

на правах рукописи

Осмоловский Александр Андреевич

**АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ ПРОТЕИНАЗА (АКТИВАТОР ПРОТЕИНА С)
МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS OCHRACEUS*:
ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА**

03.02.03 – Микробиология
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Егоров Николай Сергеевич

кандидат биологических наук
Крейер Валериана Георгиевна

Официальные оппоненты: **Румш Лев Давыдович**
доктор химических наук, профессор
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
руководитель лаборатории
химии протеолитических ферментов

Загустина Наталья Алексеевна
кандидат биологических наук
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,
лаборатория инженерной энзимологии,
старший научный сотрудник

Ведущая организация:
Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Защита состоится **24 сентября** 2013 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Тел.: 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан _____ 2013 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема тромбоэмболических заболеваний занимает заметное место в современной медицине. Причиной этих заболеваний служат нарушения регуляции антисвертывающей системы крови. Одним из основных компонентов естественной антикоагулянтной системы человека является профермент протеин С. В результате ограниченного протеолиза под воздействием комплекса тромбин-тромбомодулин этот белок превращается в свою активную форму – активированный протеин С, который играет важную роль в контроле тромбообразования, блокировании воспаления и ингибировании апоптоза, изменяет профиль экспрессии генов в эндотелиальных клетках (Mosnier et al., 2007; Versteeg et al., 2013). Недостаточность содержания протеина С в крови или снижение его активности приводит к риску возникновения тромбоэмболических осложнений. Поэтому актуальными представляются средства, активирующие протеин С, а также позволяющие качественно и своевременно диагностировать содержание этого белка в крови человека. К настоящему времени известны активаторы протеина С, содержащиеся в яде некоторых видов змей (Gempeler-Messina and Müller, 2006). Протеолитические ферменты – активаторы протеина С, выделенные из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, находят широкое применение в составе диагностикумов для определения протеина С в плазме крови человека (Stoker et al., 1987; Gempeler-Messina and Müller, 2006).

В последнее время была показана способность некоторых микромицетов секретировать внеклеточные протеиназы с антикоагулянтной активностью (Ландау и др., 1998). Одним из наиболее активных продуцентов подобных ферментов оказалась культура *Aspergillus ochraceus*. Протеиназы *A. ochraceus*, добавленные к плазме крови, удлиняли время свертывания крови – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) по типу активаторов протеина С аналогично тромбин-тромбомодулиновому комплексу и активаторам из яда щитомордника (Ландау и др., 1998; Батомункуева и Егоров, 2001). Было высказано предположение, что данная активность может быть связана с активацией протеина С.

В связи с этим поиск альтернативных продуцентов подобных протеолитических ферментов среди микроорганизмов, в частности, мицелиальных грибов, представляется весьма актуальным, поскольку такие протеиназы, проявляющие антикоагулянтные свойства по типу активаторов протеина С, могут оказаться более доступными и дешевыми. Значительный интерес представляет и изучение внеклеточных протеиназ микромицетов как возможных активаторов протеина С плазмы крови человека.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение способности микромицетов вида *Aspergillus ochraceus* продуцировать в процессе развития внеклеточные протеиназы с активаторной активностью к протеину С плазмы крови человека.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Доказать способность микромицетов *A. ochraceus* продуцировать протеиназы – активаторы протеина С плазмы крови человека;
2. Оптимизировать условия образования протеиназ – активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* при глубинном и твердофазном культивировании;
3. Выделить внеклеточную протеиназу – активатор протеина С и изучить ее физико-химические, кинетические и биохимические свойства;
4. Сравнить активаторную к протеину С активность протеиназы, образуемой *A. ochraceus*, и протеиназ, получаемых из яда южно-американского щитомордника.

Научная новизна работы. Впервые установлена способность внеклеточных протеиназ, образуемых мицелиальными грибами, активировать протеин С плазмы крови человека. Изучено образование протеиназ, обладающих активаторной к протеину С активностью, в динамике роста *A. ochraceus*, а также влияние условий культивирования на секрецию данных ферментов продуцентом.

Впервые получены данные о физико-химических, кинетических и биохимических свойствах протеиназы – активатора протеина С плазмы крови, образуемой *A. ochraceus*.

Практическая значимость работы. Показана перспективность использования микромицетов *A. ochraceus* в качестве альтернативных яду щитомордника источников протеиназ – активаторов протеина С. Подобраны условия образования протеиназы и разработаны способы ее получения при глубинном и твердофазном культивировании продуцента.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием "Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах" (Москва, 2009 г.), конференции "Экология. Природные ресурсы. Рациональное природопользование. Охрана окружающей среды" (Москва – Истра, 2009 г.), III научно-практической конференции «Перспективы развития инноваций в биологии» (Москва, 2009 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Тромбозы, кровоточивость, ДВС-синдром: современные подходы к диагностике и лечению» (Москва, 2009 г.), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009 г.), I и II Междисциплинарных микологических форумах (Москва, 2009 и 2010 г.), конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2010 г.), Всероссийском симпозиуме с международным участием

«Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (Москва, 2011 г.), XVII, XVIII, XIX и XX Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010 – 2013 гг.), VI и VIII Молодежных школах-конференциях с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2010 и 2012 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 работ, 4 из которых – статьи и короткие сообщения – в журналах, рекомендованных ВАК, получено 5 патентов РФ на изобретения. Кроме того, 1 статья находится в печати и подана 1 заявка на патент.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 144 литературных источника, из которых 104 англоязычных. Работа изложена на 141 странице, содержит 38 рисунков и 15 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о действии протеиназ системы гемостаза, физиологических функциях активированного протеина С в организме человека и активаторах протеина С из яда щитомордников, представлены сведения о воздействии внеклеточных протеиназ микромицетов на систему гемостаза. Особое внимание уделено образованию ферментов мицелиальными грибами в условиях твердофазного культивирования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследований служили 10 штаммов микроскопических грибов *Aspergillus ochraceus*, выделенных проф. А.В. Кураковым из образцов верхних горизонтов пустынных песчаных почв, сероземов, солончаков, карбонатных черноземов, дерново-аллювиальных почв, красно-коричневых почв и растительных субстратов, отобранных в Туркмении, Воронежской обл., Краснодарском крае, Крыму, Греции, Мексике и Московской обл.

Глубинное культивирование мицелиальных грибов проводили в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. В качестве посевного материала использовали 7-суточные культуры микромицетов, выращенные на скошенном сусло-агаре. Сначала микромицеты культивировали на среде, содержащей (в %) сусло – 6.7, глюкозу – 2.0 и пептон – 0.1, рН 5.5, после чего, по истечении 2

суток культивирования 3% биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (среда №1, исходная, в %): глюкоза – 3.5, крахмал – 1.0, соевая мука – 0.2, гидролизат рыбной муки – 0.5, пептон – 0.5, NaCl – 0.2, KH_2PO_4 – 0.05, MgSO_4 – 0.05.

Изучение влияния источников азота на образование протеолитических ферментов *A. ochraceus* проводили на средах, содержащих в качестве единственных источников азота (в %) – NaNO_3 – 0.5% (среда №2), пептон – 0.5 (среда №3) и гидролизат рыбной муки – 0.5 (среда №4), а также на средах, представлявших собой незначительные модификации исходной среды: в среде №5 из состава исходной среды №1 была исключена соевая мука, а среда №6 содержала все компоненты среды №1 и NaNO_3 (0.5%). Исходное значение pH всех сред устанавливали равным 5.5. Изучение влияния pH и температуры культивирования на образование протеиназ проводили на оптимальной среде в диапазоне pH от 3 до 9 и при температурах 24, 28, 32 и 34°С.

Твердофазное культивирование *A. ochraceus* проводили в стационарных условиях в конических колбах объемом 250 мл с пшеничными отрубями или одним из инертных носителей: пенополиуретаном (в виде кубиков размером 5.0×5.0×5.0 мм), перлитом, силикагелем и вермикулитом, с ферментационной средой, состав которой был аналогичен оптимальному составу для глубинного культивирования *A. ochraceus*. Засев осуществляли споровой суспензией объемом 1 мл. Для элюции протеиназ использовали 0,05М Трис-НСl буфер, pH 8.2.

Выделение ДНК из мицелия проводили по стандартной методике (Rodrigues et al., 2007). Для проведения полимеразной цепной реакции использовали рекомендуемые для микромицетов праймеры ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') и ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3'), (Henry et al., 2000). Амплификацию для каждого образца ДНК проводили согласно принятому протоколу (Henry et al., 2000). Очистку полученных ПЦР-продуктов осуществляли на микроколонках Wizard[®] DNA Clean-Up System. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems в МЦКП «ГЕНОМ» ИМБ РАН. Анализ полученных последовательностей осуществляли с помощью программы BioEdit, поиск гомологичных последовательностей в базе данных GenBank проводили в программе BLAST.

