



УДК 577.152.34*211.4'1

ПРОТЕИНАЗА ALP1 ИЗ *Aspergillus fumigatus* И ЕЕ БЕЛКОВЫЙ ИНГИБИТОР ИЗ *Physarum polycephalum*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2005 г. Д. А. Дэвис**, Н. А. Калинина*, Л. В. Самохвалова*, Г. В. Малахова*, Г. Скотт**, Г. Веннинг**, А. М. Вольнская*, В. А. Несмеянов**

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Лондонский госпиталь университетского колледжа, отделение клинической микробиологии, Графтон Вэй, Лондон, Великобритания

Поступила в редакцию 12.07.2004 г. Принята к печати 13.10.2004 г.

Aspergillus fumigatus секретирует сериновую протеиназу субтилизинового семейства ALP1 в присутствии внеклеточных белковых субстратов. Разработаны условия выращивания *A. fumigatus*, при которых обнаружена высокая активность ALP1 внутри клеток без индукции внеклеточными субстратами. Показана идентичность свойств секретируемого и внутриклеточного ферментов. Термоустойчивый белковый ингибитор протеиназы ALP1 выделен из плазмодия миксомицета *Physarum polycephalum*. Молекулярная масса ингибитора составляет 32–33 кДа. Ингибитор подавляет активность протеиназы ALP1, при этом значение IC₅₀ составляет 0.14 мкМ. Обнаружено, что этот ингибитор с меньшей эффективностью подавляет активность ВИЧ-1-протеиназы (IC₅₀ 2.5 мкМ).

Ключевые слова: сериновая протеиназа, ALP1, *Aspergillus fumigatus*, *Physarum polycephalum*, белковый ингибитор протеиназ, ВИЧ-1-протеиназа.

ВВЕДЕНИЕ

Aspergillus fumigatus является возбудителем опасных респираторных и легочных инфекций, таких, как некротизирующая бронхопневмония и инвазивный легочный аспергиллез, приводящих к смерти больных с ослабленным иммунитетом [1]. Заражение происходит при попадании содержащихся в воздухе конидий в дыхательные пути с последующим прорастанием спор и развитием грибных колоний в паренхиме легких. При инвазивной инфекции грибные гифы преодолевают барьеры из таких белков, как эластин, коллаген и ламинин, поэтому секретируемые патогенными грибами протеиназы рассматриваются в качестве основных потенциальных вирулентных факторов и в настоящее время интенсивно изучаются [2]. Вовлечение протеиназ в инфекционный процесс полностью доказано для *Candida albicans* [3–5]. Существует положительная корреляция между секрецией протеиназ и инфекционной спорностью штаммов *A. fumigatus* [6]. Различные протеолити-

ческие активности обнаружены на поверхности грибов, колонизирующих слизистые оболочки и проникающих в ткани хозяина в процессе распространяющейся инфекции [1, 7, 8].

A. fumigatus секретирует как экзо-, так и эндопротеиназы, относящиеся к аспартильным протеиназам семейства пепсина (Pep), сериновые протеиназы семейства субтилизина (ALP1, ALP2) и металлопротеиназы двух разных семейств (Mer) [2]. Основным секретируемым протеолитическим ферментом *A. fumigatus* является щелочная сериновая протеиназа семейства субтилизина ALP1 (КФ 3.4.21.14) [8–11]. Этот фермент с молекулярной массой 32–33 кДа расщепляет коллаген, фибриноген и эластин, его секреция индуцируется *in vitro* присутствием тех же белков в культуральной среде, и, в соответствии со своими свойствами, он мог бы способствовать инвазии легочной ткани *A. fumigatus*. Косвенные подтверждения этого предположения получены иммунофлуоресцентными исследованиями, которые показали, что анти-ALP1-сыворотка кроликов связывается с грибным мицелием в легких инфицированных мышей [11]. Присутствие ALP1 в легких инфицированных мышей подтверждалось Вестерн-блоттингом экстрактов инфицированных легких [11]. В работе [8] методом ELISA обнаружен высокий титр антител против ALP1 у нескольких больных аспергилло-

Сокращения: PMSF – фенилметилсульфонилфторид; EGTA – диэтилендитрилотетрауксусная кислота; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; TPCK – тозилфенилаланин-хлорометилкетон; TLCK – тозиллизинхлорометилкетон.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-59-74; эл. почта: vnes@ibch.ru).

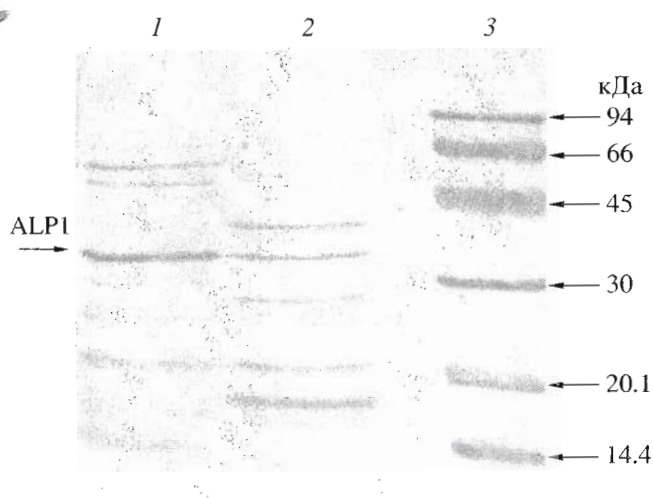


Рис. 1. Электрофорез препаратов внутриклеточной (1) и внеклеточной протеиназы ALP1 (2) из *A. fumigatus* в 12.5% ПААГ в восстанавливающих условиях. 3 – стандартные белки: фосфорилаза В, альбумин, овалбумин, карбоангидраза, ингибитор трипсина, лактальбумин.

мой. Тем не менее, роль этой протеиназы в инфекционном процессе остается невыясненной, так как одиночные (*alp1*, *terp*, *pep1*) и двойные мутанты (*alp1*, *terp*) по генам протеиназ не отличались по патогенности от диких штаммов [12].

Следовательно, имеющиеся на сегодняшний день данные не позволяют объяснить патогенез *A. fumigatus* и роль ALP1 в развитии инфекции. Поэтому необходимы дальнейшее изучение протеиназы ALP1 и поиск ее ингибиторов, которые, в свою очередь, могут быть профилактическим и терапевтическим средством против аспергиллеза [13–15].

Известно, что экстракт миксомицета *Physarum polycephalum* подавляет рост *A. fumigatus*. Это свойство приписывали действию миколазы (миколаза II) – смеси миколитических ферментов, способной лизировать клеточные стенки дрожжей. Такие ферментные смеси были получены также из *Coprinus comatus* (миколаза I) и *Lycoperdon pyriforme* (миколаза III) [16–19]. Они имели низкую токсичность для млекопитающих и излечивали грибковые инфекции у мышей как самостоятельно, так и в сочетании с низкими дозами антимикотических препаратов, например, амфотерицина В (миколаза I и миколаза III). Кроме того, Д.А. Дэвис и А.М. Поуп [16–19] обнаружили в экстракте *P. polycephalum* термоустойчивый ингибитор препарата протеиназ *A. fumigatus*, гидролизующего азоколлаген (неопубликованные результаты). По их данным, ингибитор также обладал противогрибковой активностью. Учитывая все вышесказанное о протеиназе ALP1, мы предположили, что по своим свойствам именно она подходит на роль фер-

мента-мишени для проверки эффекторного действия ингибитора из *P. polycephalum*.

В данной публикации мы сообщаем об удобном способе получения щелочной сериновой протеиназы ALP1 *A. fumigatus*, гидролизующей азоколлаген, и о выделении ее термоустойчивого белкового ингибитора из миксомицета *P. polycephalum*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение протеиназы. Выделение ALP1 из культуральной среды описанным в литературе способом [11, 15] с помощью индукции 0.1% пептоном оказалось неэффективным: в культуральной жидкости обнаруживалось менее 0.3 ед. акт./мл секретируемой протеиназы. Азоколлагенгидролизующая активность обнаруживалась и внутри клеток *A. fumigatus* при их механическом разрушении, но ее выявление серьезно затруднялось сложностью разрушения клеток. Чтобы выяснить, является ли биосинтез протеиназы ALP1 в клетках аспергилла субстратиндуцируемым, и облегчить выделение внутриклеточной протеиназы, мы выращивали культуру *A. fumigatus* на минимальной среде Vogel, используя высокий титр инокуляции, при полном отсутствии в среде каких-либо белков или пептидов, которые могли бы инициировать ее появление. В условиях белкового голода приблизительно на третьи сутки наступал автолиз культуры, и мы определяли азоколлагенгидролизующую активность в полученном автолизате. Оказалось, что автолизат проявляет высокую искомую протеолитическую активность, равную 14 ед. акт./мл. Протеиназная активность в культуральной жидкости до лизиса отсутствовала.

Для того чтобы доказать, что азоколлагенгидролизующий фермент действительно является протеиназой ALP1, мы частично очистили как секретируемый при индукции пептоном внеклеточный фермент (см. выше), так и внутриклеточный фермент, обнаруживаемый в культуральной жидкости после автолиза, посредством фракционирования белков осаждением сульфатом аммония (фракция 40–70% насыщения) и гель-фильтрации на сефадексе G-75, и сравнили их свойства. Активность обоих препаратов протеиназ после очистки составляла приблизительно 250 ед./мг белка. Из электрофореграммы препаратов протеиназ четко видно (рис. 1), что оба они содержат белок, соответствующий по молекулярной массе протеиназе ALP1.

Свойства протеиназы. Оба препарата протеиназы обнаруживали максимальную активность в Трис-HCl- и глицин-NaOH-буферах при pH 8–9 и были неактивными при pH ниже 4 в цитрат-фосфатном буфере (рис. 2), что совпадает с данными относительно pH-зависимости протеиназы ALP1 [8–10].

Для классификации выделенных протеиназ их активность определяли в присутствии специфических ингибиторов протеиназ, хелатирующих агентов, восстанавливающих или алкилирующих реагентов, двухвалентных катионов и растворителей (табл. 1).

Протеиназная активность обоих препаратов полностью подавляется ингибитором сериновых протеиназ PMSF и практически не подавляется EDTA и EGTA, ингибирующими металлопротеиназы. Большинство двухвалентных катионов слабо влияют на активность исследуемых протеиназ. Некоторые различия в степени ингибирования двух препаратов, по-видимому, объясняются разной степенью их очистки, наличием сопутствующих белков. На активности протеиназ не оказывают существенного влияния также такие органические растворители, как этанол и метанол (10%), а также додецилсульфат Na (1%), дитиотреит, 2-меркаптоэтанол и йодацетамид (10 мМ) (не показано в таблице), что свидетельствует об отсутствии субъединиц в белке.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что протеиназы обоих препаратов имеют одинаковые свойства, аналогичные описанным ранее для щелочной сериновой протеиназы ALP1 [8–10, 20, 21]. В этом нас также убеждает исследование их субстратной специфичности (табл. 2), которая полностью совпадает в отношении 12 субстратов. Как секретируемый, так и внутриклеточный ферментный препарат не проявляют активностей эндо-Prо-протеиназы и карбоксипептидазы А, не расщепляют стандартные низкомолекулярные субстраты химотрипсина (ВТЕЕ) и трипсина (ТАМЕ, ВАрНА), но эффективно расщепляют синтетические трехзвенные пептиды. Протеиназы обоих препаратов активно гидролизуют казеин и коллаген, однако практически не содержат эластазной активности (субстрат – Z-Ala-Ala-Leu-pNA).

Мы определили N-концевые аминокислотные последовательности секретируемой и внутриклеточной протеиназ. Для этого белки после SDS-ПААГ-электрофореза переносили с гелевой пластины на PVDF-мембрану с помощью электроблоттинга. Мембрану окрашивали 0.1% раствором Кумасси R-250 и вырезали полосу, соответствующую молекулярной массе 32–33 кДа. Последовательности первых девяти N-концевых аминокислотных остатков обеих протеиназ – Ala-Leu-Thr-Thr-Gln-Lys-Gly-Ala-Pro – были идентичны N-концевой последовательности протеиназы ALP1 [22].

