

УДК 577.152.34

ХАРАКТЕРИСТИКА И СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРОМИЦЕТА *Sarocladium strictum*

© 2021 г. Е. И. Корниенко¹, А. А. Осмоловский^{1, *}, В. Г. Крейер¹,
Н. А. Баранова¹, И. Б. Котова¹, Н. С. Егоров²

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

²Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.2020 г.

После доработки 14.08.2020 г.

Принята к публикации 02.09.2020 г.

Получен и охарактеризован препарат тромболитических ферментов микромицета *Sarocladium strictum* 203. Показана выраженная урокиназная активность синтезируемых продуцентом протеиназ. В препарате обнаружено присутствие трех щелочных трипсиноподобных тиолзависимых протеиназ серинового типа с различными изоэлектрическими точками (4.5, 7.2 и 11.8) и близкими значениями молекулярных масс (~35 кДа). Одна из протеиназ (протеиназа III) оказалась негликозилированной, а остальные – гликопротеины. Протеиназы различались по спектру протеолитической активности по отношению к белкам–компонентам тромбов. Предположительно, урокиназная активность ферментов обусловила активирующее действие протеиназ на плазминоген.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, тромболитические ферменты, активаторы плазминогена

DOI: 10.31857/S0555109921010293

В последнее время активно накапливаются сведения о разнообразии строения и функций протеолитических ферментов, а также расширении возможностей их применения, что делает их изучение одним из актуальных направлений в современной энзимологии [1, 2]. Значительный практический интерес представляют протеиназы, которые имеют перспективу применения или уже применяющиеся в медицине, в особенности для лечения или диагностики тромбозомболических осложнений. В связи с этим активно изучаются, как правило, протеиназы микроорганизмов, особенно мицелиальных грибов, обладающие очевидными биотехнологическими преимуществами перед другими источниками [3].

В последнее время перспективные продуценты протеиназ найдены среди микромицетов, которые относятся к представителям различных эколого-трофических групп: сапротрофов, фито- и энтомопатогенов [4–7]. Однако для применения грибных протеиназ в качестве тромболитиков, как прямого, так и непрямого действия, необходимо учитывать их специфичность к компонентам тромбов и возможные патофизиологические эф-

фекты [8], поэтому сведения о фибринолитической активности протеиназ микромицетов постоянно расширяются и дополняются. К перспективным продуцентам протеиназ направленного действия можно отнести такие новые штаммы микромицетов, как *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 [5], *A. japonicum* KSS05 [9], *A. niger* [10], *A. ochraceus* L-1 [11, 12], *A. oryzae* KSK-3 [13], *Arthrotrichum longa* 1 [14], *Mucor subtilissimus* UCP 1262 [15, 16], *Neurospora sitophila* [17], *Paecilomyces tenuipes* [18], *Sarocladium strictum* 203 [19, 20] и *Tolypocladium inflatum* k1 [21]. Изучение свойств протеаз, продуцируемых большинством из них, показало, что они различаются как по оптимальным параметрам проявления активности, так и по субстратной специфичности.

Протеиназы штамма *S. strictum* 203 не были ранее изучены, однако было показано, что, наряду с прямой фибринолитической активностью, они способны проявлять активирующее плазминогенное действие (непрямая фибринолитическая активность) [19]. Это свойство протеиназ оказалось необходимым для тромболитических препаратов последних поколений [22]. В связи с этим изуче-

ние свойств протеиназ этого продуцента представляется важным.

Цель работы – выделение и изучение свойств протеиназ микромицета *S. strictum* 203, обладающих фибринолитической и активирующей плазминоген активностью.

МЕТОДИКА

Получение препарата внеклеточных протеиназ *S. strictum*. Для получения препарата протеиназ продуцент культивировали в глубинных условиях в два этапа. На первом этапе культуру микромицета, выращенную на скошенной среде Чапека, перенесли в посевную среду и выращивали посевной мицелий (48–72 ч). На втором этапе часть биомассы (10% по объему) перенесли в ферментационную среду, выращивание проводили 96–120 ч при температуре 28°C на качалке при 220 об/мин. Среда для биосинтеза ферментов имела следующий состав (в г/л): сахароза – 40.0, K_2HPO_4 – 4.4, $NaNO_3$ – 19.0 и KNO_3 – 2.5, pH 6.5. Среда для посевного мицелия имела тот же состав но концентрация их была уменьшена в 2 раза.

По окончании культивирования культуральную жидкость (КЖ) микромицета отделяли от мицелия центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин при 4°C. Белки из КЖ осаждали двукратным объемом ацетона, охлажденным до –20°C, выдерживали в течение 1 ч при 4°C для формирования осадка, а затем фильтровали. Отфильтрованный осадок высушивали над хлористым кальцием в вакуумном эксикаторе в течение 3 сут.