Общую протеолитическую активность определяли методом Ансона (Anson, 1938; Nagihara et al., 1958). За единицу активности принимали количество фермента, которое за 1 мин в условиях определения высвобождает 1 мкг тирозина.

Активаторную к протеину С активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата pGlu-Pro-Arg-pNA (S-2366), (Sakata et al., 1990) с помощью метода,

модифицированного В.Г. Крейер, заключающегося в прединкубации пробы с разведенной в 2 раза человеческой плазмой, используемой в качестве источника протеина С, и последующей инкубацией с раствором хромогенного субстрата. За единицу активности (Е) принимали количество мкМ отщепившегося *n*-нитроанилина в 1 мл пробы за 1 мин. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм.

В случае твердофазного культивирования активность протеиназ рассчитывали по формуле $A_{\text{ГТФК}} = (A_{405} \times (V_c + V_6) \times K) / V_c$, где A_{405} – поглощение при 405 нм, V_c – объем среды, V_6 – объем добавленного для элюции буфера и K – коэффициент, рассчитанный по калибровочной кривой по *n*-нитроанилину.

Тромбиноподобную и плазминоподобную активность определяли с субстратами Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и DVal-Leu-Lys-pNA (S-2251), соответственно.

Фибринолитическую и активаторную по отношению к плазминогену активности определяли на фибриновых пластинках по методу Аструпа – Мюллерца – Лассена (Astrup and Mullertz, 1952; Lassen, 1952). Активность выражали в усл. ед. За одну единицу принимали количество фермента, вызывающего зону лизиса фибрина равную 10 мм².

Коллагенолитическую активность определяли с использованием суспензии азоколл (2 мг/мл) в 0.05М Трис-НСl-буфере, рН 8.2 (Chavira et al., 1984).

Для определения субстратной специфичности исследуемой протеиназы использовали хромогенные пептидные субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bredford, 1976) и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм (Gertler and Trop, 1971).

Препараты протеиназ культуральной жидкости *A. ochraceus*, выращенного глубинным или твердофазным способами, получали путем осаждения внеклеточных белков сульфатом аммония при 80%-ном насыщении на холоду с последующими отделением высоленных белков центрифугированием и диализом против 0.01М Трис-НСl-буфера, рН 8.2 с 0.002М ацетата кальция при 4 °С. Отдиализованный раствор белков центрифугировали, замораживали жидким азотом и лиофильно высушивали. Полученные препараты хранили при -20 °С.

Изоэлектрофокусирование препаратов внеклеточных белков *A. ochraceus* проводили при 4 °С в градиенте рН амфолинов 3.5-10 или 5-7 и градиенте плотности сахарозы 0-40% в колонке объемом 110 мл фирмы «LKB» (Швеция) по методу Вестерберга (Vesterberg, 1972). Нативный электрофорез белков в ПААГ проводили по методу Дэвиса (Davis, 1964). Денатурирующий электрофорез белков проводили по методу Лэммли (Laemmly, 1970).

Способность к активации протеина С протеиназой *A. ochraceus* определяли с чистым протеином С человека фирмы «Sigma» (США) и активной гомогенной белковой фракцией, полученной после изоэлектрофокусирования полученного препарата протеиназ.

Преинкубацию протеиназы *A. ochraceus* с протеином С проводили в 0.05М Трис-НСl-буфере, рН 8.2, не содержащим и содержащим ацетат кальция в концентрации в инкубационной смеси 1×10^{-3} М, 2.5×10^{-3} М, 5×10^{-3} М и 1×10^{-2} М.

Для выявления содержания углеводного компонента выделенной протеиназы проводили качественную реакцию на определение гликопротеинов с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Thronton et al., 1996).

Кинетические параметры выделенной протеиназы – максимальную скорость реакции (V_{max}), и константу Михаэлиса (K_m) определяли с хромогенным пептидным субстратом Tos-Pro-Arg-pNA.

Ингибиторный анализ проводили с использованием ингибиторов: ЭДТА, *o*-фенантролина, *n*-ХМБ, PMSF, TPCK, TLCK и соевого ингибитора трипсина. Действие ингибиторов исследовали в молярном соотношении фермент:ингибитор 1:10 и 1:100 (Крейер и др., 1983).

рН-оптимум активности и рН-стабильность протеиназы изучали в 0.4М универсальном буфере в диапазоне рН 3.0 – 11.0. Температурный оптимум действия протеиназы и ее термостабильность определяли в 0.05М Трис-НСl-буфере, рН 8.2 при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C.

Для проведения МАЛДИ-масс-спектрометрического анализа протеиназу, полученную после денатурирующего электрофореза, обрабатывали трипсином (Lewis et al., 2000; Webster and Oxley, 2012), и полученную смесь пептидов регистрировали на МАЛДИ-масс-спектрометре BRUKER Ultraflex TOF/TOF в ЦКП «Протеом человека» ИБМХ им. В.Н. Ореховича РАМН. Идентификацию протеиназы проводили с использованием поисковой программы Mascot.

Для сравнения удельной активности протеиназ – активаторов протеина С *A. ochraceus* и *Agkistrodon contortrix contortrix* использовали активную фракцию, полученную после изоэлектрофокусирования препарата внеклеточных белков *A. ochraceus* L-1, и активатор протеина С из яда щитомордника из наборов реагентов «Реахром – Протеин С» («Ренам») и «Berichrom Protein C» («Dade Behring»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнение молекулярно-генетических свойств штаммов *Aspergillus ochraceus*.

Для подтверждения видовой принадлежности использованных в работе 10 штаммов микромицета *A. ochraceus* – изолятов различных типов почв географически отдаленных регионов и определения их генетической однородности или вариабельности проводили

исследования участка рДНК по нуклеотидной последовательности локусов ITS1-5.8S-ITS2. Анализ изучаемого участка всех штаммов *A. ochraceus* показал их полную идентичность. Сравнительный анализ полученных последовательностей участков ITS изученных штаммов (589 п.н.) с последовательностями ITS-участков этого вида, представленными в GenBank (JN246072.1, EU273559.1, AY373856.1), выявил их 100% сходство, что подтверждает проведенную нами идентификацию изучаемых штаммов как *A. ochraceus* и данные литературы о гомогенности этого вида. Полученные секвенированные последовательности изученных штаммов были депонированы в GenBank.

2. Выявление способности внеклеточных протеиназ штаммов микромицета *A. ochraceus* к проявлению активаторной к протеину С активности. Определение активаторной к протеину С активности протеиназ *A. ochraceus* проводили с хромогенным пептидным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA. Результаты проведения реакции (проба №1) на примере микромицета *A. ochraceus* L-1 в сравнении с контролями (пробы № 2 и 3, соответственно) приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Определение активаторной к протеину С активности культуральной жидкости
A. ochraceus L-1 с хромогенным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA

№ пробы	Состав инкубационной смеси	Активаторная к протеину С активность, Е/мл×10 ⁻³
1	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> L-1 + плазма (протеин С) + субстрат	77.0
2	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> L-1 + субстрат	0.0
3	Плазма + субстрат	0.8

Из таблицы видно, что ни культуральная жидкость, ни плазма по отдельности не расщепляли хромогенный субстрат, и только после предварительной инкубации культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 и плазмы (протеин С), действительно, происходит активация протеина С, и образующийся активированный протеин С расщепляет хромогенный субстрат по аргинину в соответствии со следующей схемой:

Протеиназа *A. ochraceus* + плазма (протеин С) → активированный протеин С

Активированный протеин С + pGlu-Pro-Arg-pNA → pGlu-Pro-Arg-OH + pNA

Способность к образованию внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С установлена у всех 10 изученных изолятов *A. ochraceus* вне зависимости от экотопов и

регионов, из которых они были выделены. Причем активаторная к протеину С активность обнаруживалась в культуральной жидкости *A. ochraceus* уже на 1 сутки культивирования (табл. 2). Проявление такой активности уже на ранних сроках культивирования может говорить о важной роли данного фермента в жизнедеятельности самого микромицета.

Таблица 2.

Активаторная к протеину С активность штаммов *A. ochraceus*, выделенных из разных экотопов.

Штамм <i>A. ochraceus</i> №	Источник и место выделения	Код доступа GenBank	Активаторная к протеину С активность, Е/мл×10 ^{-3*}
121	Солончак (Крым, Украина)	KC859005	59.0
154	Растительные остатки подстилки (Греция)	KC859006	66.3
247	Чернозем на карбонатных породах (Воронежская обл., Россия)	KC859007	65.0
513N	Пустынная почва (Туркмения)	KC859008	63.5
L-1	Погребенная почва (раскопки г. Фанагории, Краснодарский край, Россия)	KC859009	63.9
L-2	Растительные остатки подстилки (Мексика)	KC859010	34.0
МА-1	Серая лесная почва (Московская обл., Россия)	KC859011	58.1
МА-2	Растительные остатки (Московская обл., Россия)	KC859012	58.8
X-1	Растительные остатки (Греция)	KC859013	59.2
X-2	Дерново-аллювиальная почва (Мексика)	KC859014	55.8

*на 1 сут культивирования микромицетов

3. Динамика накопления протеолитических ферментов с активаторной к протеину С, тромбиноподобной и плазминоподобной активностью микромицетами *A. ochraceus*. На рис. 1 представлены данные по накоплению в культуральной жидкости внеклеточных протеиназ для *A. ochraceus* L-1 в процессе роста микромицета. Сходную динамику показателей роста и активностей протеиназ, с небольшими отличиями, наблюдали у всех остальных изученных штаммов. Максимальные значения активаторной к протеину С активности обнаруживали на 2 сутки культивирования в логарифмической фазе роста, после чего активность снижалась с небольшим пиком активности на 5 сутки в стационарной фазе. Максимумы образования протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностями

приходились на 3, 4 сутки культивирования (стационарная фаза роста) и имели близкие значения.

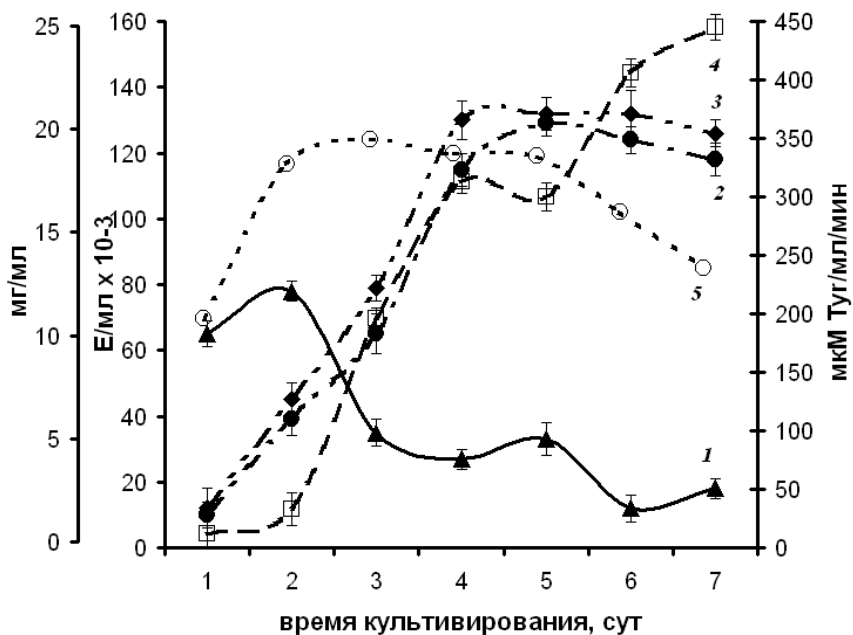


Рис. 1. Динамика накопления протеолитических ферментов микромицетом *A. ochraceus* L-1. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – плазминоподобная активность, 4 – общая протеолитическая активность, 5 – биомасса.

Динамика общей протеолитической активности культуральной жидкости была сходной с тромбино- и плазминоподобными активностями. Максимальные значения этой активности не совпадали с максимальными значениями активаторной к РС активности.

В табл. 3 приведены значения протеолитической активности разных штаммов *A. ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности. Видно, что максимальные значения активаторной к РС активности микромицетов близки и их варьирование не превышало 15%. Активности с субстратами плазмينا и тромбина, а также общая протеолитическая активность в максимальных значениях активаторной активности различаются. Варьирование по тромбиноподобной, плазминоподобной и общей протеолитической активности составило 67, 66 и 77% соответственно.

Значительный интерес представляют продуценты протеиназ-активаторов протеина С, проявляющие более низкие величины сопутствующей протеолитической активности. По этому критерию были отобраны штаммы *A. ochraceus* 247, *A. ochraceus* 513N, *A. ochraceus* L-1 и *A. ochraceus* X-1. Дальнейшие исследования проводились с культурой *A. ochraceus* L-1.

Полученные результаты показывают, что способность образовывать протеиназы – активаторы РС плазмы крови изученных штаммов *A. ochraceus* – изолятов различных экотопов географически отдаленных регионов может являться характерным признаком аспергиллов этого вида.

Таблица 3.

Плазминоподобная, тромбиноподобная и общая протеолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов *Aspergillus ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности.

Штамм <i>A. ochraceus</i> №	Активность активаторов протеина С, Е/мл×10 ⁻³	Плазминоподобная активность, Е/мл×10 ⁻³	Тромбиноподобная активность, Е/мл×10 ⁻³	Общая протеолитическая активность, мкМ Тир/мл/мин
121	71.9 ± 3.6	125.5 ± 6.3	95.2 ± 4.8	149.8 ± 7.6
154	69.0 ± 3.4	81.4 ± 3.1	62.3 ± 3.1	110.5 ± 5.5
247	77.9 ± 2.3	99.8 ± 4.9	84.2 ± 4.2	67.2 ± 3.1
513N	76.1 ± 2.0	81.4 ± 4.1	82.7 ± 4.1	40.2 ± 4.3
L-1	77.5 ± 2.2	46.3 ± 2.3	47.5 ± 1.4	54.3 ± 1.2
L-2	67.4 ± 3.3	65.3 ± 3.2	84.0 ± 4.2	167.8 ± 6.3
МА-1	71.0 ± 3.5	40.4 ± 4.02	32.3 ± 5.8	37.7 ± 1.8
МА-2	64.4 ± 2.9	44.9 ± 2.3	39.3 ± 2.0	95.1 ± 4.7
X-1	72.5 ± 3.6	80.6 ± 4.1	72.1 ± 3.6	58.8 ± 3.9
X-2	69.6 ± 3.4	74.5 ± 4.2	63.5 ± 3.1	87.9 ± 4.5

4. Влияние условий культивирования на образование протеиназ – активаторов протеина С культурой *A. ochraceus* L-1. Результаты изучения влияния источников азота на образование протеиназ штаммом *A. ochraceus* L-1 при глубинном культивировании представлены на рис. 2. Активаторная к протеину С активность выявлена на всех средах, содержащих белковые субстраты. Общую протеолитическую активность штамм проявлял как на средах с белковыми, так неорганическим источником азота, причем максимальных значений она достигала на среде с нитратом натрия (среда № 2). Активность протеиназ – активаторов протеина С у штамма на этой среде, напротив, была следовой. Добавление к среде с нитратом натрия белковых субстратов индуцировало образование протеиназ – активаторов протеина С (среда №6). Максимальное значение данной активности было отмечено на среде №5 с пептоном и гидролизатом рыбной муки и составило 86.6 Е/мл × 10⁻³, что на 5.5 и 51.5% больше, чем на средах, содержащих эти компоненты по отдельности (среды №№ 3 и 4, соответственно) и на 18% больше, чем на исходной среде №1 с тремя источниками белкового азота. Наибольших значений тромбиноподобная активность достигала на среде с минеральным источником азота (среда № 2), тогда как активаторная к протеину С активность была минимальной.

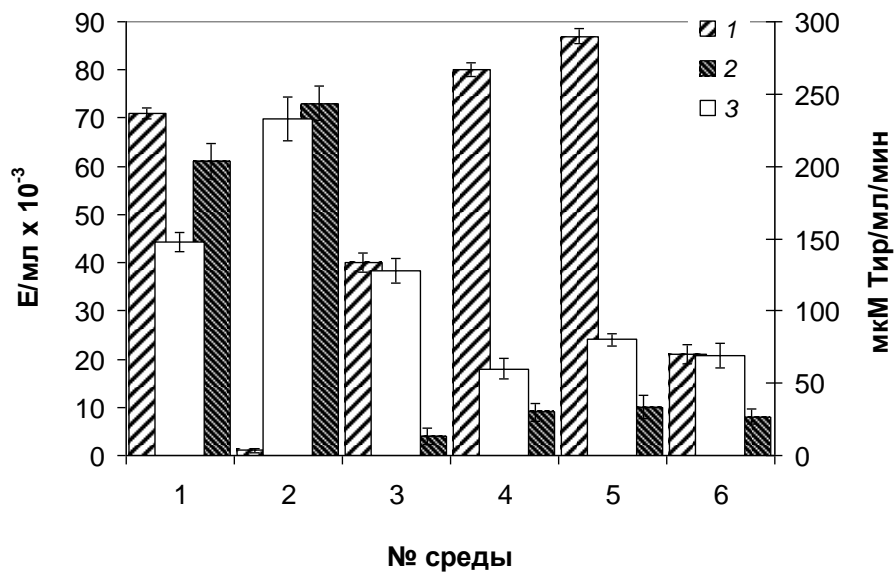


Рис. 2. Влияние источников азота на образование внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* L-1. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность.