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что мы имеем дело с двумя препаратами одного и того же фермента, а именно – щелочной сериновой протеиназы ALP1. Таким образом, мы получили доказательство конститутивного биосинтеза протеиназы ALP1 в клетке и

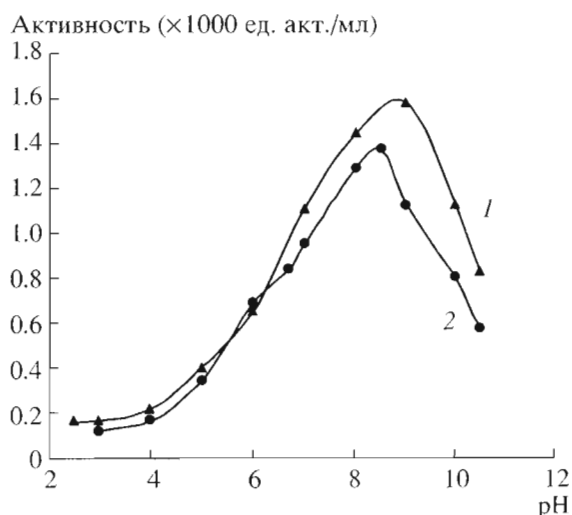


Рис. 2. pH-Зависимость внутриклеточной (1) и секретируемой (2) протеиназы ALP1 *A. fumigatus*.

выделили этот внутриклеточный фермент. Полученный нами препарат внутриклеточной протеиназы, несмотря лишь на частичную очистку, по своим свойствам и по данным электрофореза практически свободен от других известных на данный момент протеиназ *A. fumigatus* [23–25], активных в щелочной области pH и расщепляю-

Таблица 1. Влияние различных соединений на активность ALP1 протеиназ

Реагент	Конечная концентрация, мМ	Остаточная активность протеиназ*, %	
		внутриклеточной	секретируемой
PMSF	0.1; 0.05	0; 0	0; 0
EDTA	10; 5	89; 100	87; 100
EGTA	10; 5	90; 100	100; 100
CuSO ₄	1; 0.1	50; 83	45; 60
MgCl ₂	1; 0.1	86; 92	74; 90
MnCl ₂	1; 0.1	84; 81	89; 94
CaCl ₂	1; 0.1	76; 81	85; 100
FeSO ₄	1; 0.1	71; 80	33; 74
ZnSO ₄	10; 1	0; 63	28; 69
Пепстатин А	10%	83	48
Soybean trypsin inhibitor	50	70	42
TPCK	1; 0.5	87; 100	63; 79
TLCK	1; 0.5	100; 100	50; 75
Тритон X-100	1%	85	91

* Два значения соответствуют двум указанным концентрациям реагента.

Таблица 2. Субстратная специфичность ALP1 протеиназы

Эффективно расщепляемые субстраты
1. Азоказеин
2. Азоколлаген
3. Z-Ala-Ala-Arg-pNA
4. Z-Ala-Phe-Arg-pNA
5. Suc-Ala-Ala-Ala-pNA
6. Suc-Ala-Ala-Phe-pNA
Незначительно или совершенно не расщепляемые субстраты
7. Z-Ala-Ala-Leu-pNA
8. Z-Ala-Ala-Pro-pNA
9. Bz-Arg-pNA (BAPNA)
10. Bz-Tyr-OEt (BTTEE)
11. Tos-Arg-OMe (TAME)
12. Hip-Phe*

* Hip – гишурил.

щих collagen. Небольшое подавление протеиназной активности 10 мМ EDTA может свидетельствовать о примеси металлопротеиназ, но в очень незначительном количестве, так как на электрофореграмме отсутствуют соответствующие полосы белков (82 [23] и 40 кДа [24]). Протеиназа ALP2 отсутствует во внутриклеточном препарате из-за ее чувствительности к условиям автолиза [25]. Очень высокое содержание протеиназы ALP1 в клетках свидетельствует о важной роли этого фермента в процессах жизнедеятельности *A. fumigatus*, а представленный нами способ выделения внутриклеточного фермента – более эффективен и экономичен в сравнении с выделением секретрируемого фермента.

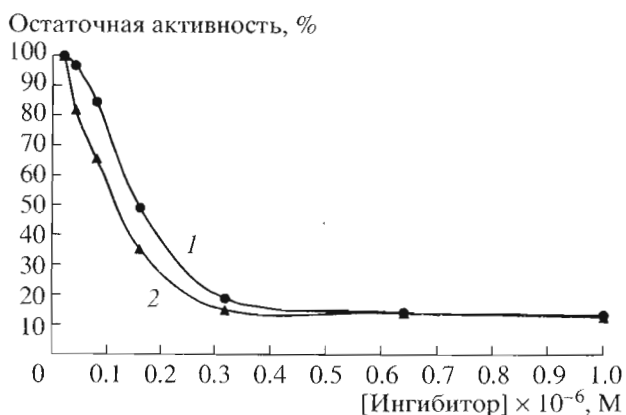


Рис. 3. Остаточная активность внутриклеточной (1) и секретрируемой (2) протеиназы ALP1 при взаимодействии с ингибитором из *P. polycephalum* (30 мин, 37°C).

Выделение ингибитора протеиназы ALP1 и изучение его свойств. Специфические ингибиторы сериновых протеиназ могут быть потенциальным профилактическим и терапевтическим средством против аспергиллеза. Ранее сообщалось [19] о способности экстракта *P. polycephalum* под названием “микозаза” оказывать фунгицидное действие как самостоятельно, так и в сочетании с амфотерицином В, которое объясняли присутствием в препарате хитиназы, β -1,3-глюканазы и экзо-гликозидазы, разрушающих грибные клеточные стенки. Поэтому нам было интересно оценить влияние экстракта *P. polycephalum* на конкретный фермент протеиназу ALP1, предположительно участвующую в патогенезе.

Мы получили экстракты ингибиторов из двух диких штаммов *P. polycephalum* VKMF 9273 и МЗСVII, имеющих независимое происхождение. Полученные образцы проявляли полностью идентичные свойства, подавляя активность протеиназы ALP1 обоих ферментных препаратов. Способность экстракта *P. polycephalum* ингибировать протеиназу сохранялась и после его прогрева (85°C), то есть не была связана с микозазой, дезактивируемой таким воздействием. Мы предположили, что в экстракте *P. polycephalum* содержится термостойчивый ингибитор протеиназы ALP1.