Выделение внеклеточных протеиназ *S. strictum*. Для разделения белков, осажденных из КЖ, использовали препаративное изоэлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга [23]. ИЭФ проводили в колонке объемом 110 мл (“Pharmacia”, Швеция) при напряжении 800 В течение 36 ч при 4°C в широком градиенте pH амфолинов (pH 3.0–10.0) и градиенте сахарозы 0–40%. После проведения ИЭФ собирали на холоде фракции объемом 1.5–2 мл, в которых измеряли pH, содержание белка и активность протеиназ.

Электрофорез в ПААГ и определение белков. Гомогенность белков во фракциях после ИЭФ определяли с помощью электрофореза по Лэммли в 15%-ном ПААГ, в присутствии ДДС-Na [24]. Для окраски гелей использовали 0.08%-ный раствор Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте [25]. Для определения молекулярной массы протеиназ использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermoscientific”, США).

Количественное содержание белка в пробах определяли спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см [26]. Для расчета

концентрации строили калибровочную кривую по БСА.

Определение фибринолитической (плазминоподобной) и активирующей плазминоген активности методом фибриновых пластин. Фибринолитическую и активирующую плазминоген активность определяли на фибриновых пластинках по модифицированному методу Аструпа–Мюллерца–Лассена [4]. Для приготовления фибриновых пластин смешивали 900 мкл 3%-ного раствора бычьего фибриногена и 200 мкл раствора тромбина (2 мг/мл) в физиологическом растворе. Смесь аккуратно перемешивали и переносили в чашки Петри ($d = 9$ см). Образование и уплотнение фибринового геля происходило в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого часть чашек Петри прогревали в течение 30 мин при 86°C, при этом инактивировали плазминоген. Для измерения фибринолитической и активирующей плазминоген активности на пластины наносили по 30 мкл пробы и инкубировали в течение 4 ч в термостате. Затем на пластинах измеряли площадь зоны лизиса. Разность в размерах зон на прогретых и прогретых чашках служила показателем способности фермента активировать плазминоген. Данные выражали в усл. ед./мл. За 1 усл. ед. принимали количество фермента, образующего зону гидролиза фибриновой пластины, равную 1 мм².

Определение протеолитической активности при гидролизе белков-субстратов. В полученном препарате внеклеточных протеиназ и фракциях после ИЭФ проводили реакции казеинолиза, фибринолиза и фибриногенолиза с 1%-ными суспензиями соответствующих белков в 0.05 М трис-НСI буфере, pH 8.2.

Для проведения реакций к 200 мкл фильтрата культуральной жидкости добавляли 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0.05 М трис-НСI буфере, pH 8.2, и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 10–30 мин при 37°C [11, 27]. Активность выражали в мкмольх тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{\text{тир}}$).

Определение протеолитической активности с использованием хромогенных пептидных субстратов. Для определения амидолитической активности выделенных протеиназ проводили инкубацию с 0.05%-ными растворами хромогенных пептидных субстратов (“Chromogenix”, Италия) – *n*-нитроанилидов, расщепляемых протеиназами системы гемостаза: тромбином – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, плазмином – H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактором Ха – Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназой – pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444) и тканевым активатором плазминогена – H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288).

Реакцию проводили в 200 мкл пробы при постоянном перемешивании в течение 5 мин при

37°C, как описано ранее [28]. Оптическую плотность измеряли при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 ("Hitachi", Япония). За 1 единицу активности (E_{pNA}) принимали количество мкмоль *n*-нитроанилина, образовавшегося в результате гидролиза за 1 мин.

Ингибиторный анализ. В качестве ингибиторов для металлопротеиназ использовали этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, 1.1 мг/мл) и *o*-фенантролин (0.5 мг/мл), цистеиновых протеиназ – *n*-хлормеркурийбензоат (*n*-ХМБ, 0.5 мг/мл) и сериновых протеиназ – фенилметилсульфонил фторид (ФМСФ, 0.3 мг/мл), а также ингибиторы хитотрипсиноподобных протеиназ – тозилфенилаланилхлорметилкетон (ТФХК, 0.4 мг/мл) и трипсиноподобных протеиназ – тозиллизилаланилхлорметилкетон (ТЛХК, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл). При изучении действия ингибиторов молярное соотношение фермент-ингибитор составляло 1 : 10 и 1 : 100 [29]. Начальную и остаточную протеолитическую активность фермента определяли при 37°C после его преинкубации с ингибитором в течение 120 мин при 25°C, как описано выше, и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение рН-оптимума, рН-стабильности, термостабильности и температурного оптимума ферментов. Для изучения рН-стабильности и оптимума рН для действия ферментов использовали 0.4 М натрий-ацетат-фосфат-боратный буфер со значениями рН 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 и 11.0.