Среда №1 – среда с соевой мукой, гидролизатом рыбной муки и пептоном; среда №2 – с нитратом натрия; среда №3 – с пептоном; среда №4 – с гидролизатом рыбной муки; среда №5 – с гидролизатом рыбной муки и пептоном; среда №6 – среда с соевой мукой, гидролизатом рыбной муки, пептоном и нитратом натрия.

Влияние начального значения рН среды и температуры на образование протеиназ – активаторов протеина С *A. ochraceus* L-1 было изучено на оптимальной для секреции этих ферментов среде (среда №5). Наибольшая активаторная к протеину С активность у изучаемого микромицета наблюдалась при рН 6.0-7.0. При подкислении среды до рН 4.0 активаторная к РС активность снижалась в 3.5-4 раза, а при подщелачивании до рН 9.0 – в 1.5-2 раза. Влияние температуры в интервале 24-32°C на секрецию изучаемого фермента было незначительным, а при температуре выше 32°C происходило снижение образования протеиназ – активаторов протеина С.

Таким образом, оптимальными условиями для образования активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* L-1 при глубинном культивировании (200 об/мин) была среда №5 с пептоном и рыбным гидролизатом в качестве источников азота, с исходным значением рН среды 6.5 и температурой 28°C.

5. Образование протеиназ – активаторов протеина С культурой *A. ochraceus* L-1 в условиях твердофазного культивирования. Условия, обеспечивающие максимальную секрецию микромицетом *A. ochraceus* L-1 протеиназ с активаторной к протеину С активностью при глубинном культивировании, были использованы при твердофазном культивировании продуцента.

Динамика накопления протеиназ с активаторной к протеину С активностью в условиях ТФК показала, что в зависимости от используемого субстрата или носителя продолжительность культивирования продуцента составляла от 4 суток (в опыте с силикагелем) до 7 суток (в случае вермикулита).

Расчет активаторной к РС активности на 1 мл используемой ферментационной среды показал чрезвычайную перспективность использования твердофазного культивирования для получения протеиназ – активаторов протеина С. Максимальные значения активаторной активности протеиназ у изучаемого штамма наблюдали на вермикулите ($300.0 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ на 7 сутки культивирования) и на силикагеле ($200.0 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ на 4 сутки). При росте *A. ochraceus* L-1 с использованием пенополиуретана активность фермента была несколько ниже ($131.8 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$), а минимальная активность активаторов протеина С была при ТФК *A. ochraceus* L-1 на перлите и пшеничных отрубях – $90.6 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ на 7 сутки и $116.3 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ на 5 сутки, соответственно (Табл. 4). Однако, даже в этих случаях образование протеиназ – активаторов протеина С штаммом *A. ochraceus* было выше, чем при глубинном культивировании.

Таблица 4.

Образование протеиназ – активаторов протеина С *A. ochraceus* L-1 при твердофазном культивировании.

Субстрат/ носитель	Количество питательной среды, мл/г субстрата (носителя)	Продолжительность культивирования для проявления максимальной активности, сут	Активаторная к протеину С активность, $\text{Е/мл} \times 10^{-3}$
Пшеничные отруби	3	5	116.3
Пенополиуретан	8	5	131.8
Перлит	3	7	90.6
Силикагель	1	4	140.0
	1.5	4	200.0
	2	4	187.0
Вермикулит	4	7	235.0
	4.5	7	300.0
	6	7	290.0

При культивировании продуцента на силикагеле и вермикулите было изучено влияние объема питательной среды на образование протеиназ – активаторов протеина С. Как видно из табл. 4, при незначительном уменьшении объема добавленной среды значения изучаемой активности снижались на 3.3-6.5%, а при увеличении – более чем на 20%.

Активаторная к протеину С активность при ТФК *A. ochraceus* L-1 на силикагеле была в 2.3, а на вермикулите в 3.5 раза выше по сравнению с глубинным культивированием продуцента.

Продуктивность мицелия *A. ochraceus* L-1, рассчитанная на мг биомассы, также была значительно выше в условиях ТФК. Так, при глубинном культивировании микромицета продуктивность составила $4.7 \text{ Е/мг} \times 10^{-3}$, а при ТФК на инертных носителях оказалась в 1.3 - 4.8 раза выше, в зависимости от носителя.

6. Получение и разделение препаратов внеклеточных белков культуры *A. ochraceus* L-1, выращенной в условиях глубинного и твердофазного культивирования.

Препараты внеклеточных белков культуральной жидкости микромицета *Aspergillus ochraceus* L-1 получали после 2-х суток культивирования продуцента в глубинных условиях и после 7-ми суток твердофазного культивирования на вермикулите. В препарате протеиназ *A. ochraceus* L-1, полученном при ТФК на вермикулите, было выявлено в два раза большее содержание белка, а удельная общая протеолитическая и активаторная к протеину С активность оказались в 1.1 и 1.6 раза больше, соответственно, по сравнению с препаратом протеиназ, полученном при глубинном культивировании.

Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков, полученного при глубинном культивировании *A. ochraceus* L-1, выявило два пика с протеолитической активностью. Фракции первого пика имели рI 4.7-4.9 и обладали общей протеолитической активностью. Белки второго пика с рI 6.0-6.2 наряду с общей протеолитической активностью проявляли активаторную к протеину С и тромбиноподобную активность (рис. 3). В препарате внеклеточных протеиназ при ТФК было также два активных пика с рI 5.3-5.5 и 6.1-6.3. Протеиназы обоих пиков проявляли как общую протеолитическую, так и тромбиноподобную активности, а активаторную к протеину С активность наблюдали только во втором пике (рис. 4).

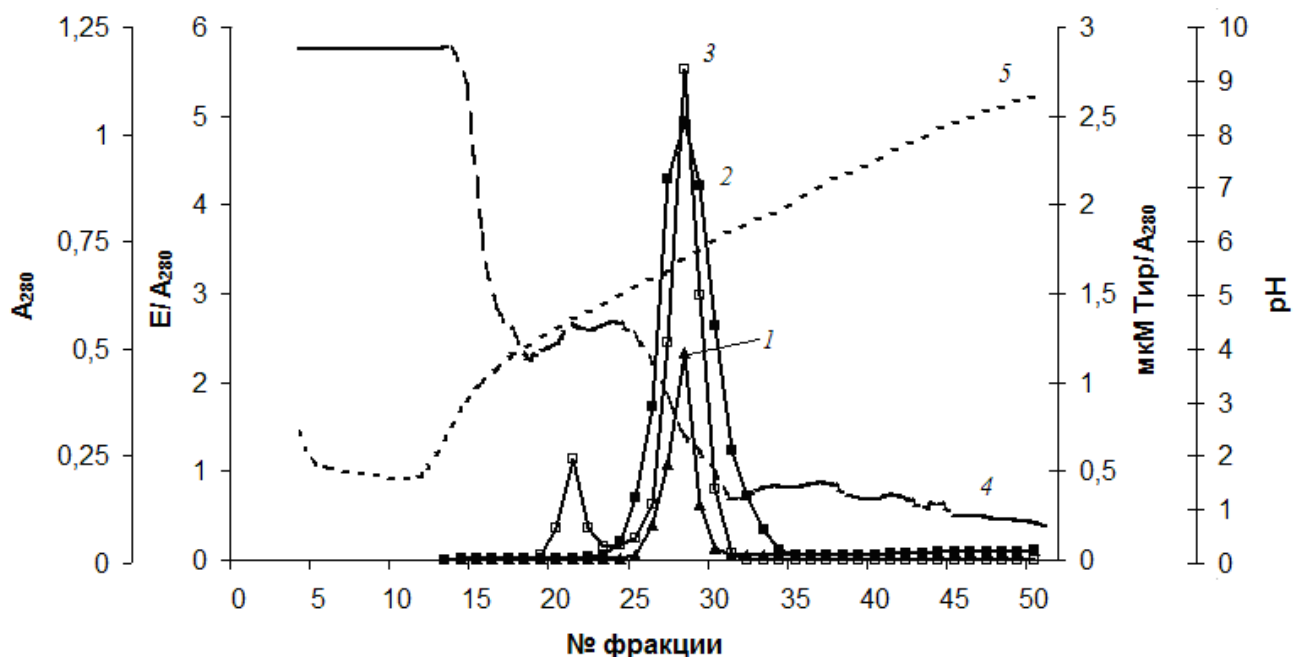


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1, выращенного в условиях глубинного культивирования. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность, 4 – белок, 5 – рН.

