УДК 57.088.3:577.152.344

ОЧИСТКА ПРОТЕАЗЫ – АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, ПРОДУЦИРУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ

Aspergillus ochraceus BKM F-4104D

© 2020 г. С. К. Комаревцев¹, Е. А. Попова¹, В. Г. Крейер¹, К. А. Мирошников², А. А. Осмоловский^{1, *}

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2019 г. После доработки 23.08.2019 г. Принята к публикации 30.08.2019 г.

Разработан метод очистки протеазы — активатора протеина С плазмы крови человека из культуральной жидкости микромицета Aspergillus ochraceus BKM F-4104D. Свойства этого белка близки свойствам активатора протеина С из яда змеи Agkistrodon contortrix contortrix, который используется в современной лабораторной диагностике протеина С. Метод представляет собой комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии. В результате был получен высокоочищенный препарат активатора протеина С, удельная активность которого в процессе очистки возросла более чем в 350 раз.

Ключевые слова: активатор протеина С, хроматография, протеазы микромицетов

DOI: 10.31857/S0555109920010092

Протеин С – витамин-К-зависимый антикоагулянтный белок, образующийся главным образом в печени и эндотелии в форме неактивного одноцепочечного профермента. Активная форма протеина С образуется в результате ограниченного протеолиза профермента под действием комплекса тромбина с тромбомодулином и представляет собой сериновую протеазу. Функция активной формы протеина С заключается в ингибировании процесса свертывания крови за счет стимуляции фибринолиза и прерывания тромбиногенеза [1-3]. Вследствие важной физиологической роли протеина С в медицине существуют различные методы определения его функциональной активности, необходимые для диагностики ряда заболеваний системы гемостаза и их своевременной профилактики. В основе подавляющего большинства этих методов лежит использование активаторов протеина С из яда змей, чаще всего - южноамериканского медноголового щитомордника Agkistrodon contortrix contortrix [4, 5]. Ограниченная доступность ключевого компонента препятствует более широкому использованию диагностических методов в практике.

Ранее было показано, что ряд штаммов микромицета Aspergillus ochraceus секретирует протеазы, обладающие способностью активировать протеин С. Эти белки по ряду свойств сходны с активаторами, получаемыми из змеиного яда [6–8]. В частности, они обладают высокой тромбино- и плазминоподобной активностями и специфически расщепляют соответствующие хромогенные пептидные субстраты. Поэтому активаторы протеина С, продуцируемые микромицетами A. ochraceus, могут рассматриваться как потенциально более доступные аналоги активаторов из змеиного яда [9, 10].

В связи с этим становится актуальной проблема выделения и очистки активатора протеина С из культуральной жидкости *А. ochraceus*. Метод изоэлектрофокусирования, использованный для выделения активатора в ряде работ [8—10], позволяет получать небольшие количества высокоочищенного препарата, однако он трудно масштабируем и не может быть внедрен в промышленное производство. Разработанный ранее способ хроматографической очистки протеаз *А. ochraceus* основан на использовании труднодоступных носителей сочетанного действия с невысокой воспро-

изводимостью и не обеспечивает достаточной степени очистки конечного продукта [11].

Цель работы — разработка способа очистки активатора протеина С из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* BKM F4104D с использованием современных хроматографических носителей.

МЕТОДИКА

Продуцент и условия культивирования. Использовали изученный ранее [8-10] штамм микромицета A. ochraceus BKM F-4104D, продуцирующий протеазу-активатор протеина С. Культивирование микромицета проводили в две последовательные стадии, выращивая его на посевной (состав в %: сусло -6.7, глюкоза -1, пептон -0.1, рН 5.5-6.0) и ферментационной средах (состав в %: глюкоза — 3.5, гидролизат рыбной муки — 1, NaCl — 0.2, крахмал -0.125, пептон -0.1, $KH_2PO_4 - 0.05$, $MgSO_4 - 0.05$, pH 5.5-6.0). Инокулят, получаемый смыванием посевной средой спор микромицета, выращенного в течение 7 сут на скошенном сусло-агаре 3°Б, вносили в посевную среду и культивировали в течение 2 сут, после чего часть биомассы переносили в ферментационную среду и культивировали ещё 2 сут. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, на орбитальной качалке при 200 об./мин при 28°C [12].

