

## БАЦИЛЛЯРНЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

*Данилова Ю.В., Аюпова Э.Ф., Кузьменко А.В., Шарипова М.Р.*

*ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18*

*e-mail: Danilova146@mail.ru*

*поступила в редакцию 10 ноября 2014 года*

### Аннотация

В данной работе проводилось исследование биологической активности глутамилэндопептидазы и субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus*. В результате исследования получены гомогенные препараты протеиназ. Установлено, что ферменты обладают фибринолитической, антикоагулянтной, а также дозозависимой тромболитической активностью. Полученные в работе данные указывают на перспективность применения протеиназ бацилл в фармацевтической промышленности для создания тромболитических препаратов.

**Ключевые слова:** *Сериновые протеиназы, глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа, тромболитические, фибринолитические и антикоагулянтные свойства, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*.*

**Введение.** Лечение сердечнососудистых заболеваний в настоящее время представляет одну из актуальных проблем медицины. Дефицит сырья животного происхождения и, как следствие, недоступность ферментных препаратов в необходимых количествах для медицинской практики, а также их высокая стоимость, стимулируют разработку новых терапевтических средств микробного происхождения. Непатогенные легко культивируемые микроорганизмы – прекрасный источник разнообразных ферментов.

Особое внимание исследователей привлекают белки и ферменты, обладающие фибринолитическими и тромболитическими свойствами [1]. Описан рекомбинантный субтилизин *B. subtilis* РТСС 1023 экспрессирующий в *E. coli* BL21 (DE3), являющийся потенциальным фибринолитическим агентом [2]. Новые протеиназы QK-1 и QK-2 из *B. subtilis* QK02 и субтилизиноподобная протеиназа из *B. subtilis* TP-6 имеют высокий уровень фибринолитической активности и могут быть перспективны в тромболитической терапии [3, 4]. В настоящее время получили распространение препараты на основе микробных белков – стрептокиназы и стафилокиназы, которые обладают токсичностью и вызывают побочные эффекты при лечении [5]. Для медицинской практики перспективны протеиназы бацилл, обладающие высокой стабильностью и низкой патогенностью. К ним относится препарат Тромбовазим на основе субтилизиноподобной протеиназы *B. subtilis*, который обладает высокой эффективностью и низкой токсичностью [6], что указывает на перспективность применения протеиназ бацилл в качестве тромболитических средств. Открытие за последние десятилетия огромного количества бациллярных протеиназ, изучение механизмов экспрессии генов и биохимических свойств этих белков оставляют немало вопросов относительно биологической активности этих ферментов. В связи с этим представляют научный и практический интерес исследования фибринолитических, тромболитических, антикоагулянтных свойств протеиназ. **Целью данной работы** являлось исследование тромболитической активности бактериальных протеиназ *Bacillus pumilus* 7P с различной специфичностью.

**Экспериментальная часть. Получение протеиназ *B. pumilus* 7P.** В работе использовали следующие протеолитические ферменты бацилл: Глутамилэндопептидаза – сериновая химотрипсиноподобная протеиназа с узкой субстратной специфичностью (выраженное предпочтение к связям, образованным глутаминовой кислотой [7]). Ферменты получали из рекомбинантного штамма *B. subtilis* JB 2036, содержащего плазмиды с генами

индивидуальных белков [8,9]. Культивирование бактерий проводили на среде LB (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5 [10]. Выделение и очистку протеиназ проводили с помощью ионообменной хроматографии [7]. Для определения степени чистоты препаратов ферментов проводили электрофорез в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1% Ds-Na по методу Лаэммли [11]. Специфическую активность субтилизиноподобной протеазы (AprVp) определяли по расщеплению хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa по методу Люблинской и др. [12]. Специфическую активность глутамилэндопептидазы (GseVp) определяли по расщеплению хромогенного субстрата Z-Glu-pNa [12]. **Определение тромболитической активности протеиназ.** Для определения тромболитической активности протеиназ аликвоту крови крыс 0.25 мл смешивали с 0.05 мл раствора тромбина и выдерживали в течение 10 мин в водяном термостате при 37°C для образования сгустков. К сгусткам добавляли 0.1 мл раствора фермента (в концентрации 0.2 и 0.4 мг/мл) и помещали в водяной термостат (в контрольные пробирки добавляли 0.145 М NaCl). Отмечали время полного лизиса сгустков. **Определение активности плазминогена под действием протеиназ.** Активность плазминогена определяли по расщеплению синтетического хромогенного субстрата D-Val-Ley-Lis-pNa (p-Nitroanilide dihydrochloride) спектрофотометрически при длине волны  $\lambda=280$ . Каждый из ферментов в концентрации 0.4 мг/мл смешивали с раствором плазминогена («Sigma») в соотношении 1:20, добавляли 20 мкл субстрата в концентрации 0.002 мг/мл. Активность плазминогена измеряли на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм каждые 30 мин при 37°C. **Фибринолитическая активность протеиназ.** Активность протеиназ по отношению к фибриновым пластинкам определяли по методу Аструпа [13]. **Антикоагулянтная активность ферментов.** Способность ферментов предотвращать образование фибриновых сгустков исследовали с помощью тромбоэластографа («Hellige», Австрия) по методике Хартерта [14]. **Математическая обработка результатов.** Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