Для определения рН-стабильности 100 мкл пробы и 150 мкл буфера инкубировали в течение 3 ч при 25°C. Затем добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы в 0.05 М трис-НСI-буфере, рН 8.2, и инкубировали еще в течение 5 мин при 37°C. Для определения рН-оптимума 100 мкл пробы ферментов, 150 мкл буфера и 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы инкубировали в течение 5 мин при 37°C.

Для измерения термостабильности фермента 50 мкл пробы и 200 мкл 0.05 М трис-НСI-буфера, рН 8.2, инкубировали в течение 3 ч при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C, а затем добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Для измерения температурного оптимума действия фермента 50 мкл пробы, 200 мкл буфера и 100 мкл раствора хромогенного субстрата урокиназы инкубировали в течение 5 мин при соответствующей температуре.

Реакцию останавливали 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты, и измеряли поглощение при 405 нм.

Определение углеводного компонента протеиназ. Присутствие в составе выделенных протеаз углеводного компонента выявляли методом дот-блоттинга, инкубируя нанесенные на нитроцел-

люлозные мембраны пробы в растворах периодической кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты), как описано ранее [30]. В качестве положительного контроля использовали раствор 0.5 мг/мл внеклеточной дрожжевой инвертазы, а в качестве отрицательного – раствор 0.5 мг/мл БСА.

Тромболизис. Для приготовления тромбов во взвешенных пробирках-эппендорфах смешивали 200 мкл плазмы и 20 мкл 0.1%-ного раствора тромбина в 0.1 М трис-НСI-буфере, рН 7.0, и оставляли на 30 мин при 37°C, после чего повторно взвешивали со стабилизированным тромбом. Затем добавляли 250 мкл пробы и инкубировали при перемешивании (250 об./мин) в течение 30, 60 и 90 мин при 37°C. При этом наблюдалось частичное разжижение тромба и отделение его от стенок пробирки. Лизат аккуратно убирали при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали остаток вместе с пробиркой. После чего рассчитывали количество, в %, не прогидролизованного тромба [5].

Ферментативные реакции, требующие постоянного перемешивания, проводили в термошейкере TS-100 ("BioSan", Латвия). Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр BioSpectrometer® kinetic ("Eppendorf", Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микромицет вида *S. strictum* (W. Gams) Sumnerbell был выделен из полифилетического рода *Acremonium* в 2011 г. Он принадлежит к анаморфам грибов аскомицетного аффинитета рода *Sarocladium*, семейства *Sarocladiaceae*, порядка *Hypocreales*, класса *Sordariomycetes*, отдела *Ascomycota*. Эти грибы занимают различные экологические ниши и выделяются из почвы и растительных остатков. Среди них встречаются фитопатогенные и ассоциированные с другими грибами формы. Штамм *S. strictum* 203 был выделен из культуры *A. longa* Mecht. 1 как микофил – перспективный продуцент фибринолитических протеиназ [20].

Изучение в культуральной жидкости *S. strictum* 203 активности внеклеточных протеиназ по отношению к белковым компонентам тромба и хромогенным пептидным субстратам подтвердило сделанное ранее предположение об их возможности осуществлять реакцию активации плазминогена. Как видно из табл. 1, протеиназы микромицета были способны расщеплять субстраты плазмина, тромбина и фактора Ха, а также проявляли активность активаторов плазминогена: тканевого (по субстрату D-Ile-Pro-Arg-pNA) и урокиназы (по субстрату rGlu-Gly-Arg-pNA). Важно отметить, что в среднем значение активности урокиназы в 1.7 раз превышало значение активности по отношению к другим исследованным субстратам.