Фракционирование культуральной жидкости. После окончания культивирования мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу ("ФС", Россия). Протеазу-активатор протеина С осаждали из полученного фильтрата сульфатом аммония, подбирая оптимальную для осаждения белка степень его насыщения [13, 14]. Для этого к аликвотам культуральной жидкости медленно добавляли кристаллический сульфат аммония, получая различные степени насыщения: 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75 и 0.8 (за насыщенный раствор принимали 4.1 М раствор сульфата аммония, содержащий 767 г соли на 1 л), инкубировали в течение 12 ч при 4°C, после чего осадок отделяли центрифугированием при 15000 g на Роторе ЈА-20 ("Beckman J2-21", Германия) в течение 20 мин. Для определения оптимальной для осаждения белка степени насыщения сульфатом аммония в супернатантах измеряли остаточную активность целевого белка.

Гидрофобная хроматография. Полученный при осаждении из культуральной жидкости белок, содержащий активатор протеина С, растворяли в 50 мМ Трис-HCl-буфере, рН 8.0, содержавшем сульфат аммония 0.35 степени насыщения, центрифугировали для удаления не растворившихся белков при 15000 g в течение 20 мин, после чего

супернатант наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-4B ("GE Healthcare", США), уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили градиентом концентрации сульфата аммония в 50 мМ Трис-HCl-буфере, pH 8.0, от степени насыщения 0.35 до 0 [15, 16].

Ионообменная хроматография. Полученные после гидрофобной хроматографии активные компоненты, содержащие активатор протеина С, объединяли и наносили для дальнейшей очистки на колонку с ДЭАЭ-сефарозой ("GE Healthcare", Швеция), предварительно уравновешенной 50 мМ Трис-HCl-буфером, рН 8.0. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1.0 М в стартовом буфере [17, 18].

Гель-фильтрация. Обогащенные целевым белком компоненты, полученные после ионообменной хроматографии, объединяли и концентрировали центрифугированием на мембранном фильтре Millipore ("Merck", Германия), после чего наносили для дальнейшей очистки на колонку с Сефадексом G-50 ("Pharmacia", Швеция), уравновешенную 50 мМ Трис-HCl-буфером, рН 8.0. Элюцию проводили тем же буфером. Активные очищенные фракции, содержащие протеазу-активатор протеина С, объединяли для дальнейшего анализа [19, 20].

Определение протеолитической активности. Ферментативную активность активатора протеина С определяли по реакции специфического расщепления бесцветного хромогенного пептидного субстрата *п*-нитроанилида тозил-глицил-пролил-аргинина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), сопровождающегося накоплением свободного n-нитроанилина, окрашенного в желтый цвет. Для качественного определения активности в хроматографических фракциях, соответствующих максимумам поглощения при 280 нм, использовали дот-метод на парафильме. Для этого к 20 мкл 50 мМ Трис-НСІ-буфера, рН 8.0, содержавшего 5 мМ CaCl₂, добавляли по 20 мкл фермента и субстрата и визуально оценивали интенсивность окраски смеси против контроля, в который вместо субстрата вносили буфер [9, 10].

Количественное измерение активности проводили с использованием планшетного спектрофотометра "Wallac 1420" ("PerkinElmer", Финляндия) при 405 нм. Реакцию проводили в 50 мМ Трис-HCl-буфере, рН 8.0, содержавшем 5 мМ СаСl₂, при 37°С. К 50 мкл раствора фермента добавляли 50 мкл раствора субстрата (0.5 мг/мл), инкубировали 1 мин в описанных выше условиях и останавливали реакцию добавлением 100 мкл 50%-ной уксусной кислоты. За единицу ферментативной активности (ед.) принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль субстрата за

Стадия очистки	Объем, мл	Концент- рация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг	Удельная активность, ед./мг		Суммарная активность, ед.	Выход по актив- ности, %
Культуральная жидкость	740	5.7	4218	0.02	1	84	100
Гидрофобная хроматография	35	0.7	24.5	2	100	49	58
Ионообменная хроматогра-		5.6		5.5	275	31	37
фия (после концентрирования)	1		5.6				
Гель-фильтрация	7.5	0.4	3	7.5	375	23	27

Таблица 1. Результаты очистки активатора протеина С из культуральной жидкости A. ochraceus

1 мин. Измерения проводили в условиях линейной зависимости скорости накопления продукта реакции от времени [21, 22].