На рис. 3 продемонстрировано влияние ингибитора на активность протеиназы ALP1. Препараты протеиназы предварительно инкубировали с возрастающими количествами ингибитора, а затем определяли их остаточную протеолитическую активность. В связи с тем, что препараты ингибитора и протеиназ не были гомогенными, в расчетах учитывали истинное содержание белка, оцененное с помощью электрофореза. Было выявлено, что ингибитор подавляет активность протеиназы ALP1, и значение IC_{50} в выбранных условиях составляет 0.14 мкМ. Для сравнения следует сказать, что величина K_i для ингибитора субтилизина, выделенного из *Streptomyces albogriseolus*, в отношении протеиназы ALP1 из *A. fumigatus* составляет 1.1 нМ.

Очистка ингибитора из *P. polycephalum* включала центрифугирование культуры, инкубирование при 85°C в течение 30 мин, осаждение ацетоном, концентрирование, ионообменную хроматографию на DEAE-сефарозе и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Nucleosil 300-5C₁₈ (см. табл. 3).

При центрифугировании мы избавлялись от клеточной массы *P. polycephalum* и получали вязкую жидкость темно-коричневого цвета. Чтобы инактивировать присутствующие ферменты, надосадочную жидкость прогревали в термостате. Для осаждения полисахаридов и, как следствие, снижения вязкости экстракта использовали охлажденный ацетон. Концентрирование полученного препарата проводили на роторном испарите-

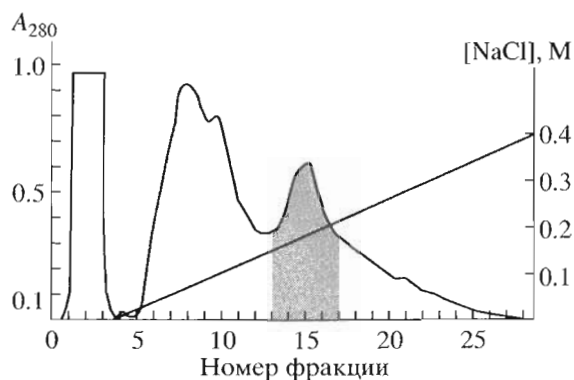


Рис. 4. Ионообменная хроматография ингибитора из *P. polycephalum* на DEAE-сефарозе CL-6B (25 × 60 мм) в линейном градиенте концентрации NaCl в (0–0.4 М). Объем фракций 10 мл. Выделена цветом активная фракция.

ле и ультрафильтрацией через мембрану YM5 “Amicon”. Полученный таким образом препарат был сконцентрирован (по объему) приблизительно в 40 раз.

После диализа концентрированный препарат наносили на колонку DEAE-сефарозы CL-6B (рис. 4). Связанный белок элюировали раствором NaCl в линейном градиенте концентрации 0–0.4 М. Фракции, проявляющие активность ингибитора, выходили при 0.18–0.23 М NaCl. На этой стадии мы достигли 6–7-кратной очистки.

Очистку обращенно-фазовой ВЭЖХ проводили как на C_{18} -, так и на C_8 -колонках. Более четкое разделение мы получили на колонке C_{18} (рис. 5). Активные фракции выходили при концентрации ацетонитрила 37–43%. Был получен практически бесцветный препарат ингибитора с активностью приблизительно 90 ед./мг и очищенный приблизительно в 90 раз (см. табл. 3).

Мы определили молекулярную массу ингибитора после DEAE-сефарозы. Для предварительной оценки молекулярной массы был использован метод ВЭЖХ на гель-фильтрационной колонке TSK-gel G2000SW, предварительно откалиброванной стандартной смесью белков. Каждую фракцию тестировали на наличие ингибирующей активности. Пик активности на хроматограмме (см. рис. 6) элюируется между маркерами с молекулярными массами 17 и 43 кДа и соответствует области 30–35 кДа. Эти результаты были подтверждены данными SDS-электрофореза в ПААГ в восстанавливающих условиях (рис. 7). Была уточнена молекулярная масса ингибитора (32–33 кДа) и, кроме того, установлена мономерность его структуры.

Поскольку сериновая протеиназа ALP1 относится к субтилизиновому семейству [22], ее активность подавляется ингибитором субтилизина из *St. albogriseolus* [26]. Представлялось интересным проверить, будет ли наш ингибитор подавлять ак-

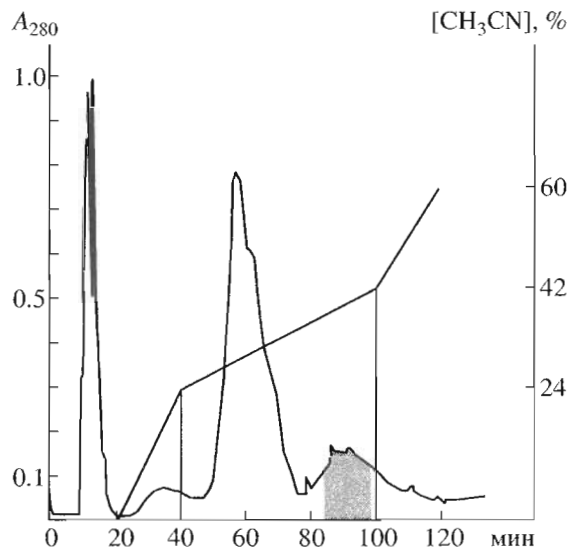


Рис. 5. Хроматографическая очистка ингибитора из *P. polycephalum* методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil 300-5C₁₈ (4 × 250 мм). Изократическая элюция водным раствором 5% ацетонитрила с 0.1% TFA в течение 20 мин с последующей элюцией ступенчатым градиентом ацетонитрила (5–60%) с 0.1% TFA. Скорость элюции 0.5 мл/мин. Выделена цветом активная фракция.

тивность субтилизина. Оказалось, что исследуемый ингибитор не влияет на активность субтилизина в отношении азоказеина в качестве субстрата (данные не приведены). Значит, ингибитор из *P. polycephalum* селективен в отношении лишь отдельных ферментов субтилизинового семейства.

Мы исследовали влияние ингибитора из *P. polycephalum* на протеиназу вируса ВИЧ-1. Этот фермент играет ключевую роль в жизненном цикле вируса, поскольку осуществляет процессинг структурных белков и ферментов зрелого вируса. Достаточно одной мутации, инактивирующей протеиназу, чтобы блокировать инфекционность вируса [27]. Поэтому протеиназа ВИЧ-1 является излюбленной мишенью при создании антивирусных препаратов. По данным кристаллографии, аспартильная протеиназа ВИЧ-1 представляет собой гомодимер, содержащий два остатка аспарагиновой кислоты в своем активном центре [28]. Мы получили данные, свидетельствующие о том, что препараты выделенного нами ингибитора (после стадии хроматографии на колонке DEAE-сефарозы) способны подавлять активность ВИЧ-1-протеиназы, полученной в лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН [29] (рис. 8).