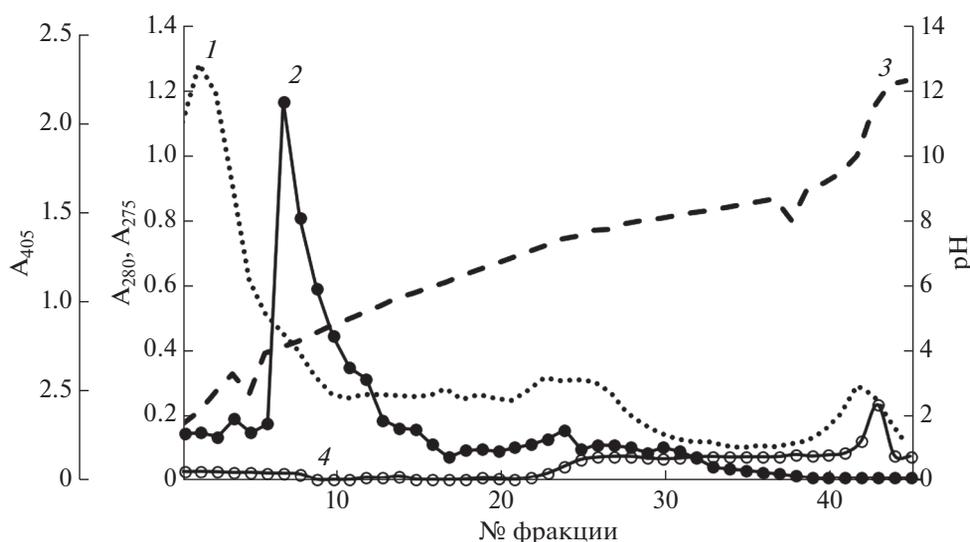


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата протеиназ *S. strictum* 203; 1 – A_{280} , 2 – активность урокиназы, 3 – pH, 4 – казеинолитическая активность.

Можно предположить, что активация плазминогена протеазами *S. strictum* 203, выявленная ранее, происходила по урокиназному типу. В связи с этим субстрат урокиназы был использован в дальнейшем для определения специфической активности протеиназ продуцента.

Для изучения протеолитического комплекса *S. strictum* 203 был получен препарат его внеклеточных протеиназ осаждением сульфатом аммония из КЖ гриба. Препарат представлял собой гомогенный порошок желтовато-белого цвета без запаха, хорошо растворимый в воде.

Проведение ИЭФ препарата позволило обнаружить в составе протеолитического комплекса продуцента как минимум 3 протеиназы (обозначенные как протеиназы I, II и III) с pI 4.5, 7.2 и 11.8 (рис. 1). При использовании для определения протеолитической активности во фракциях, полученных после ИЭФ, двух субстратов – казеина и хромогенного пептидного субстрата урокиназы, были отмечены различия в степени их гидролиза различными протеиназами. Так, в отличие от протеиназы III, протеиназы I и II обладали низкой казеинолитической активностью и проявляли большую урокиназную активность (рис. 1). Все

выделенные ферменты при проведении электрофореза в ПААГ оказались гомогенными белками с молекулярной массой около 35 кДа (рис. 2), что могло свидетельствовать о том, что они являлись изоферментами. Подобная характеристика была также показана для протеиназ, образующих протеолитические комплексы у других микромицетов [12, 32].

Изучение субстратной специфичности выделенных протеиназ показало, что их активность по отношению к исследуемым субстратам тканевого активатора плазминогена и плазмينا различалась. Так, протеиназа I не действовала на эти субстраты, протеиназа II не обладала активностью по отношению к субстрату тканевого активатора плазминогена и слабо гидролизовала субстрат плазмينا, а протеиназа III расщепляла оба субстрата (рис. 3). При этом две протеиназы проявляли выраженную урокиназную активность. Наибольшей активностью по отношению к субстрату урокиназы обладала протеиназа II ($170.0 E_{pNA}/\text{мг} \times 10^{-3}$). Протеиназа I обладала более узкой субстратной специфичностью с выраженной урокиназной активностью, а протеиназа III проявляла широкую субстратную специфичность. Можно

Таблица 1. Активность протеиназ микромицета *S. strictum* 203 по отношению к хромогенным пептидным субстратам

Активность	Субстрат	Активность, $E_{pNA}/\text{мг} \times 10^{-3}$
Плазминоподобная	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	30.9
Тромбиноподобная	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	34.7
Активность тканевого активатора плазминогена	D-Ile-Pro-Arg-pNA	31.2
Урокиназная	pGlu-Gly-Arg-pNA	58.7
Фактор Ха-подобная	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	32.4

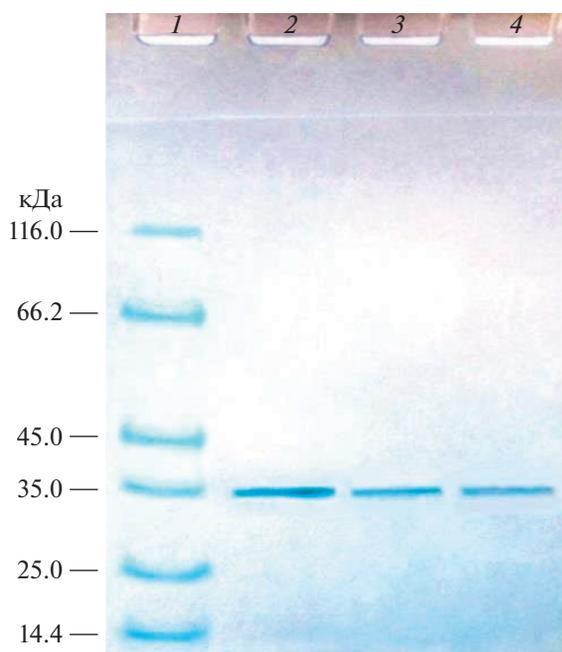


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС–Na протеиназ *S. strictum* 203: 1 – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: β -галактозидаза, БСА, овальбумин, лактатдегидрогеназа, эндонуклеаза рестрикции Bsp981, бета-лактоглобулин, лизоцим), 2 – протеиназа I, 3 – протеиназа II, 4 – протеиназа III.