Анализ белкового состава компонентов. Для определения белкового состава полученных компонентов проводили электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na (концентрация акриламида в концентрирующем геле -6%, в разделяющем -12.5%). В качестве маркеров молекулярных масс использовали набор "Unstained Protein Molecular Weight Marker" ("Thermo Fisher Scientific", США). После окончания электрофореза гель окрашивали 0.1%-ным раствором Кумасси бриллиантового голубого R-250 [23, 24]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом на приборе "NanoDrop One" ("Thermo Fisher Scientific", США) с использованием коэффициента экстинкции 0.667 при 280 нм [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культуральная жидкость микромицета A. ochraceus, полученная по окончании срока культивирования продуцента, после удаления биомассы представляла собой прозрачную жидкость коричневого цвета, содержащую остатки компонентов питательной среды и различные, в том числе окрашенные, метаболиты микромицета. Суммарная концентрация белка в культуральной жидкости составила 5.7 мг/мл, а удельная ферментативная активность активатора протеина С – 0.02 ед./мг (табл. 1). На первой стадии очистки использовали высаливание сульфатом аммония, поскольку оно является доступным способом концентрирования целевого белка из большого объема культуральной жидкости и позволяет одновременно отделить значительное количество примесей, остающихся в растворенном виде.

Для определения оптимальной степени насыщения сульфата аммония, необходимой для осаждения активатора протеина С, измеряли ферментативную активность в культуральной жидкости

до и после высаливания различными концентрациями сульфата аммония. На рис. 1 приведена зависимость между степенью насыщения сульфата аммония и остаточной ферментативной активностью культуральной жидкости после высаливания. Снижение остаточной активности до минимальных значений произошло в опытах со степенями насыщения сульфата аммония 0.7, 0.75 и 0.8. Следовательно, степень насыщения сульфата аммония 0.7 является оптимальной для осаждения активатора протеина С из культуральной жидкости в процессе его выделения и очистки. Использование более высоких степеней насыщения 0.75 и 0.8 было нецелесообразным, поскольку это не приводило к существенному увеличению выхода целевого белка, но повышало количество соосаждающихся с ним примесей.

Электрофоретический анализ осадка, полученного в процессе высаливания культуральной жидкости сульфатом аммония при степени насыщения 0.7, показал, что вместе с целевым белком с молекулярной массой около 33 кДа содержалось

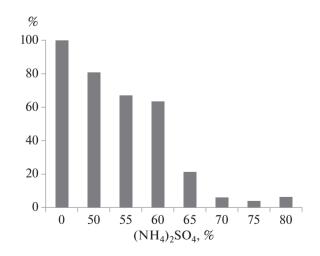


Рис. 1. Зависимость от степени насыщения сульфата аммония (%) остаточной ферментативной активности активатора протеина С в культуральной жидкости $A.\ ochraceus$ (%) после высаливания.

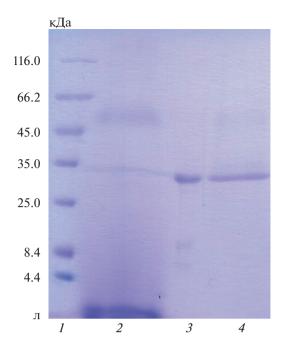


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа белкового состава осадка после высаливания культуральной жидкости A. ochraceus (2), компонентов, обогащенных активатором протеина C, после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе (3), очищенной протеазы-активатора протеина C после гель-фильтрации (4). Белки-маркеры молекулярных масс (1): β -галактозидаза — 116.0, δ CA — 66.2, овальбумин — 45.0, лактатдегидрогеназа — 35.0, РНКаза — 25.0, β -лактоглобулин — 18.4 и лизоцим — 14.4 кДа.

