

УДК 577.15.024

АДСОРБЦИЯ КОНСТИТУТИВНОЙ АСПАРАГИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *Candida albicans* НА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ МЕМБРАНЕ

М.П. Кутырева, А.Р. Мухаметзянова, Н.А. Улахович,
А.А. Иванова, Н.И. Глушко

Аннотация

Оценена сорбционная способность протеиназ, выделенных из трех штаммов грибкового аллергена *Candida albicans*, с различной чувствительностью к антимикотическому препарату «Флуконазол» (протеиназа контрольного штамма – SAP_М, штамма, чувствительного к «Флуконазол», – SAP_{чФ}, штамма, не чувствительного к «Флуконазол», – SAP_{нчФ}). Изучена физическая адсорбция и специфическая хемосорбция конститутивных протеиназ *Candida albicans* на нитроцеллюлозной мембране. Методом Скэтчарда определены константы связывания и стехиометрия в системе [секреторная аспарагиновая протеиназа SAP *Candida albicans* – сывороточный альбумин человека]. Характер полученных графиков Скэтчарда говорит о наличии одного специфического участка при взаимодействии хемосорбированных SAP_М и SAP_{чФ} с иммобилизованным человеческим сывороточным альбумином и двух специфических участков связывания субстрата при сорбции SAP_{нчФ}. Значения констант связывания протеиназы – иммобилизованного человеческого сывороточного альбумина составили $K_A = (12.86 \pm 0.01) 10^9$ моль⁻¹ для SAP_М; $K_A = (19.78 \pm 0.05) 10^{10}$ моль⁻¹ для SAP_{чФ}; $K_A^1 = (13.35 \pm 0.05) 10^{11}$ моль⁻¹ и $K_A^{II} = (3.26 \pm 0.07) 10^{10}$ моль⁻¹ для SAP_{нчФ}.

Ключевые слова: секреторная аспарагиновая протеиназа *Candida albicans*, сорбция, адгезия, константы аффинности.

Введение

Знание сорбционной способности физиологически активных соединений является одной из актуальных задач современных научно-практических исследований. Изучение механизма сорбции и свойств сорбированных биосоединений позволяет смоделировать их поведение *in vitro* и определить способы регуляции их деятельности.

Объектом исследований является система протеиназ *Candida albicans* (*C. albicans*), обладающая широкой субстратной специфичностью и многофункциональностью. Высокая патогенная активность грибкового аллергена *C. albicans* обусловлена количеством и многообразием функций вырабатываемых им секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP *C. alb.*) [1]. Система таких протеиназ неразрывно связана с иммунитетом и в настоящее время включает в себя десять изоферментов, обладающих различными функциями и определяющих локализацию и тяжесть кандидиинфекции [1–3]. Объектами исследований послужили индуцируемые SAP *C. alb.* (SAP_{1–3}), проявляющие антигенные свойства,

и конститутивные SAP *C. alb.* (SAP₄₋₆), обладающие преимущественно сорбционными функциями и являющиеся необходимыми для последующей секреции и функционирования протеиназ первой группы. Вся система протеиназ *C. albicans* в современных источниках представлена только клиническими и биологическими показателями. Определено, что их функции включают не только простую роль усвоения молекул для насыщения азотом, а также сотрудничество с главной тканевой инвазией (вторжением) путем разрушения или деформации клеточных мембран, деградации поверхностных молекул, усиления адгезии клеток *C. albicans*, а следовательно, разрушения клеток и молекул иммунной системы, способных противостоять микробной атаке [1]. Вся система протеиназ *C. albicans* относится к классу аспарагиновых протеиназ, активный центр которых образован двумя каталитически активными остатками аспарагиновой кислоты [4].

Адгезия и последующая сорбция *C. albicans* считаются предпосылками развития кандидоза. Сорбционные способности различных штаммов *C. albicans* соотносятся между собой так же, как их патогенные свойства [5]. Однако отсутствует общепризнанная модель для изучения адгезивных и сорбционных свойств гриба.

Для конститутивных секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP₄₋₆) описаны только методики выделения и клиническая картина воздействия на организм [6]. Они обеспечивают адсорбцию SAP к клеточной мембране и являются причиной наиболее опасных системных микозов. Поэтому разработка общих подходов к оценке параметров сорбции конститутивных протеиназ *C. albicans* является необходимой задачей для понимания и прогнозирования патогенности культуры *C. albicans*.