**Результаты и их обсуждение.** Выделение фермента из освобожденной от клеток культуральной жидкости проводили с помощью ионообменной хроматографии на КМ – целлюлозе, с последующей очисткой на колонке Mono S в системе FPLC-хроматографии. Глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа получены со степенью очистки 1280 и 730 и выходом 10,3 и 9,8% соответственно. Таким образом, были получены хроматографически гомогенные препараты протеиназ, чистота которых была подтверждена электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Молекулярная масса составляла 23 кДа для глутамилэндопептидазы и 27 кДа для субтилизиноподобной протеиназы. **Тромболитическая активность бактериальных протеиназ.** Получение гомогенных препаратов ферментов позволило изучить их биологические свойства. В связи с распространением заболеваний, связанных с тромбообразованием, в настоящее время проводится активный поиск ферментов, способных эффективно лизировать тромбы [15]. Исследовали тромболитические свойства внеклеточных протеиназ *V.pumilus*. Глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа обладали дозозависимой тромболитической активностью. При этом субтилизиноподобная протеиназа в концентрации 0.4 мг/мл лизировала тромб в течение 125 мин, в концентрации 0.2 мг/мл – в течение 185 мин. Глутамилэндопептидаза в концентрациях 0.2 и 0.4 мг/мл лизировала тромб за 270 и 225 мин соответственно. Контрольный сгусток через 300 мин оставался весом 13 мг, т.е как и до инкубации. Известно, что бациллопептидаза F, секретируемая *B. licheniformis* KJ-31 в концентрации 0.5 мг/мл эффективно лизировала тромб в течение 60 мин [16]. Субтилизиноподобная сериновая протеиназа, выделенная из морского штамма *B. subtilis* ICTF-1, способна растворять фибриновые сгустки в течение 1 ч [17]. Так как лизис тромба может происходить либо под действием плазмина (который образуется в результате активации плазминогена активаторами), либо под действием других белков, обладающих способностью расщеплять фибриноген, мы изучали активаторную способность протеиназ *B.*

*pumilus* по отношению к плазминогену. Установлено, что при действии протеиназ на плазминоген не происходило его активации. Следовательно, протеиназы не обладали активаторной способностью по отношению к плазминогену, а значит, вероятнее всего, расщепляли тромб, действуя непосредственно на фибриноген. Представляло интерес определить фибринолитическую активность исследуемых протеиназ. **Фибринолитические свойства протеиназ.** Определение фибринолитической активности протеиназ проводили по методу фибриновых пластинок. В основе метода лежит образование зон лизиса на стандартных фибриновых пластинках при нанесении на них исследуемых проб. Исследовали способность субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы *B. pumilus* 7P лизировать прогретые и непрогретые фибриновые пластинки. Показали, что после внесения 0.2 мг/мл фермента, зоны лизиса появились через 1 ч инкубации при 37°C как на прогретых, так и на непрогретых пластинках. Через 24 ч инкубации с субтилизиноподобной протеиназой площадь зоны лизиса фибрина составила  $67 \pm 3.8$  мм<sup>2</sup> и  $69 \pm 2.4$  мм<sup>2</sup> соответственно. Разница между данными значениями была статистически незначима ( $p \leq 0,05$ ) (рисунок 1).