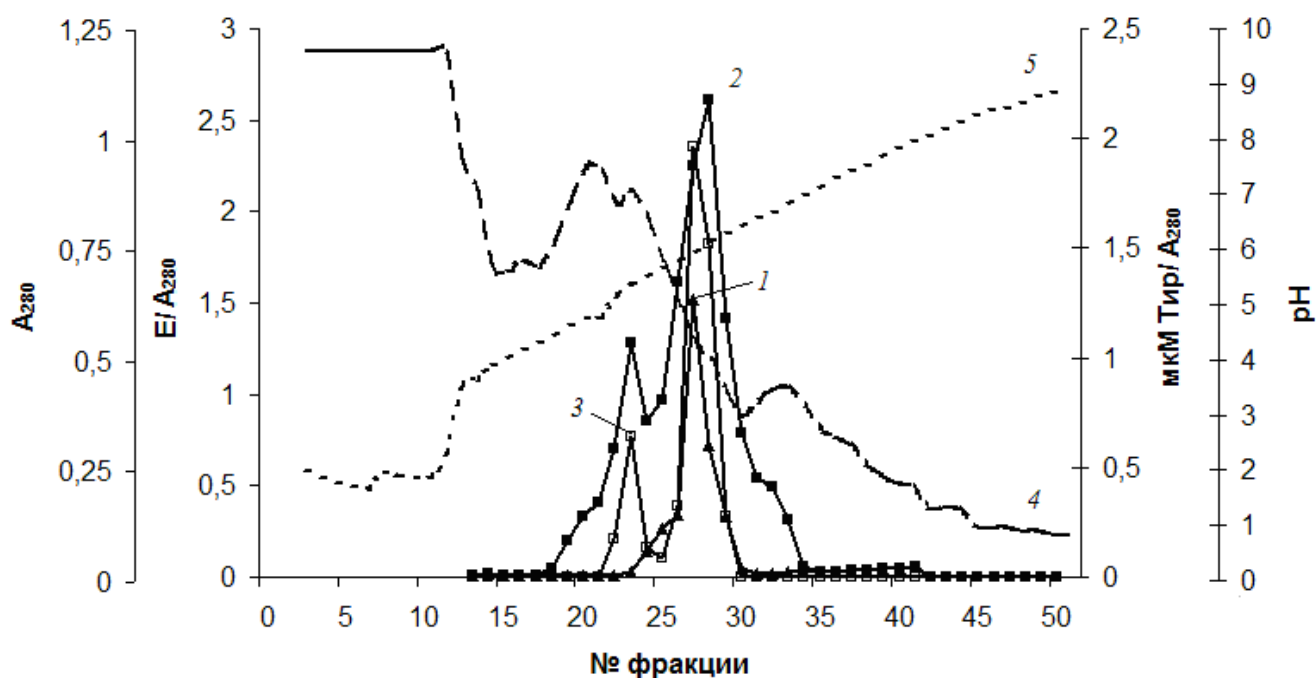


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1, выращенного в условиях твердофазного культивирования (на вермикулите). 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – общая протеолитическая активность, 4 – белок, 5 – рН.

Электрофоретическое разделение в ПААГ препаратов внеклеточных белков показало, что при ТФК *A. ochraceus* L-1 секретирует значительно большее количество внеклеточных белков по сравнению с глубинным культивированием (рис. 5, дорожки 1 и 2).

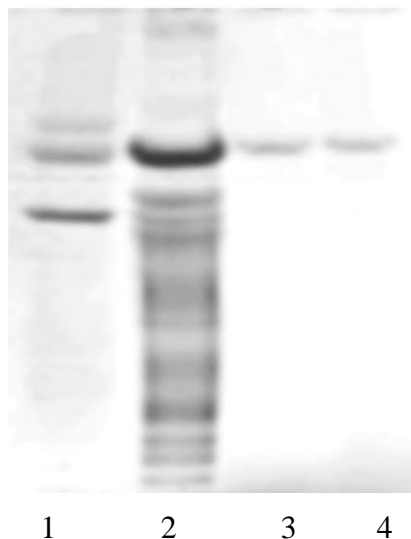


Рис. 5. Электрофорез внеклеточных белков микромицета *A. ochraceus* L-1. 1 – препарат белков, полученных при глубинном культивировании микромицета; 2 – препарат белков, полученных при твердофазном культивировании микромицета; 3 – протеиназа – активатор протеина С после изоэлектрофокусирования препарата после глубинного культивирования; 4 – протеиназа – активатор протеина С после изоэлектрофокусирования препарата после твердофазного культивирования.

Электрофоретический анализ фракций, проявивших активаторную к протеину С активность после изоэлектрофокусирования препаратов, полученных после глубинного и твердофазного культивирования, выявил в каждой из них по одной белковой зоне, обладавшей активаторной к протеину С активностью (рис. 5, дорожки 3 и 4), что может свидетельствовать о сходстве протеиназ, образуемых микромицетом как в условиях глубинного культивирования, так и в условиях ТФК.

7. Активация протеина С плазмы крови человека внеклеточной протеиназой *A. ochraceus* L-1. Для подтверждения способности протеиназы, образуемой *A. ochraceus* L-1, активировать протеин С проводили реакцию активации с чистым протеином С человека. Определение активности после прединкубации фермента с протеином С показало, что протеиназа *A. ochraceus* L-1 действительно может активировать протеин С человека, однако развитие реакции протекает во времени очень медленно (рис. 6). Так, после 5 минут инкубации протеиназы с субстратом активированного протеина С – pGlu-Pro-Arg-pNA удельная активность составила $9.8 \text{ E/o.e.} \times 10^{-3}$. На основании полученной кинетики протекания реакции было сделано предположение, что для ускорения активации протеина С протеиназа *A. ochraceus* L-1 нуждается в кофакторах. Такими кофакторами могут служить ионы Ca^{2+} , т.к. хорошо известно их участие в регуляции активности свертывания крови (Струкова, 2002).

Изучение влияния ионов кальция на активацию протеина С протеиназой *A. ochraceus* L-1 проводили, добавляя в реакционную смесь раствор ацетата кальция разной концентрации. Как видно из рис. 6, при конечной концентрации ионов $\text{Ca}^{2+} 1 \times 10^{-3} \text{ M}$

происходит небольшое увеличение скорости активации протеина С ферментом *A. ochraceus* L-1.

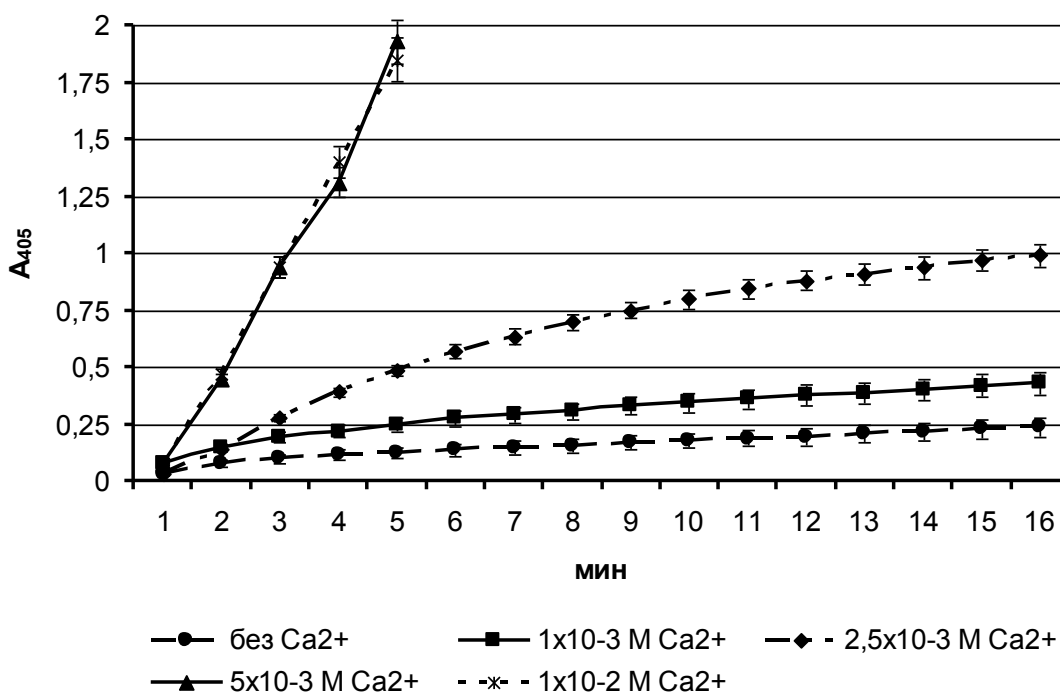


Рис. 6. Влияние ионов кальция на активацию протеина С протеиназой *A. ochraceus* L-1.