Целью настоящей работы является оценка и сопоставление сорбционной способности конститутивных аспарагиновых протеиназ, выделенных из трех штаммов грибкового аллергена *Candida albicans*, с различной чувствительностью к антимикотическому препарату «Флуконазол».

1. Экспериментальная часть

Адсорбат. В работе использовали протеиназы *C. albicans*, выделенные из надосадочной жидкости при выращивании трех штаммов патогенных грибковых микроорганизмов *C. albicans*: музейного, чувствительного к препарату «Флуконазол» и нечувствительного к препарату «Флуконазол», – по оригинальной методике, разработанной в лаборатории по грибковым аллергенам Казанского НИИ эпидемиологии микробиологии [6–9]. Исходные концентрации составили для SAP_М $c_{SAP} = 9.93 \cdot 10^{-12}$ моль/л, SAP_{чФ} $c_{SAP} = 9.93 \cdot 10^{-12}$ моль/л и SAP_{н/чФ} $c_{SAP} = 3.97 \cdot 10^{-13}$ моль/л. Молекулярную массу выделяемых из трех штаммов *Candida albicans* ферментов контролировали методом электрофореза в присутствии Ds–Na. Для SAP_М молекулярная масса равна 42.8 кДа, для SAP_{чФ} – 42.4 кДа, для SAP_{н/чФ} – 45.2 кДа.

Адсорбент. Использовали мембрану на основе нитрата целлюлозы. Для ее приготовления 0.05 г нитроцеллюлозы растворяли в смеси органических растворителей – этилацетата (1.2 мл) и толуола (0.75 мл). При изготовлении матриц с включенным субстратом добавляли 0.8 мл человеческого сывороточного

альбумина (ЧСА) ($c_{\text{ЧСА}}$ в матрице – 0.0027 г/мл). После перемешивания добавляли 0.06 мл глутарового альдегида (25%, марки Reanal) и затем 2–3 капли гексана в качестве коагулянта. После тщательного перемешивания из этой смеси на стеклянной поверхности чашки Петри ($d = 90$ мм) получали пленку, которую высушивали в потоке воздуха. Готовые пленки хранили в холодильнике при температуре 4 °С.

Определение содержания протеиназы. Проводили спектрофотометрически при $\lambda = 278$ нм. Этот пик соответствует поглощению белковых соединений. Измерения оптической плотности проводили в кюветах, толщина которых равна 1 см на спектрофотометре HITACHI U-2000.

Адсорбцию фермента изучали в буферных растворах (рН 4.0 для SAP_M , рН 4.5 для $\text{SAP}_{\text{чФ}}$ и рН 6 для $\text{SAP}_{\text{н/чФ}}$) при 298 °К. В колбы помещали мембраны с $S = 7.95 \pm 0.005$ см² и добавляли раствор фермента с концентрацией в диапазоне для SAP_M $c_{\text{SAP}} = 0.016\text{--}1.666$ нг/мл, для $\text{SAP}_{\text{чФ}}$ $c_{\text{SAP}} = 0.000048\text{--}0.0048$ нг/мл, для $\text{SAP}_{\text{н/чФ}}$ $c_{\text{SAP}} = 0.0276\text{--}0.53$ нг/мл. Параллельно проводили контрольные опыты с растворами фермента в таких же концентрациях, но без адсорбента. Время адсорбции составило 40 мин.

Константы связывания (K_A) протеиназы с иммобилизованным ЧСА определяли из зависимости $X/(A_0 - X)$ от X (график Скэтчарда), представляющей собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным K_A , и пересекающую горизонтальную ось координат в точке, соответствующей B_0 [10]:

$$K_A = X/(A_0 - X)(B_0 - X) \text{ или } X/(A_0 - X) = K_A B_0 - K_A X, \quad (1)$$

где X – равновесная концентрация фермент – субстратного комплекса, A_0 – общая концентрация фермента в системе, B_0 – рабочая концентрация фермента в системе, $X/(A_0 - X)$ – отношение концентраций связанного и свободного ферментов.

Концентрацию фермента, оставшуюся в растворе после связывания с иммобилизованным ЧСА, определяли спектрофотометрически.

2. Результаты и их обсуждение

Адсорбция белков может сопровождаться необратимыми изменениями структуры белковых глобул, а адсорбционное равновесие, как правило, устанавливается медленно.