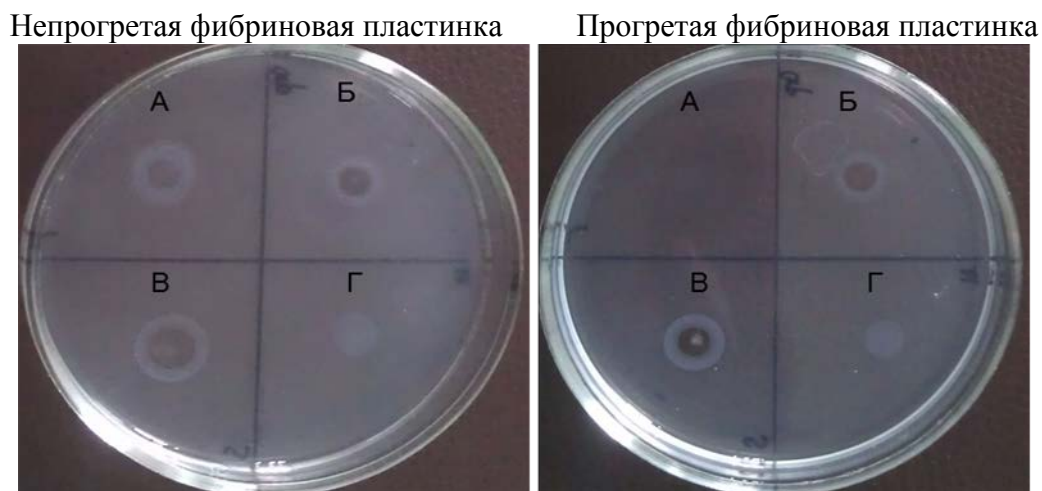


Рисунок 1. – Фибринолитическая активность протеиназ и стрептокиназы; А – стрептокиназа, Б – глутамилэндопептидаза, В – субтилизиноподобная протеиназа.

Интересно, что глутамилэндопептидаза *B. pumilus*, будучи узкоспецифичным ферментом, также обладала фибринолитическими свойствами. Зоны лизиса фибрина наблюдали на обеих чашках, однако разницы площадей этих зон выявлено не было. Таким образом, сделали заключение, что сериновые протеиназы *B. pumilus* обладают фибринолитической активностью и не способны активировать плазминоген. Параллельно, в качестве контроля, использовали стрептокиназу (рисунок 1), которая является активатором плазминогена и не способна расщеплять фибриноген. На прогретых чашках видно отсутствие зоны лизиса под действием стрептокиназы, что свидетельствует о ее активаторной способности по отношению к плазминогену. Другие бациллярные ферменты также обладают способностью к расщеплению фибрина. Так, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза бактерий *B. amyloliquefaciens* Н2 в концентрации 0.25 мг/мл обладали высокой фибринолитической активностью и активаторной способностью по отношению к плазминогену [18]. Бациллокиназа 1, секретируемая штаммом *B. subtilis* А1 способна разрушать фибрин. Под действием фермента площадь зоны гидролиза фибрина на непрогретой пластинке в 2 раза больше, чем на прогретой, что указывает на её активаторную способность по отношению к плазминогену [19]. **Антикоагулянтная активность ферментов.** Антикоагулянтные свойства бактериальных протеиназ определяли по характеру кривой тромбоэластограммы. Установлено, что при инкубации плазмы крови с субтилизиноподобной протеиназой (рисунок 2ж) и глутамилэндопептидазой (рисунок 2д) сгусток не образовывался. Тромбоэластограммы г-ж указывали на гиперфибринолиз под действием сериновых протеиназ. При первичном фибринолизе уровень фибриногена снижается при расщеплении его плазмином (рисунок 2г). Исходя из стандартов сравнения

заключили, что глутамилэндопептидаза расщепляла фибриноген по принципу плазмينا (рисунок 2д). При вторичном фибринолизе (рисунок 2е), появление большого количества продуктов деградации фибрина активирует плазминовую систему крови. Скорее всего, под действием субтилизиноподобной протеиназы происходило интенсивное расщепление фибриногена, вследствие чего активировалась плазминовая система. Это подтверждается тромбоэластограммой, которая, исходя из стандартов сравнения, соответствует вторичному фибринолизу (рисунок 2ж).

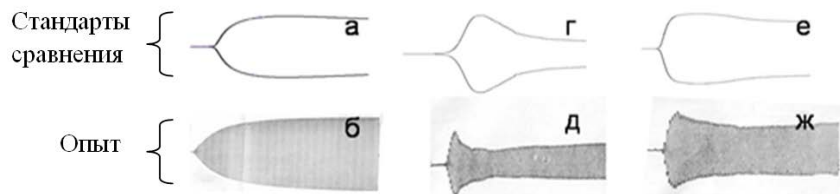


Рисунок 2. – Тромбоэластограммы плазмы крови человека после инкубации с протеиназами.

а – норма, б – контроль (без добавления ферментов), г – первичный фибринолиз, д – глутамилэндопептидаза, е – вторичный фибринолиз, ж – субтилизиноподобная протеиназа.

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза *B.pumilus* 7P, обладали выраженными антикоагулянтными свойствами.