значительное количество примесей, поэтому он нуждался в дальнейшей очистке (рис. 2, дорожка 2). Визуально осадок имел насыщенный коричневый цвет из-за содержания окрашенных продуктов метаболизма микромицета. Следует отметить, что основная часть примесей также начинала осаждаться при степенях насыщения сульфата аммония 0.65—0.7. В связи с этим было сделано заключение, что проведение предварительных стадий высаливания при степенях насыщения ниже 0.65 для осаждения посторонних компонентов культуральной жидкости не является обязательным, поскольку не приводит к существенному увеличению чистоты целевого белка, получаемого на данном этапе очистки.

В дальнейшем было необходимо разработать способ очистки протеазы-активатора протеина С, образуемой *А. ochraceus*. В качестве следующей стадии очистки выбрали гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе. Ее результаты приведены на рис. За. Использованный хроматографический буфер, содержавший сульфат аммония 0.35 степени насыщения, обеспечил как растворение осадка протеазы-активатора протеина С,

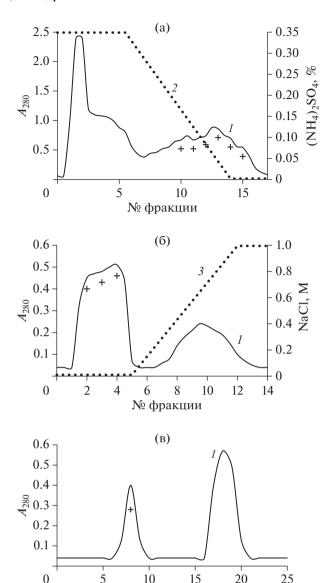


Рис. 3. Результаты хроматографии компонентов, обогащенных активатором протеина С, на фенил-сефарозе (а), ДЭАЭ-сефарозе (б) и Сефадексе G-50 (в); величины оптической плотности элюата при 280 нм (1), градиенты (2) сульфата аммония (а) и (3) NaCl (б), компоненты, содержащие протеазу-активатор протеина С, отмечены "+".

№ фракции

так и ее хорошую сорбцию на фенил-сефарозе. В то же время значительное количество примесей в этих условиях не связалось с носителем и элюировалось со свободным объемом колонки. Целевой белок элюировался в конце снижающегося градиента сульфата аммония, что обеспечило его эффективную грубую очистку. Раствор активатора протеина С, полученный после данного этапа очистки, имел желтый оттенок, удельная актив-

ность целевого белка в нем возросла в 100 раз по сравнению с первоначальной (табл. 1).

При дальнейшей очистке с использованием ДЭАЭ-сефарозы большое количество оставшихся примесей прочно связалось с хроматографическим носителем. Из результатов хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе, приведенных на рис. 36, видно хорошее разделение целевого белка, элюировавшегося в первых компонентах, и примесей, которые элюировались только при значительном увеличении концентрации NaCl в хроматографическом буфере. Компоненты, содержавшие активатор протеина С, после данного этапа очистки имели бледно-желтый цвет, удельная активность при этом возросла в 275 раз по отношению к исходной (табл. 1). Электрофоретический анализ полученных компонентов показал их значительное обогащение целевым белком и снижение количества примесей (рис. 2, дорожка 3).

На заключительном этапе очистки использовали гель-фильтрацию на Сефадексе G-50, предварительно сконцентрировав наносимый раствор белка на мембранном фильтре. Протеаза-активатор протеина С элюировалась с сорбента уже в начале процесса (рис. 3в), что обеспечило практически полное ее отделение от оставшихся примесей. Полученные после данного этапа очистки компоненты, содержавшие активатор протеина С, образуемого *А. осhrасеиs*, были бесцветны, их удельная активность возросла в 375 раз по сравнению с первоначальной (табл. 1). Электрофоретический анализ этих компонентов показал, что они содержали высокоочищенный целевой белок (рис. 2, дорожка 4).