предположить, что урокиназная активность и обуславливала активирующее плазминоген действие.

Методом фибриновых пластин были обнаружены фибринолитическая и активирующая плазминоген активность исследуемых протеиназ (табл. 2). Первые две протеиназы характеризовались высокой фибринолитической (193.6 и 169.8 усл. ед./мг соответственно) и активирующей плазминоген активностью (443.7 и 414.2 усл. ед./мг соответственно). Протеиназа III оказалась более активной (в 3.4 и 1.6 раз соответственно) и гидролизовала субстрат с одинаковой активностью, не проявляя выраженного активирующего плазминоген действия.

Фибринолитическая и фибриногенолитическая активность у протеиназ I и II была выражена слабо (табл. 2). Протеиназа III проявляла как фибрино- так и фибриногенолитическую активность (191.6 и 217.7 $E_{\text{Тир}}/\text{мг}$).

Таблица 2. Фибринолитическая, фибриногенолитическая и активирующая плазминоген активность протеиназ *S. strictum* 203

Активность	Значение активности		
	протеиназа I	протеиназа II	протеиназа III
Фибринолитическая, усл. ед./мг	193.6	169.8	653.0
Активаторная к плазминогену, усл. ед./мг	443.7	414.2	676.4
Фибринолитическая, $E_{\text{Тир}}/\text{мг}$	40.8	30.4	191.6
Фибриногенолитическая, $E_{\text{Тир}}/\text{мг}$	32.6	34.6	217.7

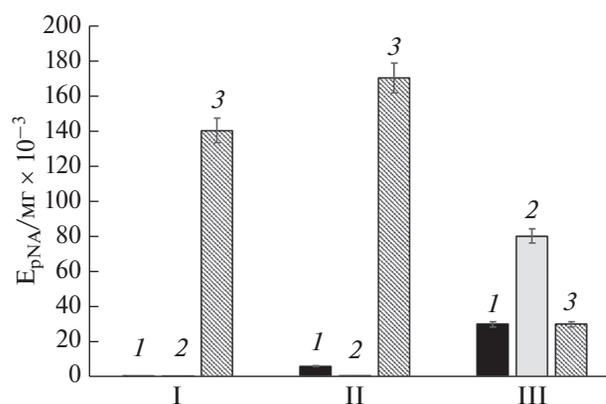


Рис. 3. Амидолитическая активность протеиназ *S. strictum* 203 (I, II и III) по отношению к хромогенным пептидным субстратам плазмина (1), тканевого активатора плазминогена (2) и урокиназы (3).

Для установления класса изучаемых протеиназ был проведен ингибиторный анализ (табл. 3). Наиболее эффективно ингибировал протеиназы I и II соевый ингибитор трипсина в соотношениях фермент : ингибитор, равных 1 : 10 и 1 : 100. Небольшое ингибирующее действие на протеиназу I оказывали ТФХК (ингибитор хомотрипсиновых протеиназ) и ФМСФ (ингибитор сериновых протеиназ), а протеиназа II только частично ингибировалась ФМСФ. Протеиназа III ингибировалась соевым ингибитором трипсина и ФМСФ в соотношениях 1 : 10 и 1 : 100. Протеиназы также незначительно ингибировались п-ХМБ, взаимодействующим с тиоловыми группами (табл. 3). Таким образом, можно предположить, что протеиназы *S. strictum* 203 являются трипсиноподобными тиолзависимыми протеиназами серинового типа.