В адсорбционных слоях ферментов, как и в растворах, большую роль играют взаимодействия белок – белок, приводящие к образованию ассоциатов различного состава. Поэтому необходимо учитывать межбелковые взаимодействия в адсорбционном слое. Энергия взаимодействия Гиббса белок – белок всегда оказывается меньше, чем взаимодействия белка с носителем. В этом случае, как при обратимой, так и при необратимой адсорбции ферментов максимальная величина адсорбции отвечает образованию только монослоев глобулярного белка. К особенностям адсорбции белков можно отнести и тот факт, что в некоторых случаях ее изучают в очень разбавленных водных растворах. Содержание белка в растворе не превышает долей процента, а содержание буфера – нескольких процентов [11].

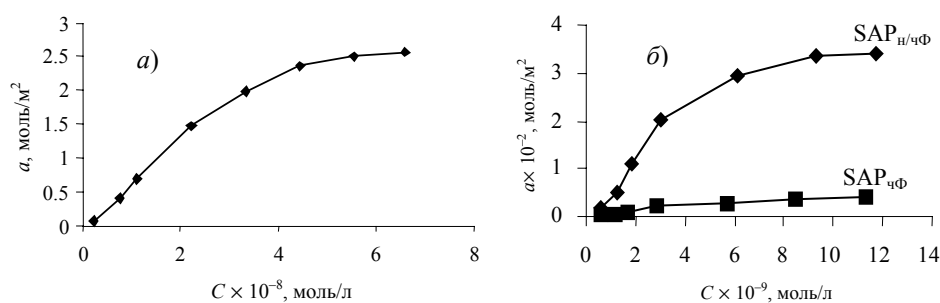


Рис. 1. Изотерма адсорбции SAP_M (а), $SAP_{н/чФ}$ и $SAP_{чФ}$. (б) на нитроцеллюлозной мембране

При построении изотерм адсорбции ферментов (SAP_M , $SAP_{чФ}$, и $SAP_{н/чФ}$) проводили их накопление на нитроцеллюлозной мембране и мембране с включенным человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) из растворов фермента в диапазоне концентраций для SAP_M $c_{SAP} = 0.016\text{--}1.666$ нг/мл, для $SAP_{чФ}$ $c_{SAP} = 0.000048\text{--}0.0048$ нг/мл, для $SAP_{н/чФ}$ $c_{SAP} = 0.0276\text{--}0.53$ нг/мл. Концентрацию фермента, связавшегося с поверхностью мембраны, определяли по разности рассчитанных по градуировочной кривой зависимости значений концентрации фермента до и после адсорбции для каждой начальной концентрации фермента. Концентрацию исходного раствора каждого фермента увеличивали до тех пор, пока при очередном увеличении концентрации исследованного раствора количество молей фермента, связавшегося с поверхностью мембраны с включенным субстратом, не достигнет предельного значения, обусловленного адсорбционной емкостью мембраны. Это свидетельствует о предельном заполнении возможных мест связывания с реакционными центрами расположенных на поверхности мембраны сорбируемым ферментом.

На рис. 1. представлены изотермы адсорбции SAP_M , $SAP_{чФ}$ и $SAP_{н/чФ}$ на нитроцеллюлозной мембране, которые позволяют судить о физической адсорбции фермента за счет сил межмолекулярного взаимодействия и водородных связей, возникающих между аминокислотными остатками фермента и свободными гидроксо- и нитрогруппами адсорбента (нитроцеллюлозы).

В случае адсорбции SAP_M , $SAP_{чФ}$ и $SAP_{н/чФ}$ на нитроцеллюлозной мембране с включенным ЧСА (рис. 2), который и является одним из субстратов для данного фермента, происходит хемосорбция, обусловленная образованием специфического фермент-субстратного комплекса протеиназа-альбумин на поверхности адсорбента.

Специфическую ориентацию фермента при сорбции на мембрану с иммобилизованным ЧСА дополняет возможность электростатического взаимодействия между ферментом и субстратом. Согласно результатам перекрестного иммуноэлектрофореза и электрофореза в натрийдодецилсульфат полиакриламидном геле протеиназа *Candida* определена как гликопротеид *Candida albicans*, имеющий суммарный отрицательный заряд [12]. В данном случае осуществляется дополнительная ориентация протеиназы к катионным группировкам субстрата, расположенным на поверхности адсорбента.