Суммарный выход активатора протеина С после всех стадий очистки составил 27% (табл. 1), что незначительно ниже чем выход 35%, полученный при способе очистки протеазы другого штамма — A. ochraceus 513, и основанный на использовании бациллихин-силохрома, который был ранее опубликован в работе [11]. Однако возрастание итоговой степени очистки целевого белка в 375 раз, достигнутое при использовании предложенного в данной работе способа, значительно превышало ранее полученные результаты, в которых степень очистки возрастала только в 36 раз [11]. Это, а также труднодоступность бациллихин-силохрома в настоящее время, делают предложенный метод очистки более перспективным и легкодоступным для получения протеазы-активатора протеина CA. ochraceus.

Таким образом, с использованием современных хроматографических носителей была получено значительное количество высоко очищенной протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Bouwens E.A.*, *Stavenuiter F.*, *Mosnier L.O.* // J. Thromb. Haemost. 2013. V. 11. № 1. P. 242–253.
- 2. *Griffin J.H., Fernandez J.A., Gale A.J., Mosnier L.O.* // J. Thromb. Haemost. 2007. V. 5. № 1. P. 73–80.
- 3. *Струкова С.М.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314—1331.
- 4. *Gempeler–Messina P.M., Müller C.* // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
- 5. *Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svedsen L.* // Toxicon. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
- 6. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 537—542.
- 7. Патент РФ. 2011. № 2460772.
- 8. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 6. С. 580—586.
- 9. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86—92.
- 10. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 373—379.
- 11. *Батомункуева Б.П., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602—606.
- 12. Патент РФ. 2011. № 2468081.
- 13. *Green A.A.*, *Hughes W.L.* // Methods Enzymol. 1955. V. 1. № 10. P. 67–90.
- 14. *Scopes R*. Protein Purification: Principles and Practice / Ed. C.R. Cantor. N.Y.: Springer, 1993. 345 p.
- 15. *Kennedy R.M.* // Methods Enzymol. 1990. V. 182. № 27. P. 339–343.
- 16. *McCue J.T.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 25. P. 405–414.
- 17. *Bollag D.M.* // Methods Mol. Biol. 1994. V. 36. № 2. P. 11–22.
- 18. *Cummins P.M., Rochfort K.D., O'Connor B.F.* // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1485. № 11. P. 209–223.
- Stellwagen E. // Methods Enzymol. 1990. V. 182. № 25. P. 317–328.
- 20. *Bollag D.M.* // Methods Mol. Biol. 1994. V. 36. № 1. P. 1–9.
- 21. *Lorsch J.R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 536. № 1. P. 3–15.
- 22. *Harris T.K., Keshwani M.M.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 7. P. 57–71.
- 23. *Brunelle J.L.*, *Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. № 12. P. 151–159.
- 24. *Brunelle J.L.*, *Green R.* // Methods Enzymol. 2014. V. 541. № 13. P. 161–167.
- 25. *Noble J.E.*, *Bailey M.J.* // Methods Enzymol. 2009. V. 463. № 8. P. 73–95.

Purification of the Protease-Activator of Protein C of Human Blood Plasma Produced by the Micromicete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D

S. K. Komarevtsev^a, E. A. Popova^a, V. G. Kreyer^a, K. A. Miroshnikov^b, and A. A. Osmolovskiy^a, *

^a Biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia ^b Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Moscow, 117997 Russia *e-mail: aosmol@mail.ru

Received May 19, 2019; revised August 23, 2019; accepted August 30, 2019

A method for the purification of a protease activator of protein C of human blood plasma from the culture fluid of *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D micromycete has been developed. This protein is similar in properties to the activator of protein C from the venom of the snake *Agkistrodon contortrix contortrix*, which is used in modern laboratory diagnostics of protein C. The method is a combination of fractionation with ammonium sulfate, hydrophobic, ion-exchange and gel permeation chromatography. As a result, a highly purified protein C activator preparation was obtained, the specific activity of which during the purification process increased by more than 350 times.

Keywords: protein C activator, chromatography, micromycete proteases