Повышение концентрации ацетата кальция в 2 раза, до $2,5 \times 10^{-3}$ М, привело к увеличению скорости активации протеина С, причем удельная активность фермента в этих условиях составила $73,4 \text{ Е/о.е.} \times 10^{-3}$, что в 7,5 раз выше, по сравнению с активацией протеина С в отсутствии ионов Ca^{2+} (рис. 6). При концентрации ацетата кальция в инкубационной смеси 5×10^{-3} М удельная активность фермента возросла в 25 раз раз и составила $245,8 \text{ Е/о.е.} \times 10^{-3}$. Аналогичные результаты были получены и при концентрации ионов кальция 1×10^{-2} М.

Таким образом, подтверждено, что протеиназа *A. ochraceus* действительно способна активировать протеин С человека, причем процесс активации протеина С существенно ускоряется в присутствии ионов Ca^{2+} , которые могут служить кофактором этой реакции.

8. Субстратная специфичность протеиназы – активатора протеина С, секретируемой *A. ochraceus* L-1. Изучение субстратной специфичности с хромогенными пептидными субстратами показало, что выделенная после изоэлектрофокусирования протеиназа не гидролизует субстраты трипсиноподобных (Bz-Arg-pNA), химотрипсиноподобных (Ac-Phe-pNA и Ac-Leu-Tyr-pNA) и субтилизиноподобных (Z-Ala-Ala-Leu-pNA) протеиназ. Субстраты, за исключением субстрата тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), содержащие в положении P_1 аргинин, изучаемой протеиназой не гидролизывались (Табл. 6).

Таблица 6.

Субстратная специфичность протеиназы – активатора протеина С из *A. ochraceus* L-1

Хромогенный субстрат	Удельная амидолитическая активность, Е/о.е. $\times 10^{-3}$
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	313.6
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	286.5
pGlu-Pro-Arg-pNA	0
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	0
pGlu-Gly-Arg-pNA	0
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	0
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	0
Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA	0
Bz-Arg-pNA	0
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	0
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	0
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	0
pGlu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	0
Ac-Phe-pNA	0
Ac-Leu-Tyr-pNA	0

Как видно из табл. 6, протеиназа *A. ochraceus* L-1 способна расщеплять субстрат плазмина – H-D-Val-Leu-Lys-pNA и не способна гидролизовать субстраты Ха-фактора (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA и Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA) и тканевого активатора плазминогена (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA). По-видимому, большое значение для протеолитической активности фермента имеет аминокислотная последовательность хромопептида. Так, замена аминокислот в положениях P₂ и P₃ не оказывала влияние на расщепление субстратов по аргинину (табл. 6).

Таким образом, на основе изучения субстратной специфичности протеиназы *A. ochraceus* L-1 с хромогенными пептидными субстратами можно сделать заключение, что протеиназа – активатор протеина С, образуемая микромицетом *A. ochraceus*, имеет узкую специфичность.

Изучение протеолитической активности внеклеточной протеиназы *A. ochraceus* L-1 с белковыми субстратами (казеином, фибрином и азоколлагеном) показало, что наряду с казеинолитической активностью (1163.6 мкМ Тур/мин/A₂₈₀), изучаемая протеиназа обладает фибринолитической (610.5 усл.ед./A₂₈₀) и коллагенолитической активностью (0.7 мг азоколлага/A₂₈₀). Активаторной к плазминогену активности у выделенной протеиназы обнаружено не было.

9. Изучение кинетических параметров протеиназы – активатора протеина С, выделенной из *A. ochraceus* L-1. Значения кинетических параметров – K_m и V_{max} амидолитической активности протеиназы *A. ochraceus* L-1, определенные с хромогенным субстратом тромбина Tos-Gly-Pro-Arg-pNA составили 2.34 мМ и 1.66 мМ, соответственно.

Значения K_m и V_{max} для амидолитической реакции активированного протеина С, где в качестве активатора РС использовалась протеиназа *A. ochraceus* L-1, с субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA составили 2.18 мМ и 1.2 мМ, соответственно.

10. Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на активаторную к протеину С активность внеклеточной протеиназы *A. ochraceus* L-1. Ингибиторный анализ протеиназы *A. ochraceus* L-1 показал, что активаторная активность фермента полностью ингибируется PMSF – ингибитором сериновых протеиназ. Частичное ингибирование активности *n*-ХМБ – ингибитором цистеиновых протеиназ – указывает на возможную роль тиоловых групп, необходимых для поддержания структуры фермента или его активности. Также активаторная активность протеиназы практически полностью ингибируется соевым ингибитором трипсина. Ингибитор химотрипсиноподобных протеиназ – ТРСК ингибирует активность фермента более чем на 30%, а ингибитор трипсиноподобных ферментов ТЛСК оказывает влияние в более значительной степени, что подтверждает данные о субстратной специфичности к хромопептиду Н-D-Val-Leu-Lys-pNA.

11. Изучение физико-химических свойств протеиназы – активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus* L-1. Денатурирующий электрофорез фермента в ПААГ позволил установить, что протеиназа из *A. ochraceus* L-1 представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой около 33 кДа (рис. 7), что соответствует молекулярной массе протеиназы с антикоагулянтной активностью, выделенной из *A. ochraceus* 513 (Батомункева и Егоров, 2001).

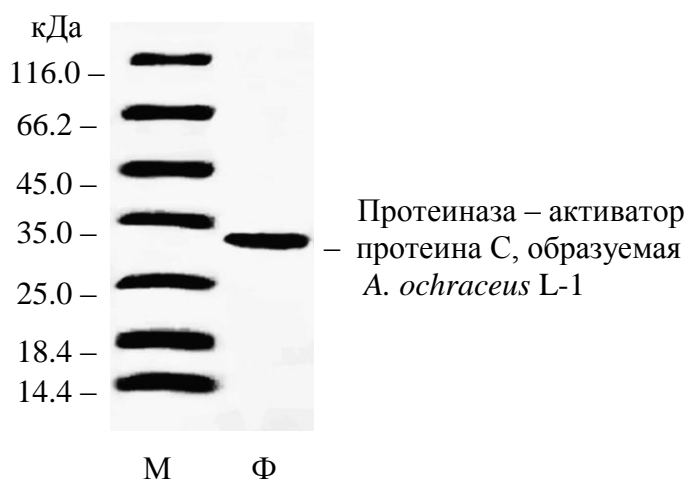


Рис. 7. Определение молекулярной массы протеиназы – активатора РС, образуемой *A. ochraceus* L-1 (денатурирующий электрофорез в ПААГ, по Лэммли): М – метчики, Ф – активная фракция после изоэлектрофокусирования.

Определение углеводного компонента в составе изучаемой протеиназы с помощью реакции на гликопротеины дало отрицательный результат. Это означает, что протеиназа *A. ochraceus* L-1 не гликозилирована в отличие от активатора РС, содержащегося в яде *A. contortrix contortrix* (Kisiel et al., 1987; Murakami and Arni, 2005). Возможно, отсутствие гликозилированных участков в молекуле грибного активатора может служить одной из причин необходимости кофактора (ионов Ca^{2+}) для активации им протеина С.

Изучение зависимости активности протеиназы – активатора РС *A. ochraceus* L-1 от рН показало, что фермент проявляет активность в интервале рН от 5.0 до 10.0. При более кислых значениях рН – 3.0 и 4.0 фермент не был активен. В щелочных условиях, при рН 11.0 активность протеиназы составила лишь 6%. Максимальное значение активности наблюдали при рН 8.0-9.0 (рис. 7). Протеиназа *A. ochraceus* L-1 стабильна в интервале рН 5.0-9.0 в течение 2-х часов. За это время сохраняется 100%-ая активность фермента. При рН 10.0 активность сохраняется на 81.5% (рис. 8).

Определение температурного оптимума активности исследуемого фермента выявило, что фермент обладает активностью в интервале температур 25-55 °С (рис. 9). Максимальную активность протеиназы – активатора РС, образуемой *A. ochraceus* L-1, наблюдали при 37°С, т.е. температуре, соответствующей физиологическим условиям активации протеина С в кровотоке человека. При температуре 65 °С активность фермента практически отсутствует.

Изучение термостабильности исследуемой протеиназы показало, что фермент полностью сохраняет активность при температуре от 25 до 37°С в течение 2-х часов (рис. 10). При температуре 45 °С активность снижается незначительно, на 8.6%. При более высоких значениях температур активность фермента резко снижается, уже при температуре 55 °С сохраняется менее 5% активности.