Таким образом, ингибитор из *P. polycephalum* весьма интересен тем, что подавляет активность протеиназ, принадлежащих к разным видам: протеиназу ALP1 (сериновая) и ВИЧ-1-протеиназу (аспартильная). Значение IC_{50} для ингибитора в от-

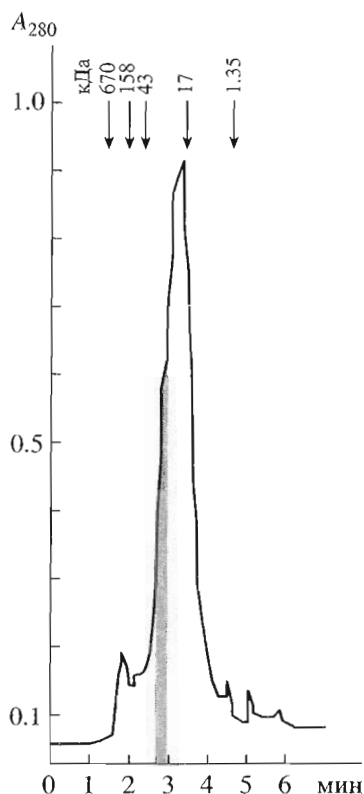


Рис. 6. Аналитическая гель-фильтрация ингибитора из *P. polycephalum* на колонке TSK-gel G2000SW (7.5 × 600 мм). Элюция в 0.05 М фосфатном буфере, рН 7.2, при скорости 0.5 мл/мин. Объем фракций 1 мл. Стрелками показаны положения стандартных белков (слева направо): тироглобулин, γ -глобулин, овальбумин, миоглобин, цианкобаламин. Выделена цветом активная фракция.

ношении ВИЧ-1-протеиназы составляет 2.5 мкМ, что более чем на порядок превышает значение IC_{50} при подавлении активности протеиназы ALP1.

Многие ингибиторы протеиназ разных видов обладают антигрибковой активностью [30–33], хотя механизм их действия не выяснен. Все эти ингибиторы имеют растительное происхождение. В частности, ингибиторы сериновых протеиназ выделены из зерен кукурузы, пшеницы, ячменя и из такусы. До сих пор не было публикаций о получении ингибиторов из миксомицета *P. polycephalum*. Как уже говорилось выше, препараты миколазы II, полученные из *P. polycephalum*, обладают фунгицидной активностью [18, 19]. По нашим наблюдениям, плазмодий *P. polycephalum* подавляет рост *A. fumigatus*. Поэтому мы проверили влияние очищенных препаратов ингибитора протеиназы ALP1 (предположительно, играющей роль в патогенезе аспергилла) на прорастание спор и развитие гиф у *A. fumigatus*. Для этого споры *A. fumigatus* в концентрации 10^3 колонии образующих частиц на 1 мл инкубировали при 30°C в среде RPMI

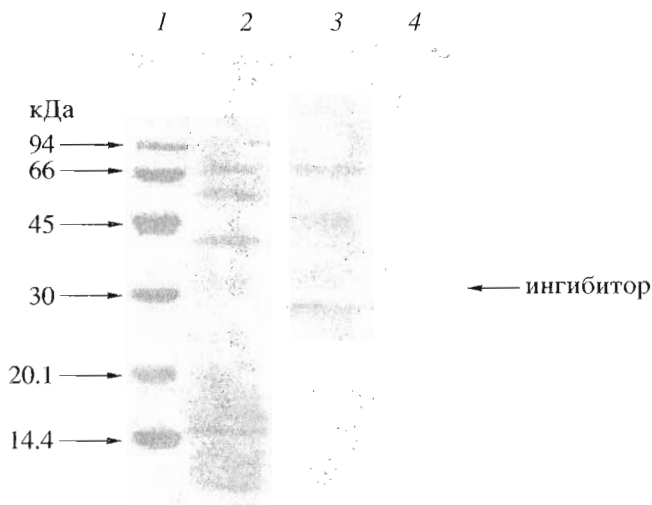


Рис. 7. Электрофорез препаратов ингибитора из *P. polycephalum* в 12.5% ПААГ в восстанавливающих условиях на разных стадиях очистки. 1 – стандартная смесь белков; 2 – супернатант после осаждения ацетоном; 3 – после хроматографии на DEAE-сефарозе CL-6B; 4 – после хроматографии на обращенно-фазовой колонке Nucleosil 300-5C₁₈.

с препаратами ингибитора (1–10 ед./мл). Микроскопическое наблюдение не выявило каких-либо различий в прорастании спор и развитии гиф в присутствии ингибитора и в его отсутствие. Не обнаружено также усиления фунгицидного действия на споры *A. fumigatus* известного препарата амфотерицина В при его сочетании с ингибитором в различных концентрациях.

Таким образом, мы не смогли получить доказательства антигрибковой активности ингибитора. Возможно, это связано с тем, что использованные нами концентрации ингибитора были недостаточными для полного подавления активности протеиназы ALP1. В то же время это может свидетельствовать о том, что протеиназа ALP1 не играет главную роль в развитии инфекции *A. fumigatus*. Тем не менее, четкое фунгицидное действие, которое проявляет *P. polycephalum* в отношении аспергилла делает перспективным дальнейшее исследование этих организмов, которое поможет пониманию процесса развития инфекции у *A. fumigatus*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штамм *A. fumigatus* дикого типа, который был получен из коллекции Лондонского госпиталя университетского колледжа и поддерживался на косяках с мальтозным экстрактом (malt extract agar, Sigma). Штамм *P. polycephalum* VKM F9273 из Всероссийской коллекции микроорганизмов был предоставлен С.И. Бейлиной (Пушино, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН), а штамм МЗСVII полу-