Изучение рН стабильности протеиназ, входящих в состав комплексного препарата, полученного из КЖ микромицета *S. strictum* 203, показало, что активность протеиназы I наиболее эффективно проявлялась в области щелочных рН (рис. 4), в то время как протеиназы II и III сохраняли высокую активность при нейтральном рН. Активность всех трех протеиназ подавлялась при низких (до 5.0) и высоких (с 11.0) рН. Оптимум рН для протеиназы I находился ~10.0, протеиназа II

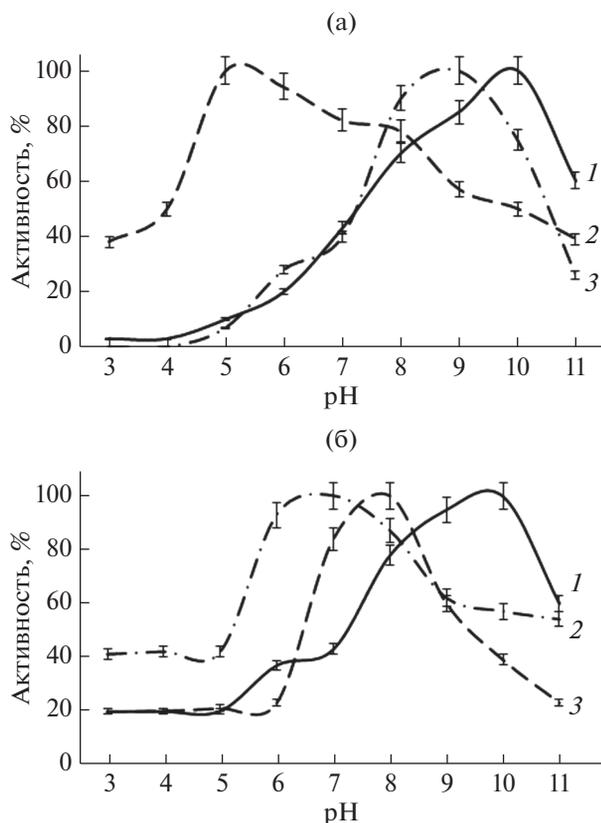


Рис. 4. Влияние pH на активность (а) и стабильность (б) протеиназы I (1), II (2) и III (3) *S. strictum* 203.

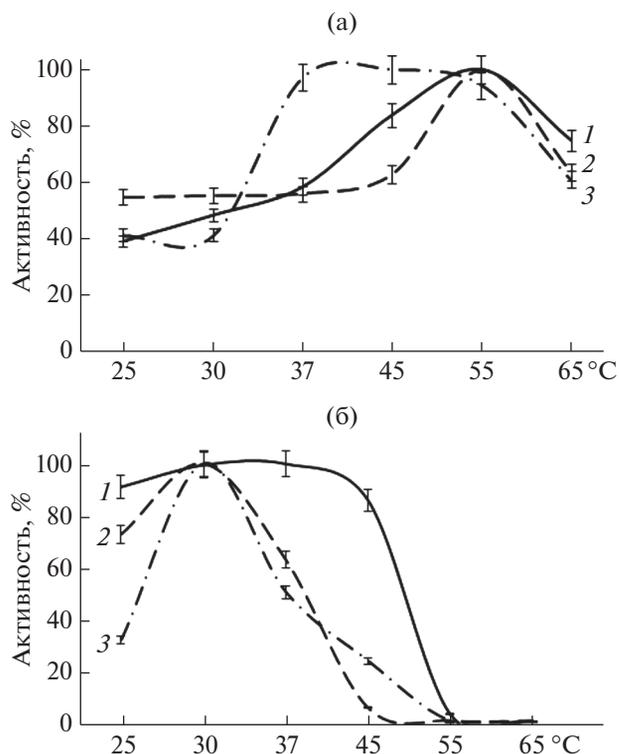


Рис. 5. Влияние температуры на активность (а) и стабильность (б) протеиназы I (1), II (2) и III (3) *S. strictum* 203.

проявляла одинаково высокую активность в диапазоне pH от 5 до 8, оптимум pH для протеиназы III находился ~8 (рис. 3). Из полученных результатов следовало, что оптимальный pH для

действия препарата ферментов нейтральный и слабо щелочной. Такие условия проявления активности ферментов совпадали со значением pH крови человека и предполагают возможность ис-

Таблица 3. Ингибиторный анализ внеклеточных протеиназ *S. strictum* 203

Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %		
		протеиназа I	протеиназа II	протеиназа III
Контроль (без ингибитора)	—	100.0	100.0	100.0
ЭДТА	1 : 10	72.0	100.0	100.0
	1 : 100	78.0	92.3	100.0
o-Фенантролин	1 : 10	89.3	100.0	100.0
	1 : 100	90.8	100.0	100.0
n-ХМБ	1 : 10	88.9	98.1	97.2
	1 : 100	90.2	98.9	73.6
ФМСФ	1 : 10	72.0	79.1	39.6
	1 : 100	60.0	53.9	32.2
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	0.0	7.3	52.2
	1 : 100	0.0	5.1	60.0
ТФХК	1 : 10	83.6	100.0	100.0
	1 : 100	80.0	100.0	84.6
ТЛХК	1 : 10	80.0	92.1	90.3
	1 : 100	57.8	100.0	90.1