**Заключение.** Протеолитические ферменты составляют одну из наиболее разнообразных по свойствам групп микробных белков. Благодаря различной специфичности и разнообразным свойствам эти ферменты находят самое широкое применение в биотехнологии и медицине. Недостаток терапевтических средств для лечения сердечнососудистых заболеваний является основой для поиска новых препаратов, в том числе на основе микробных ферментов, поскольку *микроорганизмы* – наиболее предпочтительный источник ферментов ввиду их быстрого роста, методов культивирования и возможности создания генно-инженерных штаммов и белков. При выполнении работы мы получили гомогенные препараты сериновых протеиназ *B. pumilus* 7P с разной специфичностью. Двухстадийная очистка позволила получить глутамилэндопептидазу со степенью очистки в 1280 раз с выходом 10,3%, субтилизиноподобную протеиназу – со степенью очистки в 730 раз и выходом 9,8%. Мы впервые изучили тромболитические свойства этих протеиназ. Установлено, что протеиназы обладают фибринолитической, антикоагулянтной, а также дозозависимой тромболитической активностью. Таким образом, полученные в работе данные указывают на перспективность применения протеиназ бацилл в качестве агентов для создания тромболитических препаратов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Г.Н. Руденской и Л.В. Лютовой за помощь в подготовке фибриновых сгустков и пластин. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

#### Список литературы.

- 1) Kamiya S., Nagimori M., Ogasawara M., Arakawa M. In vivo evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan-induced tail thrombosis in a rat model // Acta Haematol. 2010. V.124, №4. P.218-224.
- 2) Ghasemi Y., Dabbagh F., Ghasemian A. Cloning of a fibrinolytic enzyme (subtilisin) gene from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* // Mol Biotechnol. 2012. V.52,№1. P.1-7.
- 3) Ko J.H., Yan J.P., Zhu L., Qi Y.P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02 // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2004. №137. P.65-74.
- 4) Kim S.B., Lee D.W., Cheigh C.I., Choe E.A., Lee S.J., Hong Y.H., Choi H.J., Pyun Y.R. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean // J Ind Microbiol Biotechnol. 2006. №33. P.436-444.

- 5) Kumar B., Agrawa N., Patra S., Manjunath C.N. Occurrence of Guillain-Barré syndrome as an immune mediated complication after thrombolysis with streptokinase for acute anterior wall myocardial infarction: a caution to be vigilant // *BMJ Case Rep.* 2013. №6. P.840-856.
- 6) Вышлов Е.В., Плотников М.Б., Чернышева Г.А., Алиев О.И., Маслов М.Ю., Гришин О.В., Верещагин Е.И., Троицкий А.В., Марков В.А. Тромболитическая активность тромбовазима в эксперименте // *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2006. №2. С.56-59.
- 7) Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Blagova E.V., Levnikov V.M., Kuranova I.P., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius* strain 3–19. Purification, properties, and crystallization // *Biochemistry.* 1997. V.62,№8. P.903-908.
- 8) Михайлова Е.О., Марданова А.М., Балабан Н.П., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ 73 на разных фазах роста бацилл // *Биохимия.* 2007. Т.72,№2. С.228-235.
- 9) Шамсутдинов Т.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Данилова Ю.В., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. Выделение и характеристика глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста // *Биоорганическая химия.* 2008. Т.34,№3. С.322-326.
- 10) Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. // Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- 11) Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V.227. P.680-685.
- 12) Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н. П-нитроанилиды пироглутамилпептидов – хромогенные субстраты сериновых протеиназ // *Биоорг. химия.* 1987. Т.13,№6. С.748-753.
- 13) Astrup T., Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic aktivitim // *Arch. Biochem. Biophys.* 1952. V.40. P.346-351.
- 14) Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der thrombelastographie, einem neuen untersuchungsverfahren // *Klin. Wochenschr.* 1948. V.26. P.577-583.
- 15) Craik C.S., Page J.M., Madison E.L. Proteases as therapeutics // *Biochem. J.* 2011. №435. P.1-16.
- 16) Hwang K.J., Choi K.H., Kim M.J., Park C.S., Cha J. Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, isolated from Korean traditional Jeot-gal // *J Microbiol Biotechnol.* 2007. V.17,№9. P.1469-1476.
- 17) Mahajan P.M., Nayak S., Lele S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: media optimization, purification and characterization // *J Biosci Bioeng.* 2012. V.113. №3. P.307-314.
- 18) Маликова Л.А. Протеиназы и альдолазы: принципальные подходы к получению практически значимых бактериальных ферментов : дисс. ... канд. биол.наук : 03.00.07. К., 2007. 168 с.
- 19) Yeo W.S., Seo M.J., Kim M.J., Lee H.H., Kang B.W., Park J.U., Choi Y.H., Jeong Y.K. Biochemical analysis of a fibrinolytic enzyme purified from *Bacillus subtilis* strain A // *J Microbiol.* 2011. V.49,№3. P.376-380.