чен из коллекции Института биофизики и физической биохимии ФРГ. Оба штамма поддерживали на агаризованной среде Даниэля [34]. Рекомбинантная ВИЧ-1-протеиназа была получена в лаборатории химии протеолитических ферментов Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН [29]. Также в работе были использованы следующие реактивы и материалы: пептон, триптон, дрожжевой экстракт (Life Technologies Gibco BRL, Шотландия); азоколлаген, йодацетамид, MES, PMSF, TPCK, TLCK, Тритон X-100, EDTA, EGTA, TFA, CaCl₂ (Sigma, США); додецилсульфат натрия, TEMED, азоказеин, пепстатин А, soybean trypsin inhibitor (Serva, США); меркаптоэтанол, акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, бычий сывороточный альбумин (Amresco, США); Кумасси R-250 (Fluka, Швейцария); персульфат аммония, стандартная смесь белков для гель-фильтрации (Bio-Rad, США); Трис, MgCl₂, ацетонитрил, метанол (Merck, Германия); стандартная смесь белков для электрофореза, сефадекс G-75, DEAE-сефароза CL-6B (Pharmacia, Швеция); 3-[циклогексиламино]-1-пропансульфоновая кислота (CAPS, Calbiochem, США); глицин (ICN, Бельгия); MnCl₂ (Aldrich, США); мембрана Immobilone PVDF (Millipore, США); (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, лимонная и уксусная кислоты ("ос. ч.", Россия).

Выделение протеиназы ALP1 из *A. fumigatus*.

Для выделения секретируемой протеиназы из *A. fumigatus* использовали ранее предложенный метод [10] с добавлением в среду выращивания культуры 0.1% пептона. Культуру выращивали в течение 3 сут. Затем мицелий гриба фильтрованием отделяли от культуральной жидкости, из которой и выделяли протеиназу, как описано ниже. Содержание секретируемой протеиназы в культуральной жидкости не превышало 0.3 ед. акт./мл.

При выделении внутриклеточной протеиназы культуру выращивали в жидкой минимальной среде Vogel [35], при полном отсутствии каких-либо белков или пептидов, которые могли бы индуцировать секрецию протеиназы. Посевным материалом служила суспензия конидий в физиологическом растворе, полученная смывом с 10-суточных культур на косяках мальтозного агара. Для засева одной колбы использовали конидии с 3 косяков. Выращивание проводили в колбах объемом 750 мл с 150–200 мл среды на качалках (200 об/мин) при 30°C. При выращивании в описанных условиях, обычно по истечении 3 суток, происходил автолиз культуры аспергилла, чтобы избавиться от клеточного дебриса полученный автолизат центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и затем использовали для выделения протеиназы. Содержание протеиназы в автолизате составляло не менее 14 ед. акт./мл. Далее очистка обоих препаратов протеиназы была одинаковой и включала фракционирование белков осаждением сульфа-

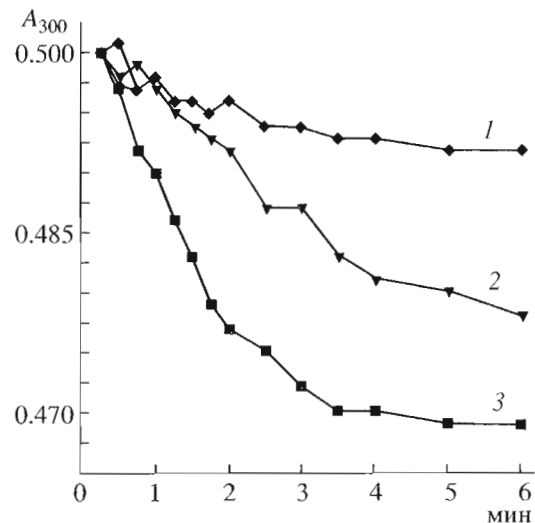


Рис. 8. Изменение активности ВИЧ-протеиназы (0.1 мкМ) в присутствии ингибитора из *P. polycephalum* в концентрации 3 мкМ (1), 1.1 мкМ (2) и без ингибитора (3).

том аммония (фракция 40–70% насыщения) и гель-фильтрацию на сефадексе G-75 (1.5 × 38 см) в 50 мМ Трис-НСl-буфере рН 7.4 при скорости элюции 10–12 мл/час. Фракции объемом 2 мл тестировали на наличие протеолитической активности, после чего активные фракции объединяли, концентрировали в ячейках "Амикон" и хранили при –20°C. Протеолитические активности после последней стадии очистки протеиназ составляли приблизительно 250 ед. /мг белка.

Исследование протеиназной активности

1. Определение протеиназной активности. В качестве субстрата при определении протеиназной активности использовали азоколлаген (Sigma). За основу был взят метод, предложенный ранее [36]. Суспензию азоколлагена в 300 мкл 50 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7.0 (концентрация азоколлагена 10 мг/мл) инкубировали с образцами протеиназы (0.5–0.7 мкМ) на качалке в течение 60 мин при 37°C. Смесь центрифугировали при 8000 g в течение 3 мин, поглощение свободного красителя определяли в каждой пробе при 540 нм. За 1 ед. акт. принимали такое количество фермента, которое в описанных условиях увеличивает поглощение при 540 нм на 1 ОЕ.

2. Исследование рН-зависимости протенназ проводили в диапазоне рН 2.5–10.5. Использовали следующие буферные растворы: 0.1 М цитрат-Na₂HPO₄ (рН 2.5–7), 0.1 М Трис-НСl (рН 7–9), 0.1 М глицин-NaOH (рН 8–10.5).

3. Гидролиз синтетических пептидов и азоказеина оценивали ранее предложенными методами [8]. Тестирование активностей химотрипсина, трипси-

на, карбоксипептидазы А выполняли стандартными методами, рекомендуемыми в каталоге Worthington.

4. Влияние низкомолекулярных веществ на активность протеиназы ALP1 (табл. 1) оценивали вышеописанным методом (пункт 1) с предварительной инкубацией протеиназы и испытуемого вещества в течение 30 мин при 37°C.

Выделение ингибитора протеиназ из *P. polycephalum*. Культуру *P. polycephalum* штамма VKMF 9273 или M3CVII (2 л) выращивали в жидкой среде Даниэля [34]. Засев производили в колбы Эрленмейера, которые помещали на качалку в темном помещении при температуре 24°C на 10–15 сут. После появления в культуральной жидкости ингибирующей активности (определение см. ниже) клеточную массу отделяли центрифугированием при 1600 g в течение 15 мин, осадок отбрасывали, а супернатант инкубировали в термостате в течение 30 мин при 80–85°C. Надосадочную жидкость охлаждали, помещали в ледяную баню и постепенно при перемешивании приливали равный объем ацетона, предварительно охлажденного до –25°C. Осадок снова удаляли центрифугированием и с помощью вакуумного испарителя уменьшали объем препарата в 3–3.5 раза. Полученный экстракт концентрировали, используя ячейки “Amicon” с мембраной YM5, диализовали против 2 л 10 mM Na-цитратного буфера pH 4.0 в течение 22 ч с одной сменой буфера и использовали для дальнейшей очистки.

Концентрированный и диализованный препарат (40 мл) наносили на колонку (25 × 60 мм) с DEAE-сефарозой CL-6B, предварительно уравновешенную 10 mM Na-цитратным буфером pH 4.0; промывали тем же буфером, а затем элюировали связавшиеся белки раствором NaCl в линейном градиенте концентрации 0–0.4 M в том же буфере

со скоростью 40–60 мл/ч. Собирали фракции объемом 10 мл. Фракции, проявляющие максимальную ингибирующую активность, объединяли, концентрировали до 5 мл в ячейке “Amicon” через мембрану YM5 и диализовали против 2 л дистиллированной воды в течение ночи при 4°C.

Концентрированный образец объемом 1–2 мл с 5% CH₃CN наносили на колонку Nucleosil 300-5C₁₈ (Macherey-Nagel). Колонку промывали 5% CH₃CN с 0.1% TFA в воде. Связавшиеся белки элюировали ступенчатым градиентом концентрации CH₃CN (5 до 60%) в 0.1% TFA при скорости 0.5 мл/мин. Собранные фракции (1 мл) высушивали на Speed Vac Concentrator, растворяли в воде и тестировали на наличие ингибирующей активности. Результаты очистки см. табл. 3.

Определение молекулярной массы ингибитора осуществляли методом ВЭЖХ на гель-фильтрационной колонке TSK-gel G2000SW (Япония), предварительно откалиброванной стандартной смесью белков (Bio-Rad) (тироглобулин – 670, γ-глобулин – 158, овальбумин – 43, миоглобин – 17, цианкобаламин – 1.35 кДа) в 0.05 M фосфатном буфере, pH 7.2, при скорости 0.5 мл/мин, определяя активность ингибитора в каждой фракции объемом 1 мл.

Определение активности ингибитора. К препарату протеиназы (0.5–0.7 мкМ) добавляли от 3 до 100 мкл ингибитора (в зависимости от степени очистки), смесь преинкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего определяли остаточную активность протеиназы описанным выше способом. За 1 ед. акт. ингибитора принимали такое количество препарата, которое в результате взаимодействия с протеиназой приводит к снижению на 1 OЕ₅₂₀ значения поглощения, полученного при инкубации протеиназы *A. fumigatus* с суспензией азоколлагена в таких же условиях в отсутствие ингибитора.

Таблица 3. Очистка ингибитора из *P. polycephalum* (2 л культуры)

Стадии очистки	Общее содержание белка, мг	Общая ингибирующая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Выход по активности, %
1. Культуральная жидкость	6656	7143	1.07	100
2. Центрифугирование	5705	6227	1.09	87.2
3. Осаждение ацетоном и концентрирование*	2980	4261.1	1.43	59.6
4. DEAE-сефароза CL-6B	142	1015.3	7.15	14.2
5. Обращенно-фазовая ВЭЖХ Nucleosil 300-5C ₁₈	1	93	93	1.3

* Непосредственно после осаждения ацетоном из-за высокой степени разбавления экстракта активность ингибитора достоверно не тестируется, поэтому она определялась после концентрирования.

Электрофорез в ПААГ в восстанавливающих условиях и электроблоттинг препаратов ингибитора и протеиназы. Электрофорез белков проводили в 12.5% ПААГ в восстанавливающих условиях по стандартной методике Лэммли [37]. В качестве стандартов использовали смесь белков (Pharmacia): фосфорилаза В – 67, альбумин – 66, овалбумин – 45, карбоангидраза – 30, ингибитор трипсина – 20.1, лактальбумин – 14.4 кДа.

Электроперенос белков осуществляли на мембрану Immobilon PVDF в 10 mM CAPS в 10% метаноле, pH 11.0 в течение 30–40 мин при силе тока 5 mA/cm². Полосы белков, окрашенные 0.1% Ку-масси R-250 в 50% метаноле, использовали для определения N-концевой аминокислотной последовательности на секвенаторе Procise 494cLC (Applied Biosystems).

Активность ингибитора оценивали по уменьшению активности ВИЧ-1-протеиназы при расщеплении синтетического пептидного субстрата Lys-Ala-Arg-Val-Nle-Phe(NO₂)-Glu-Ala-Nle-NH₂. Для измерения активности ВИЧ-1-протеиназы к 450 мкл буфера (20 mM MES, pH 6.25, 5 mM β-меркаптоэтанол, 4 mM EDTA, 1 M NaCl) добавляли водный раствор субстрата (5 мг/мл) до конечной концентрации 0.1 mM и инкубировали 3 мин при 37°C. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл раствора ВИЧ-1-протеиназы (конечная концентрация активного фермента 1 × 10⁻⁷ M) и 10–100 мкл (конечная концентрация (2 – 20) × 10⁻⁷ M) раствора ингибитора. Использовали препарат ингибитора после стадии очистки на DEAE-сефарозе CL-6B. Фермент и ингибитор предварительно инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Регистрировали уменьшение оптического поглощения раствора при длине волны 300 нм. В качестве контроля использовали реакцию расщепления субстрата этой протеиназой в отсутствие ингибитора.

