору X и протеину C. Среди изученных к настоящему времени аспергиллов подобные свойства протеиназ были выявлены

у *A. ochraceus* L-1, известного как продуцента протеиназ — активаторов протеина C и фактора X [14, 15]. Проявление подобной активности делает *A. flavipes* A17 потенциальным продуцентом протеиназ подобного действия и перспективным для дальнейшего изучения. Значения активаторных активностей протеиназ данного микромицета оказались в среднем в 11 раз ниже, чем у протеиназ, образующих *A. ochraceus* L-1 [6].

Исходя из полученных данных, можно предположить, что протеиназы изученных микромицетов могут проявлять фибринолитическую активность. Для этого, а также для выявления специфичности образуемых протеиназ к фибрину, определяли протеолитическую активность в культуральной жидкости микромицетов по гидролизу фибрина и казеина. В результате было показано, что внеклеточные протеиназы *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 обладают фибринолитической (ФА) и общей протеолитической (ОПА) активностями. Соотношение этих активностей (ФА/ОПА) является важным показателем направленного воздействия протеиназ на фибрин [16]. Для *A. flavipes* A17 это соотношение составило 0,27, для *A. fumigatus* D1 — 0,10 и для *A. sydowii* 1 — 0,64 (рисунок). Для аспергиллов со-

Таблица 2

Активаторная по отношению к белкам системы гемостаза активность внеклеточных протеиназ *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1

Хромогенный субстрат	Фермент, расщепляющий субстрат	Значение активности, Е/мл · 10 ⁻³	
		<i>A. flavipes</i> A17	<i>A. sydowii</i> 1
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	Тромбин	0	0
pGlu-Gly-Arg-pNA	Урокиназа	0	н/о*
Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA	Активированный фактор X	0	0
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	Активированный фактор X	3,0	0
pGlu-Pro-Arg-pNA	Активированный протеин C	6,2	н/о

* н/о — активность не определяли.

отношение ФА/ОПА может быть различным: например, для *A. ochraceus* L-1 оно составило 0,18, а для *A. ustus* 1 — 6,92 [10].

Следует отметить, что найденные соотношения ФА/ОПА не коррелируют со значениями плазминоподобной активности (активности, связанной с расщеплением субстрата плазмина), выявленной для *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 ($27,9 \text{ Е/мл} \cdot 10^{-3}$, $29,8 \text{ Е/мл} \cdot 10^{-3}$ и $16,3 \text{ Е/мл} \cdot 10^{-3}$, соответственно; табл. 1). Протеиназы, образуемые *A. fumigatus* D1, к примеру, проявляли наибольшую плазминоподобную активность среди остальных микромицетов, а соотношение ФА/ОПА оказалось наименьшим. Полученные результаты указывают на необходимость дальнейшего изучения протеиназ *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 для выявления мишеней их действия среди белков системы гемостаза.

Таким образом, изучена активность внеклеточных протеиназ *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 и *A. sydowii* 1 по отношению к протеиназам системы гемостаза человека. Протеиназы *A. fumigatus* D1 способны гидролизовать широкий набор специфических хромогенных пептидных субстратов протеиназ системы гемостаза. Протеолитические ферменты, образуемые *A. flavipes* A17 и *A. sydowii* 1, проявляли более

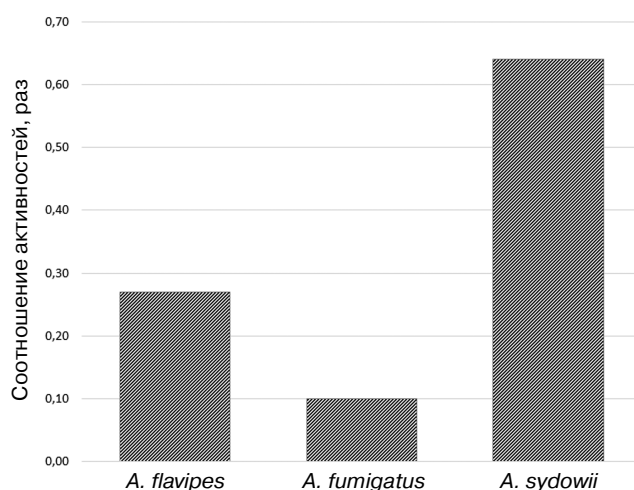


Рисунок. Отношение фибринолитической активности к общей протеолитической активности у аспергиллов

узкую специфичность, в основном к субстратам тромбина и плазмина. Для протеиназ *A. flavipes* A17 была впервые показана активаторная активность по отношению к протеину С и фактору X. Внеклеточные протеиназы *A. sydowii* 1 обладали более выраженной фибринолитической активностью (соотношение ФА/ОПА составило 0,64), чем протеиназы других изученных штаммов аспергиллов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Струкова С.М. Современные представления о механизме свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2002. № 2. С. 21–26.
2. Sajevec T., Leonardi A., Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms // Toxicon. 2011. Vol. 57. N 5. P. 627–645.
3. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // Biotechnol. Prog. 2014. Vol. 30. N 3. P. 656–672.
4. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
5. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // Biologia. 2015. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
6. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.
7. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes — producers of extracellular proteinases — protein C activators of blood plasma // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.
8. Aradhya P.K., Chavan M.D. Production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus niger* // World J. Pharm. Pharm. Sci. 2015. Vol. 3. N 9. P. 843–851.
9. Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Screening and biosynthesis of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* // J. Drug Deliv. Therap. 2015. Vol. 5. N 6. P. 60–62.
10. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
11. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // Microbiology. 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.
12. Proteolytic enzymes. A practical approach / Eds. R. Beynon and J.S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 p.
13. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нocardioформной бактерии *Nocardia minima* в процессе ее роста, развития и дифференциации // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
14. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.
15. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Properties of extracellular proteinase — an activator of Protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 95–101.
16. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.

Поступила в редакцию
20.11.2016
Принята в печать
16.12.2016

MICROBIOLOGY

**THE ABILITY OF EXTRACELLULAR PROTEINASES OF MICROMYCETES
ASPERGILLUS FLAVIPES, *ASPERGILLUS FUMIGATUS* AND *ASPERGILLUS SYDOWII* TO
AFFECT PROTEINS OF THE HUMAN HAEMOSTATIC SYSTEM**

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, A.V. Kurakov², V.G. Kreyer¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov³

¹ Department of Microbiology and ² Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University; Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³ International Biotechnology Center, Lomonosov Moscow State University; Leninskiye Gory 1–12,
Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

The effect of extracellular proteases of *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1 and *A. sydowii* 1 to proteins of the human hemostasis system was studied. It was shown that *A. fumigatus* D1 proteinases are able to hydrolyze wide range of chromogenic peptide substrates of specific human proteinases of the haemostatic system. Proteinases formed by *A. flavipes* A17 and *A. sydowii* 1 have a narrow specificity, mainly to thrombin and plasmin substrates. It was first shown that proteinase of *A. flavipes* A17 is capable to activate protein C and Factor X. Extracellular proteinase produced by *A. sydowii* 1 has greater fibrinolytic activity as compared with proteinases produced by *A. flavipes* A17 and *A. fumigatus* D1.

Keywords: *proteinases of micromycetes, Aspergillus, proteins of the haemostatic system, fibrinolytic enzymes, proteinases — protein activators of the haemostatic system proteins, amidolytic activity.*

Сведения об авторах:

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

Кураков Александр Васильевич — докт. биол. наук, зав. кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kurakov57@mail.ru

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru