

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.282.123.4 : 577.152.34

**ФИБРИНО- И ФИБРИНОГЕНОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ МИКРОМИЦЕТОВ
ASPERGILLUS ALLIACEUS 7DN1 И *A. TERREUS* 2**

© 2023 г. А. А. Осмоловский^{1,2,*}, С. Д. Клягин^{1,**}, Т. В. Вашкевич^{2,***},
А. В. Кураков^{1,****}, В. Г. Крейер^{2,*****}

¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия

²Биотехнологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

**e-mail: sergey_klyagin@mail.ru

***e-mail: 12878853t@gmail.com

****e-mail: kurakov57@mail.ru

*****e-mail: vkreyer@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.03.2023 г.

После доработки 01.05.2023 г.

Принята к публикации 20.05.2023 г.

Проведено протеолитическое расщепление фибрина и фибриногена под действием протеиназ микромицетов *Aspergillus alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2. Показано, что оба фермента обладают сильной α -фибриногеназной и умеренной β -фибриногеназной активностью, практически не оказывая воздействия на γ -цепи этих молекул. Продуктами расщепления в интервале времени до 60 мин являются полипептиды с молекулярной массой 15 кДа и менее.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибриногенолитические ферменты, фибринолитические ферменты

DOI: 10.31857/S0026364823040086, **EDN:** VVADYR

Мицелиальные грибы *Aspergillus alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2 являются перспективными продуцентами фибринолитических (плазминоподобных) протеиназ (Batomunkueva, Egorov, 2002; Zvonareva et al., 2018; Osmolovskiy et al., 2021). Выявленные свойства этих протеиназ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных тромболитиков как для терапии тромбозов, так в составе аппликационных средств — раневых повязок, противогематомных гелей и мазей, косметических средств. Очевидно, определяющим шагом для последующей разработки таких ферментов являются доклинические исследования. Одним из необходимых условий их начала является понимание механизма или способа конечного воздействия протеиназ на белки-мишени. Поскольку оба протеолитических фермента предполагается применять для направленной деградации молекул фибрина и фибриногена, то степень их лизиса представляется важной задачей.

Таким образом, целью работы было изучение фибринолитического и фибриногенолитического действия внеклеточных протеиназ микромицетов *A. alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2.

В работе использовали штаммы из коллекции кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносо-

ва. Для получения протеолитических ферментов микромицеты выращивали в условиях глубинного культивирования в подобранных ранее условиях (Zvonareva et al., 2018). Выделение внеклеточных протеиназ продуцентов содержало этапы высаливания белков из культуральной жидкости сульфатом аммония, диализ и последующее колоночное изоэлектрофокусирование по Вестербергу, как описано ранее (Osmolovskiy et al., 2014). Гомогенность выделенной протеиназы подтверждали электрофоретически по методу Лэммли. Белок определяли по методу Брэдфорд.

Расщепление фибрина и фибриногена проводили в реакциях инкубации указанных субстратов с протеиназами микромицетов с последующим электрофоретическим анализом продуктов деградации (Petraglia et al., 2022). Для проведения реакции к 25 мкл пробы, содержащей протеиназу, добавляли 50 мкл 0.1%-го р-ра фибрина, либо фибриногена (“Sigma-Aldrich”, США), приготовленного на 0.1 М Трис-НСl буфере, рН 8.2, и инкубировали определенное время (в интервале от 10 с до 60 мин) при 37°C при постоянном перемешивании (600 об./мин) в термошейкере TS-100 (“Bio-San”, Латвия). Реакцию останавливали на 25 мкл

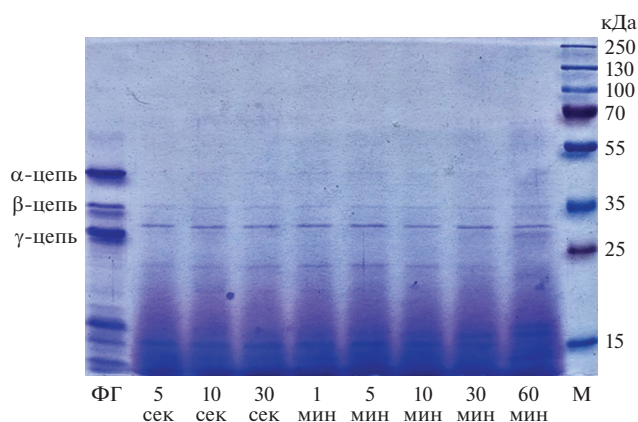


Рис. 1. Протеолиз фибриногена протеиназой *Aspergillus alliaceus* 7dN1: ФГ – фибриноген, М – маркеры молекулярной массы.