Оценка влияния ингибитора на рост мицелия *A. fumigatus*. За основу был взят метод, предложенный Бартински-Гарсиа и Липпманом [38]. Мицелий аспергилла, выращенный на пептонно-дрожжевой среде, измельчали и помещали в лунки иммунологического планшета. Различные количества ингибитора и амфотерицина В добавляли в лунки с мицелием и инкубировали в термостате в течение 1–2 сут при 30°C. За развитием мицелия наблюдали микроскопически.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [39] и используя Bio-Rad Protein Assay Kit I (Bio-Rad Corp.) с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С.И. Бейлиной (Институт теоретической и эксперимен-

тальной биофизики РАН, Пущино) за предоставленный штамм *P. polycephalum*, Ю.Ф. Леоновой (Институт биоорганической химии РАН) за определение N-концевых аминокислотных последовательностей протеиназ и Л.Д. Румшу (Институт биоорганической химии РАН) за консультативную помощь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bodey G.P., Vartivarian S. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989. V. 8. P. 413–437.
2. Monod M., Capoccia S., Lechenne B., Zaugg Ch., Holdom M., Jousson O. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 292. P. 405–419.
3. Borg M., Ruchel R. // Infect. Immun. 1988. V. 56. P. 626–631.
4. Colina A.R., Aumont F., Deslauriers N., Belhumeur P., Re-pentigny L. // Infect. Immun. 1996. V. 64. P. 4514–4519.
5. Fallon K., Bausch K., Noonan J., Huguenel E., Tamburini P. // Infect. Immun. 1997. V. 65. P. 551–556.
6. Kothary M.H., Chase T., Macmillan J.D., Jr. // Infect. Immun. 1984. V. 43. P. 320–325.
7. Schonheyder H. // Scand. J. Infect. Dis. 1987. V. 51. P. 1–62.
8. Reichard U., Buttner S., Eiffert H., Staib F., Ruchel R. // J. Med. Microbiol. 1990. V. 33. P. 243–251.
9. Froscio M., Chase T., Macmillan J.D., Jr. // Infect. Immun. 1992. V. 60. P. 728–734.
10. Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse D., Tronchin G. // FEBS Lett. 1992. V. 308. P. 65–69.
11. Moutaouakil M., Monod M., Prevost M.C., Bouchara J.P., Paris S., Latge J.P. // J. Med. Microbiol. 1993. V. 39. P. 393–399.
12. Monod M., Paris S., Sarfati J., Jaton-Ogay K., Ave P., Large J.P. // FEBS Microbiol. Lett. 1993. V. 106. P. 39–46.
13. Neely A.N., Miller R.G., Holder I.A. // Infect. Immun. 1994. V. 62. P. 58–64.
14. Dash Ch., Ahmad A., Nath D., Rao M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2001. V. 45. P. 2008–2017.
15. Bouchara J.P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G., Chabasse D. // FEMS Immun. Med. Microbiol. 1993. V. 7. P. 81–92.
16. Davies D.A. Method for Treating Fungal Infections Using cell Lytic Enzymes: United States Patent 4,062,941. 1977.
17. Davies D.A., Pope A.M. // Nature. 1978. V. 273(5659). P. 235–236.
18. Pope A.M., Davies D.A. // Postgrad. Med. J. 1979. V. 55(647). P. 674–676.
19. Chalkley L.J., Trinci A.P., Pope A.M. // Sabouraudia. 1985. V. 23. P. 147–164.
20. Bouchara J.P., Larcher G., Annaix V., Bucher P., Tronchin G., Chabasse D. // J. Mycol. Med. 1991. V. 1. P. 105–111.
21. Kunert J., Kopecek P. // Mycoses. 2000. V. 43. P. 339–347.
22. Jaton-Ogay K., Suter M., Crameri R., Falchetto R., Fatih A., Monod M. // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 71. P. 163–168.
23. Ibrahim-Granet O., D'Enfert Ch. // Microbiology. 1997. V. 143. P. 2247–2253.

24. Monod M., Paris S., Sanglard D., Jaton-Ogay K., Bille J., Latge J.P. // *Infect. Immun.* 1993. V. 61. P. 4099–4104.
25. Reichard U., Cole G.T., Hill T.W., Ruchel R., Monod M. // *Int. J. Med. Microbiol.* 2000. V. 290. P. 549–558.
26. Markaryan A., Beall C.J., Kolattukudy P.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 220. P. 372–376.
27. Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A., Davis L.J., Heimbach J.C., Dixon R.A.F., Scolnick E.M., Sigal I.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 4686–4690.
28. Meek T.D., Dayton B.D., Metcalf B.W., Dreyer G.B., Strickler J.E., Gorniak J.G., Rosenberg M., Moore M.L., Magaard V.W., Debouck Ch. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 1841–1845.
29. Dergousova N.I., Amerik A.Yu., Volynskaya A.M., Rumsh L.D. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996. V. 61. P. 97–107.
30. Selitrennikoff C.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 2883–2894.
31. Sanchez de la Hoz, Castagnaro P.A., Carbonero P. // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 26. P. 1231–1236.
32. Gourinath S., Alam N., Srinivasan A., Betzel C., Singh T.P. // *Acta Crystallogr.* 2000. V. 56. P. 287–293.
33. Schimoler-O'Rourke R., Richardson M., Selitrennikoff C.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 2365–2366.
34. Daniel J.W., Baldwin H. // *Methods in Cell Physiology* / Ed. Prescott D.M. New York: Acad. Press, 1964. V. 1. P. 9–44.
35. Peberdy J.F., Moore P.M. // *J. Gen. Microbiol.* 1975. V. 90. P. 228–236.
36. Chavira R., Burnett T.J., Jr., Hageman J.H. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. P. 446–450.
37. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
38. Bartnicki-Garcia S., Lippman E. // *J. Gen. Microbiol.* 1966. V. 42. P. 411–416.
39. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.

Isolation and Characterization of the ALP1 Protease from *Aspergillus fumigatus* and Its Protein Inhibitor from *Physarium polycephalum*

D. A. Davies**, N. A. Kalinina*, L. V. Samokhvalova*, G. V. Malakhova*,
G. Scott**, G. Venning**, A. M. Volynskaya*, and V. A. Nesmeyanov**

Phone/fax: +7 (095) 330-5974; e-mail: vnes@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** London Hospitals, Department of Clinical Microbiology,
University College, Grafton Way, London, United Kingdom

It is known that *Aspergillus fumigatus* secretes a serine protease ALP1 of the subtilisin family in the presence of extracellular protein substrates. We found conditions of *A. fumigatus* culturing that provide a high ALP1 activity inside cells without induction by extracellular proteins. The identity of the properties of the secreted and intracellular enzymes was shown. A thermostable protein inhibitor of the ALP1 protease was isolated from the plasmodium of the myxomycete *Physarium polycephalum*. Its molecular mass is 32–33 kDa. The inhibitor inhibits the ALP1 protease activity with IC_{50} of 0.14 μ M. This protein was also shown to be a less efficient inhibitor of the activity of HIV-1 protease (IC_{50} 2.5 μ M). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: ALP1 serine protease, *Aspergillus fumigatus*, HIV-1 protease, *Physarium polycephalum*, protein inhibitor of proteases