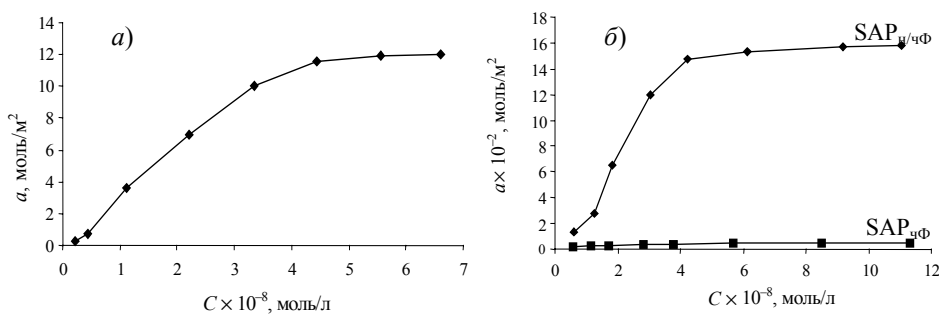


Рис. 2. Изотерма адсорбции SAP_M (а), $SAP_{n/qf}$ и SAP_{qf} (б) на нитроцеллюлозной мембране с включенным ЧСА

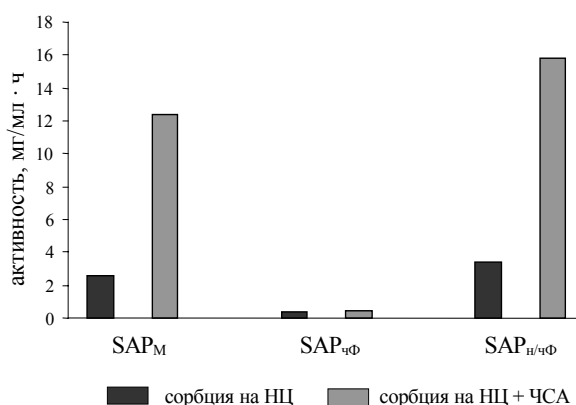


Рис. 3. Величины предельной адсорбции для протеаз SAP_M , SAP_{qf} и $SAP_{n/qf}$

Все полученные изотермы адсорбции подчиняются уравнению Ленгмюра для сорбции различных веществ из растворов на твердую однородную поверхность. Величины предельной адсорбции для протеиназ SAP_M , SAP_{qf} и $SAP_{n/qf}$ представлены на рис. 3.

Для оценки специфической хемосорбции протеиназ *C. albicans* методом Скэтчарда определены константы связывания и стехиометрия [$SAP_{C. alb.} - ЧСА$]. Следует отметить, что способ Скэтчарда в применении к фермент-субстратным системам оказывается особенно полезным, так как позволяет определять константы специфического связывания с несколькими участками макромолекулы фермента [13].

Характер графиков Скэтчарда позволяет оценить количество участков специфического связывания или однородность ферментативной фракции. Концентрацию связанной с иммобилизованным ЧСА протеиназы при постоянной концентрации субстрата в матрице находили по разности между общей концентрацией фермента и оставшейся в растворе после образования фермент-субстратного комплекса. Полученные данные использованы для построения графиков в координатах Скэтчарда (рис. 4–6).

Характер полученных графиков Скэтчарда говорит о наличии одного специфического участка при взаимодействии хемосорбированных SAP_M и SAP_{qf} с иммобилизованным ЧСА и двух специфических участков связывания субстрата

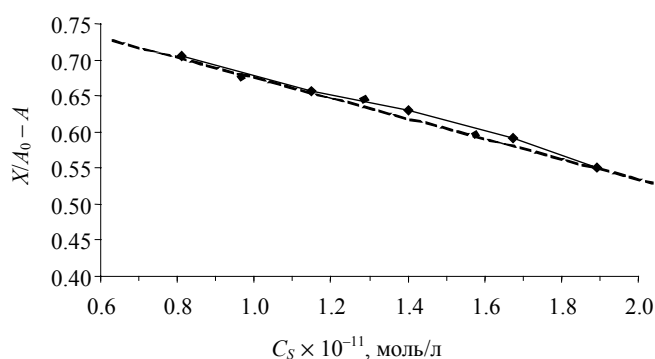


Рис. 4. График Скэтчарда для нахождения констант связывания фермент-субстратного комплекса ($C_{SAP} = 9.93 \cdot 10^{-12}$ моль/л, pH 4.0)