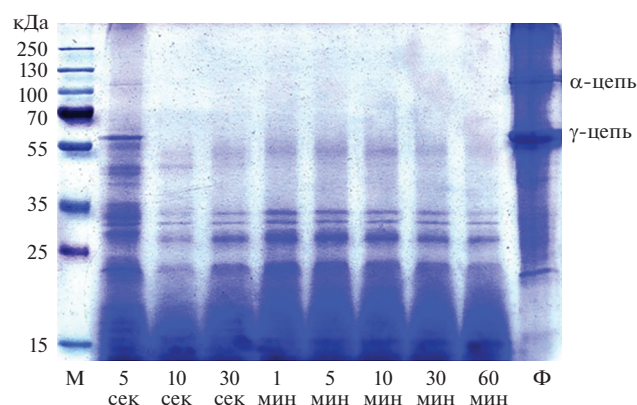


Рис. 2. Протеолиз фибрина протеиназой *Aspergillus alliaceus* 7dN1: Ф – фибрин, М – маркеры молекулярной массы.

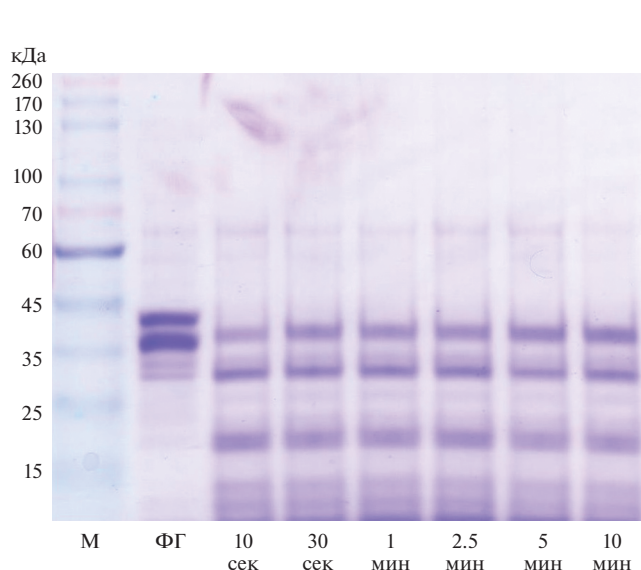


Рис. 3. Протеолиз фибриногена протеиназой *Aspergillus terreus* 2: ФГ – фибриноген, М – маркеры молекулярной массы. Цепи фибриногена не указаны, образец фибриногена аналогичен образцу, представленному на рис. 1.

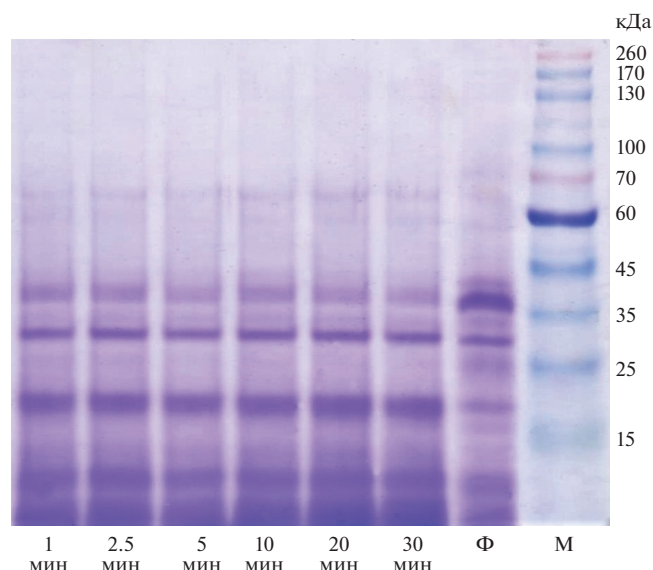


Рис. 4. Протеолиз фибрина протеиназой *Aspergillus terreus* 2: Ф – фибрин, М – маркеры молекулярной массы. Цепи фибриногена не указаны, образец фибриногена аналогичен образцу, представленному на рис. 2.

буфера для проб, приготовленного на 0.00625 М Трис-НСl буфере, рН 6.8, содержащего (в %): SDS – 2.0; сахарозу – 10.0; меркаптоэтанол – 5.0; бромфеноловый синий – 0.001. После остановки реакции пробы выдерживали при температуре 100°C в течение 3 мин и наносили на гель для электрофореза. Электрофорез проводили в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли при силе тока 20 мА.

С помощью препаративного изоэлектрофокусирования были выделены протеиназы микромицетов *A. alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2. Фракции, содержащие протеиназу *A. alliaceus* 7dN1 имели pI 8.0–8.2, фракции с протеиназой *A. terreus* 2 – pI 4.4–4.7.

Действие протеиназ микромицетов на фибрин и его предшественник – фибриноген – представлено на рис. 1–4.