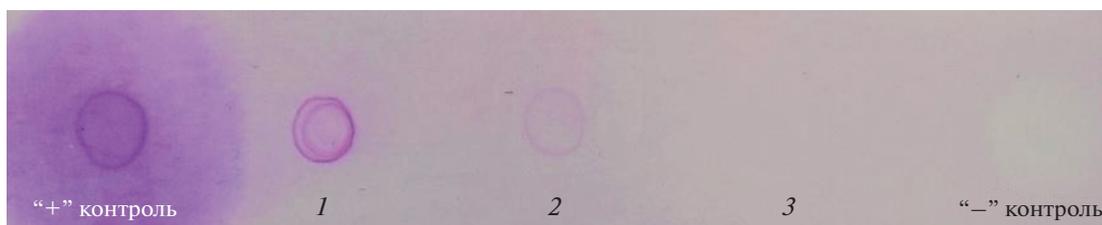


Рис. 6. Определение углеводного компонента в молекулах протеиназ I (1), II (2) и III (3), синтезируемых *S. strictum* 203, а также инвертазы дрожжей (“+”, положительный контроль) и БСА (“-”, отрицательный контроль).

пользования в дальнейшем препарата в клинике в качестве тромболитика.

В результате изучения термостабильности протеиназ микромицета было показано, что протеиназа I проявляла высокую урокиназную активность и была стабильна в течение 3 ч инкубации при 30 и 37°C (рис. 5). Протеиназы II и III проявляли высокую активность после инкубации при 30°C, а после 3 ч инкубации при 55°C все протеиназы инактивировались. Температурный оптимум действия протеиназ I и II составлял 55°C (рис. 4). Протеиназа III была одинаково активна в диапазоне 37–55°C.

Определение методом дот-блоттинга содержания гликопротеинов реактивом Шиффа в протеиназах, синтезируемых *S. strictum* 203, показало, что они различались по уровню гликозилирования. На рис. 6 видно, что наиболее гликозилированной оказалась протеиназа I, чуть меньше – протеиназа II. В составе протеиназы III гликозидные компоненты не были обнаружены.

Для изучения способности протеиназ продуцента к тромболизису был изучен гидролиз свежесформированных тромбов плазмы крови *in vitro*. Как видно на рис. 7, протеиназа III вносила наибольший вклад в тромболитический потенциал

препарата. Так, масса нелизированного тромба после инкубации с ним в течение 90 мин составила 42.9%. Протеиназы I и II вносили меньший вклад в тромболитический потенциал, а масса нелизированного тромба при их использовании в течение того же времени составила 58.0 и 63.2% соответственно.

Таким образом, установлено, что комплекс внеклеточных протеолитических ферментов *S. strictum* 203, обладающий тромболитической активностью, представлен тремя щелочными трипсиноподобными тиолзависимыми протеиназами серинового типа с разными изоэлектрическими точками, но близкими значениями молекулярных масс (около 35 кДа). Одна из протеиназ (протеиназа III) оказалась негликозилированным белком, остальные были гликопротеинами. Спектр протеолитической активности по отношению к белкам – компонентам тромба также оказался различен. Так, протеиназа I обладала более узкой субстратной специфичностью с выраженной урокиназной активностью и невысокой фибрино- и фибринолитической активностью, а протеиназа III проявляла широкую субстратную специфичность. Предположено, что урокиназная активность протеаз обуславливала активирующее плазминоген действие. Комплекс ферментов может найти применение в медицинской практике в качестве тромболитического агента.

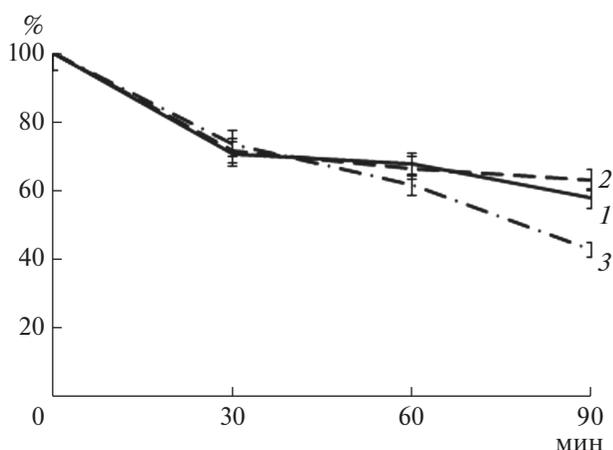


Рис. 7. Лизис тромба (остаточная масса, %) протеиназами I (1), II (2) и III (3), синтезируемыми *S. strictum* 203.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bond J.S. // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 5. P. 1643–1651.
2. Rani K., Rana R., Datt. S. // Int. J. Curr. Life Sci. 2012. V. 2. № 1. P. 12–18.
3. Kango N., Jana U.K., Choukade R. Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology // Eds. T. Satyanarayana, S. Deshmukh, M. Deshpande Singapore : Springer, 2019. P. 515–538.
4. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
5. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. // Biologia. 2015. V. 70. № 12. P. 1565–1574.
6. Шамрайчук И.Л., Лавренова В.Н., Белозерский М.А., Кураков А.В., Белякова Г.А., Дунаевский Я.Е. // Ми-