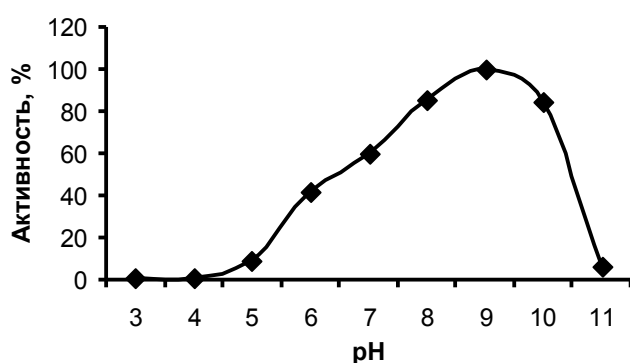


Рис. 7. Зависимость активности протеиназы *A. ochraceus* L-1 от рН.

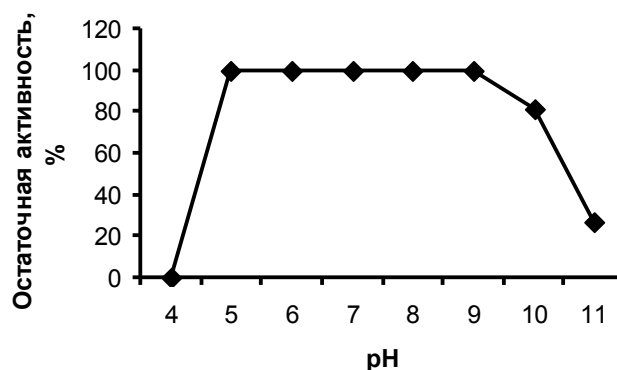


Рис. 8. Стабильность активности протеиназы *A. ochraceus* L-1 при различных значениях рН.

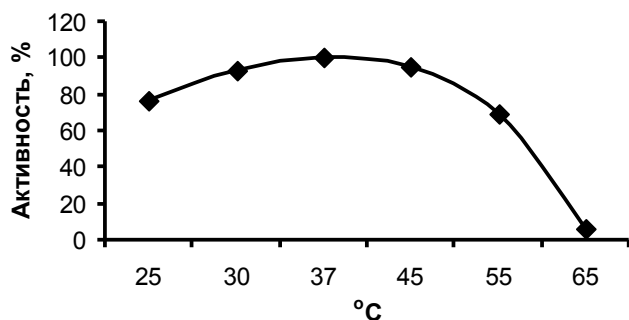


Рис. 9. Влияние температуры на активность протеиназы – активатора РС, образуемой *A. ochraceus* L-1 от рН.

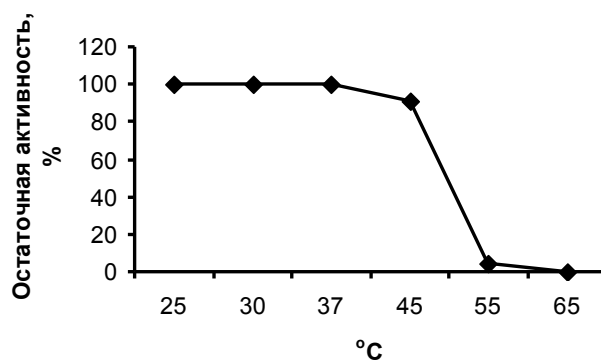


Рис. 10. Влияние температуры на стабильность внеклеточной протеиназы *A. ochraceus* L-1 с активаторной к РС активностью.

12. Масс-спектрометрический анализ протеиназы *A. ochraceus* L-1. Выделенная из культуральной жидкости протеиназа *A. ochraceus* L-1 была изучена с помощью масс-спектрометрии методом МАЛДИ. Сопоставление молекулярных масс полученных пептидных фрагментов с пептидными фрагментами известных белков по электронным базам данных не выявило высокой гомологии, что может быть связано как с отсутствием данных о геноме *A. ochraceus*, так и нехватке сведений о структуре протеолитических ферментов микромицетов. При поиске белков среди представителей царства Животные гомологичных белков также не было найдено, соответственно, протеиназа – активатор протеина С из *A. ochraceus* L-1 негомологична протеиназе – активатору протеина С из *Agkistrodon contortrix contortrix*.

13. Сравнение активаторной к протеину С активности протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *Agkistrodon contortrix contortrix*. Дальнейшее изучение протеиназы, полученной из *A. ochraceus* L-1, было связано со сравнением ее активности с активностью аналогичных препаратов из яда щитомордника: активатора из диагностикума отечественного производства (препарат «Ренам») и активатора немецкой фирмы «Dade Behring». Как видно из табл. 7, удельная активаторная к протеину С активность протеиназы *A. ochraceus* L-1 сопоставима с активностью змеиного активатора, производимого компанией «Ренам» и в 3 раза превышает активность протеиназы из яда щитомордника, выпускаемого компанией «Dade Behring».

Исходя из полученных данных следует, что протеиназа, выделенная из *A. ochraceus*, является альтернативой активатору протеина С из яда щитомордника и представляет практический интерес для использования в составе соответствующих диагностикумов.

Сравнение удельной активаторной к РС активности протеиназ препаратов из яда щитомордника и *Aspergillus ochraceus*

Активаторы протеина С	Активаторная к протеину С активность, Е/о.е. $\times 10^{-3}$
<i>Aspergillus ochraceus</i> L-1	222.4
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> (препарат «Ренам»)	218.9
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> (препарат «Dade Behring»)	71.4

14. Сравнение свойств активаторов протеина С, образуемых *Aspergillus ochraceus* и содержащихся в яде *Agkistrodon contortrix contortrix*. Особый интерес представляет сравнение полученных данных о внеклеточных протеиназах – активаторах протеина С, образуемых *A. ochraceus*, с данными литературы об активаторах протеина С из яда щитомордника (табл. 8). Так, по проявлению высокой тромбиноподобной активности с хромогенным пептидным субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, значению рI в области рН 6.0-6.3 и ингибированию активности ингибиторами сериновых протеиназ протеиназа – активатор протеина С микромицета *A. ochraceus* сходна с активатором протеина С из яда змеи *A. contortrix contortrix* (Orthner et al., 1988). Оба фермента имеют и близкие значения рН-оптимума активности. Для активатора протеина С, образуемого *A. ochraceus*, оптимальная активность проявляется при рН 8.0-9.0, а для протеиназы из яда щитомордника известно, что рН-оптимум его активности находится при рН 8.4 (Stoker et al., 1987).

Однако по ряду свойств эти протеиназы имеют некоторые различия. Одно из главных отличий – химическая природа ферментов. Протеиназа – активатор протеина С *A. ochraceus* является негликозилированным белком, в то время как для змеиного активатора установлено, что он представляет собой гликопротеин (Kisiel et al., 1987; Orthner et al., 1988).

Существенное отличие между грибным и змеиным активаторами заключается в роли ионов Ca^{2+} для процесса активации протеина С (табл. 8). В отличие от активатора из яда *A. contortrix contortrix* (Kisiel et al., 1987; Orthner et al., 1988) активация протеина С грибным активатором является Ca^{2+} -зависимым процессом. Известно, что ионы Ca^{2+} не только не стимулируют активацию РС человека активатором из яда щитомордника, но и вовсе ингибируют ее (Kisiel et al., 1987; Orthner et al., 1988).

Таблица 8.

Сравнение свойств протеиназ – активаторов протеина С *Aspergillus ochraceus* и *Agkistrodon contortrix contortrix*

Свойство	Протеиназа из <i>A. contortrix contortrix</i> (Kisiel et al., 1987; Orthner et al., 1988)	Протеиназа из <i>A. ochraceus</i>
Расщепление pGlu-Pro-Arg-pNA вследствие активации протеина С	+	+
Тромбиноподобная активность с Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	+	+
Плазминоподобная активность с H-D-Val-Leu-Lys-pNA	-	+
Расщепление субстрата Ха-фактора Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA	+	-
Расщепление субстрата тканевого активатора плазминогена H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	+	-
K_m (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), мМ	1.1	2.3
Молекулярная масса, кДа	36-40	33
Изоэлектрическая точка	6.3	6.0
Оптимум pH активности	8.4	8.0-9.0
Гликозилирование	+	-
Класс протеиназ	сериновая	сериновая
Влияние ионов Ca^{2+} на активаторную к протеину С активность	ингибирование	активирование

Были выявлены различия и в субстратной специфичности обоих ферментов по отношению к хромогенным субстратам ряда протеолитических ферментов плазмы крови (табл. 8).

Из литературных данных известно, что из всех субстратов, содержащих аргинин в положении P_1 хромопептида, наибольшей амидолитической активностью активатор протеина С из яда щитоморника обладает по отношению именно к субстрату Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, поэтому проявление тромбиноподобной активности можно считать общим свойством обоих активаторов. Отсутствие амидолитической активности протеиназы *A. ochraceus* к хромогенным субстратам (за исключением субстрата тромбина Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), содержащим в положении P_1 аргинин, существенно отличает протеиназу – активатор протеина С *A. ochraceus* L-1 от активатора *Agkistrodon contortrix contortrix*, который расщепляет по

аргинину как субстрат тромбина, так и другие субстраты протеиназ плазмы крови (Kisiel et al., 1987; Orthner et al., 1988).