Фибриногенолитическая активность протеиназы *A. alliaceus* 7dN1 (рис. 1) выражена в быстром разрушении α- и β-цепи фибриногена. α-цепь с молекулярной массой около 43 кДа была наиболее чувствительной к действию протеиназы данного микромицета и быстро гидролизировалась в течение первых 5 с. Большая часть β-цепи с молекулярной массой около 35 кДа также разрушалась в течение 5 с. В связи с этим можно судить о том, что выделенная протеиназа обладала сильной α-фибриногеназной, умеренной β-фибриногеназной, а также некоторой активностью γ-фибриногеназы.

Электрофоретический анализ протеолиза фибрина (рис. 2) под действием фермента *A. alliaceus* 7dN1 был аналогичен результатам фибриногенолиза: α-цепь полностью, а γ-частично гидролизует

при фибринолизе после первых 5 с, продукты распада γ -цепи гидролизуются полностью в течение 1 ч.

Гидролиз фибриногена протеиназой *A. terreus* 2 также позволил отнести этот фермент к α -фибриногеназам (рис. 3). Другие цепи гидролизировались этой протеиназой медленнее. Выявить каких-либо закономерностей в расщеплении цепей молекулы фибрина под действием фермента не удалось. Из полученных данных (рис. 4) следует, что протеиназа *A. terreus* 2 гидролизует фибрин во времени постепенно, о чем свидетельствует накопление продуктов его распада с молекулярной массой около 20 кДа. По-видимому, протеиназа *A. terreus* 2 не обладает узкой субстратной специфичностью в отношении фибриногена и фибрина, несмотря на выраженность ее протеолитического действия к этим белкам, установленное ранее (Zvonareva et al., 2018; Osmolovskiy et al., 2021).

На всех четырех электрофореграммах заметно большое количество продуктов расщепления фибриногена и фибрина с молекулярной массой менее 15 кДа — разнообразных полипептидов, что свидетельствует о неполном гидролизе (до аминокислот) этих белков изученными протеиназами микромицетов в заданных временных условиях.

Таким образом, внеклеточные протеолитические ферменты микромицетов *A. alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2 проявляют высокую активность к фибрину и фибриногену. Для сравнения можно отметить, что протеиназы некоторых базидиальных грибов способны полностью лизировать фибриноген и фибрин за время до 480 мин (Petraglia et al., 2022). Это делает изученные протеиназы аспергиллов перспективными действующими веществами для разжижения тромбов в соответствии с принятыми требованиями (Lal, 2017). Полученные данные позволяют указывать на их принадлежность к плазминоподобным белкам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Preparations of extracellular proteinases from *Aspergillus ochraceus* 513 and *Aspergillus alliaceus* 7dN1. *Mikrobiologiya*. 2002. V. 71. № 1. P. 56–58.
- Lal V. Fibrinolytic drug therapy in the management of intravascular thrombosis, especially acute myocardial infarction. A review. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2017. V. 2. A. 555593. <https://doi.org/10.19080/JPCR.2017.02.555593>
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G. et al. Thrombolytic potential of the extracellular proteinase of micro-mycete *Aspergillus terreus* 2. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2021. V. 55 (3). P. 225–228 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0026364821030089>
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G. et al. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40 (6). P. 634–639.
- Petraglia T., Latronico T., Liuzzi G.M. et al. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: Comparison between four cultivated species. *Molecules*. 2022. V. 27. A. 8145. <https://doi.org/10.3390/molecules27238145>
- Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Production of proteinase with plasmin-like and prekallikrein activating activity by the micromycete *Aspergillus terreus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54 (2). P. 206–210. <https://doi.org/10.1134/S0003683818020151>
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Осмоловский et al.) Секретция протеиназ с фибринолитической активностью микромицетами рода *Aspergillus* // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2018. Т. 73 (1). С. 39–42.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Осмоловский et al.) Тромболитический потенциал внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus terreus* 2 // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 3. С. 225–228.

Fibrin- and Fibrinogenolytic Effect of Extracellular Proteinases of Microfungi *Aspergillus alliaceus* 7dN1 and *A. terreus* 2

A. A. Osmolovskiy^{a,b,#}, S. D. Klyagin^{a,##}, T. V. Vashkevich^{a,###}, A. V. Kurakov^{a,####}, and V. G. Kreier^{a,#####}

^aFaculty of Biology of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^bFaculty of Biotechnology of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[#]e-mail: aosmol@mail.ru

^{##}e-mail: sergey_klyagin@mail.ru

^{###}e-mail: 12878853t@gmail.com

^{####}e-mail: kurakov57@mail.ru

^{#####}e-mail: vkreyer@yandex.ru

Proteolytic cleavage of fibrin and fibrinogen under the action of proteases of microfungi *Aspergillus alliaceus* 7dN1 and *A. terreus* 2 was carried out. It was shown that both enzymes can have strong α -fibrinogenase and moderate β -fibrinogenase activity, practically without affecting the γ -chains of these molecules. The products of cleavage in the time interval up to 60 min are polypeptides with a molecular weight of 15 kDa or less.

Keywords: fibrinolytic enzymes, microfungi proteinases, thrombolysis