- кология и фитопатология. 2016. Т. 50. № 4. С. 250–256.
7. Semenova T.A., Dunaevsky Y.E., Beljakova G.A., Belozersky M.A. // *Fung. Biol.* 2020. V. 124. № 1. P. 65–72.
 8. Yike I. // *Mycopathologia.* 2011. V. 171. № 5. P. 299–323.
 9. Yadav S., Siddalingeshwara K.G. // *J. Drug Deliv. Therap.* 2015. V. 5. № 6. P. 60–62.
 10. Aradhye P.K., Chavan M.D. // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015. V. 9. № 9. P. 843–851.
 11. Осмоловский А.А., Рукавицына Е.Д., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Микробиология.* 2017. Т. 86. № 4. С. 504–509.
 12. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.
 13. Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Kusuda M., Fukuta Y., Terashita T. // *Mycoscience.* 2012. V. 53. № 5. P. 354–364.
 14. Шаркова Т.С., Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Микробиология.* 2016. Т. 85. № 2. С. 171–176.
 15. Nascimento T.P., Sales A.E., Porto C.S., Brandão R.M.P., Takaki G.M.C., Teixeira J.A., Porto T.S., Porto A.L.F. // *Adv. Enzyme Res.* 2015. V. 3. № 3. P. 81–91.
 16. Nascimento T.P., Sales A.E., Porto T.S., Brandão Costa R.M.P., Breydo L., Uversky V.N., Porto A.L.F., Converti A. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2017. V. 40. № 8. P. 1209–1219.
 17. Deng Y., Liu X., Katrolia P., Kopparapu N.K., Zheng X. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 109. № 1. P. 1338–1343.
 18. Kim H.C., Choi B.-S., Sapkota K., Kim S., Lee H.J., Yoo J.C., Kim S.-J. // *Process Biochem.* 2011. V. 46. № 8. P. 1545–1553.
 19. Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 2020. Т. 75. № 1. С. 37–42.
 20. Корниенко Е.И., Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. // *Микология и фитопатология.* 2020. Т. 54. № 3. С. 206–213.
 21. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2016. Т. 52. № 1. С. 38–43.
 22. Collen D., Lijnen R.H. // *Thromb. Haemost.* 2005. V. 93. № 4. P. 627–630.
 23. Vesterberg O. // *Methods in Enzymology.* 1971. V. 22. P. 389–412.
 24. Laemly U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
 25. Holbrook I.B., Leaver A.G. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 75. № 2. P. 634–636.
 26. Gertler A., Trop M. // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 19. № 1. P. 90–96.
 27. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 2016. № 1. С. 71–75.
 28. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Биоорганическая химия.* 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
 29. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. // *Биохимия.* 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
 30. 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.
 31. Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H.-J., de Hoog G.S., Starink M., Arocha Rosete Y., Guarro J., Scott J.A. // *Stud. Mycol.* 2011. V. 68. № 1. P. 139–162.
 32. Kunert J. // *Mycoses.* 2001. V. 43. № 7–8. P. 307–310.

Characteristics and Properties of the Complex of Proteolytic Enzymes of the Thrombolytic Action of the Micromycete *Sarocladium strictum*

E. I. Kornienko^a, A. A. Osmolovskiy^{a,*}, V. G. Kreyer^a, N. A. Baranova^a, I. B. Kotova^a, and N. S. Egorov^b

^aBiological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bInternational Biotechnological Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

The preparation of thrombolytic enzymes of micromycete *S. strictum* 203 was obtained and characterized. The expressed urokinase activity of producer proteinases was found and the content of the complex of three alkaline trypsin-like thiol-dependent serine-type proteinases with different isoelectric points (4.5, 7.2 and 11.8) but close molecular weight was detected in the enzyme preparation (about 35 kDa). One of the proteinases (proteinase III) was not glycosylated, the rest were glycoproteins. Proteinases differed in the spectrum of proteolytic activity in relation to proteins – the components of the thrombus also turned out to be different. It was suggested that the urokinase activity of enzymes causes plasminogen activating action.

Keywords: micromycete proteinases, fibrinolytic activity, thrombolytic enzymes, plasminogen activators