Важным отличием субстратной специфичности грибного активатора протеина С от змеиного является способность протеиназы *A. ochraceus* гидролизовать хромогенный субстрат плазмина Н-D-Val-Leu-Lys-pNA. Возможно, что проявление плазминоподобной активности связано с различиями в механизмах действия грибного и змеиного активаторов.

Протеиназа – активатор протеина С *A. ochraceus* в отличие от активатора из яда *Agkistrodon contortrix contortrix* обладает казеино-, коллагено- и фибринолитической активностью, т.е. способна гидролизовать различные белковые субстраты.

Сравнения K_m грибной и змеиной протеиназ для амидолитической реакции с Tos-Gly-Pro-Arg-pNA показало их сопоставимость.

ВЫВОДЫ

1. Доказана способность штаммов микромицета вида *Aspergillus ochraceus*, выделенных из различных экотопов разных географических регионов, продуцировать в процессе развития внеклеточные протеиназы, активирующие протеин С плазмы крови человека.
2. Определены оптимальные условия глубинного и твердофазного культивирования микромицета *A. ochraceus* – продуцента протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови человека и разработаны способы получения этих ферментов при культивировании продуцента в глубинных и твердофазных условиях. Показано, что в условиях твердофазного культивирования активаторная к протеину С активность микромицета в 1.5-3.5 раза выше по сравнению с активностью при глубинном культивировании (из расчета на мл питательной среды), а продуктивность мицелия больше в 4.8 раза.
3. Установлена способность протеиназы – активатора протеина С, полученной из *A. ochraceus* L-1, активировать протеин С человека. Показано, что реакция активации протеина С является Ca^{2+} -зависимой.
4. Показано, что протеолитический фермент – активатор протеина С, образуемый *A. ochraceus* L-1, представляет собой негликозилированный белок – сериновую протеиназу с мол. массой около 33 кДа, рI 6.0 и оптимумом активности при рН 8.0-9.0 и оптимумом температуры 37°C.
5. Выявлены различия в субстратной специфичности протеиназы, продуцируемой *A. ochraceus* L-1 и протеиназы – активатора протеина С, содержащегося в яде южно-

американского щитомордника, заключающиеся в неспособности грибного фермента гидролизовать большинство хромогенных пептидных субстратов по аргинину.

6. Сравнение активаторной к протеину С активности протеиназы *A. ochraceus* L-1 и активатора из яда южно-американского щитомордника показало сопоставимость активаторной активности грибной протеиназы, что делает ее перспективным заменителем змеиного препарата в диагностикумах для определения содержания протеина С в плазме крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи и короткие сообщения в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus ochraceus* – продуценты внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови // Прикладная биохимия и микробиология, 2012, т. 48, №5, с. 537-542.
2. Крейер В.Г., Баранова Н.А., Осмоловский А.А., Пискункова Н.Ф., Кураков А.В., Егоров Н.С. *Aspergillus ochraceus* – продуцент активаторов протеина С плазмы крови человека // Иммунология, аллергология, инфектология, 2009, №2, с. 187-188.
3. Кураков А.В., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Стратегия поиска термотолерантных микромицетов – продуцентов протеиназ антикоагулянтного и фибринолитического действия // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2010, №1, с. 255.
4. Осмоловский А.А. Сравнение активности препаратов экзогенных активаторов протеина С плазмы крови животного и микробного происхождения // Медицинский академический журнал. 2010, т.10, №5, стр.106.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови при глубинном и твердофазном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология, 2013, №6 (в печати).

Патенты РФ:

1. Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Штамм *Aspergillus ochraceus* Wilhelm – продуцент протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Патент РФ № 2460772.
2. Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Штамм *Aspergillus ochraceus* Wilhelm – продуцент протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Патент РФ № 2461614.
3. Кураков А.В., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Штамм *Aspergillus ochraceus* Wilhelm – продуцент протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Патент РФ № 2461615.
4. Кураков А.В., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Штамм *Aspergillus ochraceus* Wilhelm – продуцент протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Патент РФ № 2461616.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Способ получения протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Патент РФ № 2468081.
6. Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Способ твердофазного культивирования *Aspergillus ochraceus* для получения протеиназы – активатора протеина С плазмы крови. Заявка на патент №2013113997.

Тезисы докладов:

1. Крейер В.Г., Баранова Н.А., Осмоловский А.А., Пискункова Н.Ф., Кураков А.В., Егоров Н.С. *Aspergillus ochraceus* – продуцент активаторов протеина С плазмы крови человека // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием "Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах", Москва, 26-29 мая 2009 г. Бюллетень МОИП. Отд. Биологический, 2009, т. 114, вып. 2, прил. 1, с. 62-64.
2. Осмоловский А.А., Кураков А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С., Нетрусов А.И. Микромицеты *Aspergillus ochraceus* – перспективные продуценты плазминоподобных и тромбиноподобных протеиназ // Материалы конференции "Экология. Природные ресурсы. Рациональное природопользование. Охрана окружающей среды", Москва – Истра, 26-28 октября 2009 г. Бюллетень МОИП. Отд. Биологический, 2009, т. 114, вып. 3, прил. 1, часть 2, с. 169.
3. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Милько Е.С., Пискункова Н.Ф., Егоров Н.С., Нетрусов А.И. Образование протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови естественными вариантами штаммов *Aspergillus ochraceus* // Материалы конференции "Экология. Природные ресурсы. Рациональное природопользование. Охрана окружающей среды", Москва – Истра, 26-28 октября 2009 г. Бюллетень МОИП. Отд. Биологический, 2009, т. 114, вып. 3, прил. 1, часть 2, с. 170.
4. Осмоловский А.А. Микроскопические грибы *Aspergillus ochraceus* – перспективные продуценты протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови // Материалы III научно-практической конференции «Перспективы развития инноваций в биологии», Москва, 11-13 ноября 2009 г. М.: МАКС Пресс, 2009, с. 130.
5. Егоров Н.С., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Шаркова Т.С., Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н. Внеклеточные протеиназы микроскопических грибов с профибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Тромбозы, кровоточивость, ДВС-синдром: современные подходы к диагностике и лечению», Москва, 26-28 ноября 2009 г. Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов, 2009, т. 8, прил. 7, с. 35-36.
6. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Пискункова Н.Ф., Егоров Н.С. Микробиологическое получение активаторов протеина С плазмы крови из микромицета *Aspergillus ochraceus*. // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (к 125-летию со дня рождения академика В.Н. Шапошникова и 120-летию со дня рождения профессора Е.Е. Успенского), Москва, 24-27 декабря 2009 г. М.: МАКС Пресс, 2009, с. 143.
7. Осмоловский А.А. Микромицеты – возможные альтернативные источники активаторов протеина С плазмы крови // Материалы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010», Москва, 12-15 апреля 2010 г. М.: МАКС Пресс, 2010, с. 179.
8. Осмоловский А.А. Некоторые свойства препаратов протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови культуры *Aspergillus ochraceus* 247 // Тезисы докладов VI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 25-27 октября 2010 г. М.: МАКС Пресс, 2010, с. 145-146.
9. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Пискункова Н.Ф., Егоров Н.С. Внеклеточные протеиназы *Aspergillus ochraceus* – активаторы протеина С плазмы крови // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее» (к 90-летию Заслуженного профессора Московского университета Н.С. Егорова), Москва, 27-29 января 2011 г. М.: МАКС Пресс, 2011, с. 89.

10. Осмоловский А.А. Протеолитическая активность внеклеточных ферментов *Aspergillus ochraceus* // Тезисы докладов XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011», Москва, 11-15 апреля 2011 г. М.: МАКС Пресс, 2011, с. 184.
11. Осмоловский А.А. Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови в условиях твердофазного культивирования // Материалы XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012», Москва, 9-13 апреля 2012 г. М.: МАКС Пресс, 2012, с. 175.
12. Осмоловский А.А., Бубнов И.А., Корнеева В.А., Брюханов А.Л. Сравнение молекулярно-генетических свойств микромицетов *Aspergillus ochraceus* – изолятов различных типов почв // Тезисы докладов VIII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 29-31 октября 2012 г. М.: МАКС Пресс, 2012, с. 85-86.
13. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Звонарева Е.С. Электрофоретическое изучение протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови, образуемых *Aspergillus ochraceus* при глубинном и твердофазном культивировании. Тезисы докладов XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013», Москва, 8-13 апреля 2013 г. М.: МАКС Пресс, 2013, с. 204.