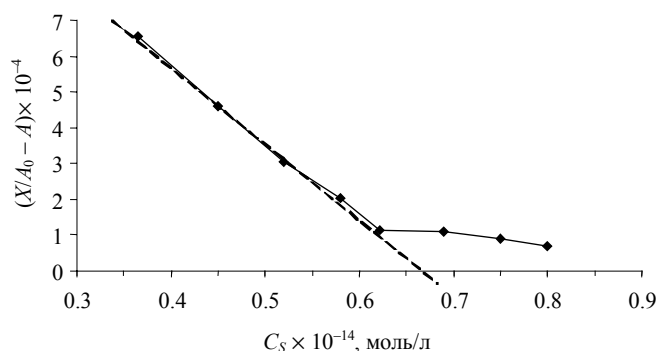


Рис. 5. График Скэтчарда для нахождения констант связывания фермент-субстратного комплекса ($C_{SAP} = 9.93 \cdot 10^{-12}$ моль/л, pH 4.5)

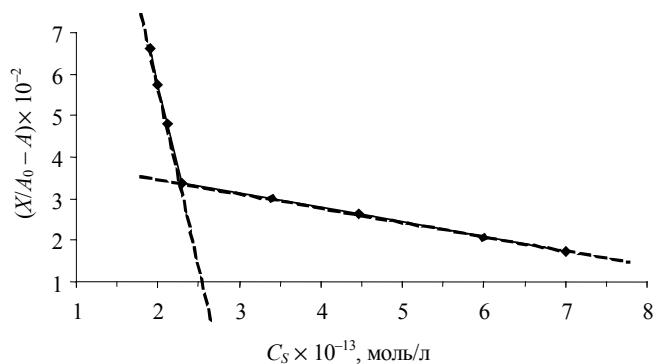


Рис. 6. График Скэтчарда для нахождения констант связывания фермент-субстратного комплекса ($C_{SAP} = 3.97 \cdot 10^{-13}$ моль/л, pH 6.0)

при сорбции $SAP_{н/чФ}$. Рассчитанные по графикам Скэтчарда значения констант связывания протеиназы – иммобилизованный ЧСА составили $K_A = (12.86 \pm \pm 0.01) \cdot 10^9$ моль⁻¹ для SAP_M ; $K_A = (19,78 \pm 0,05) \cdot 10^{10}$ моль⁻¹ для $SAP_{чФ}$; $K_A^I = (13.35 \pm 0.05) \cdot 10^{11}$ моль⁻¹ и $K_A^{II} = (3.26 \pm 0.07) \cdot 10^{10}$ моль⁻¹ для $SAP_{н/чФ}$. Следует отметить, что найденные нами значения констант связывания для SAP_M и $SAP_{н/чФ}$ имеют высокие значения, что указывает на прочность связывания фермента с иммобилизованным субстратом.

Интерес представляют результаты по сорбции протеиназ *C. albicans* с различной чувствительностью к антимикотическому препарату «Флуконазол». При обработке патогенного штамма *C. albicans* малыми дозами фармпрепарата, вероятно, происходит модификация как самого штамма, так и выделяемой им протеиназы SAP_{н/чФ} вследствие включения в структуру фермента триазольного фрагмента «Флуконазола» [14]. Данный эффект сопровождается прежде всего изменением молекулярной массы выделенных протеиназ: SAP_{чФ} имеет молекулярную массу, равную 42.4 кДа, а SAP_{н/чФ} – 45.2 кДа. Модификация фермента триазольной группировки способствует усилению гидрофобных взаимодействий адсорбата с полимерной нитроцеллюлозной мембраной при физической сорбции и приводит к возникновению дополнительных участков взаимодействия с иммобилизованным субстратом, увеличивая сорбционные возможности фермента при специфической хемосорбции протеиназы *C. albicans* с различной чувствительностью к «Флуконазолу». В результате модификации «Флуконазолом» протеиназа *C. albicans* приобретает сорбционные способности подобные и даже превосходящие возможности SAP_М. Последняя обладает максимальной патогенностью и является контрольным ферментом в данном исследовании.

4. Выводы

Предложена методика оценки сорбционной способности протеиназ *C. albicans* на нитроцеллюлозных мембранах. Достаточно простой и экономичный способ получения адсорбента, возможность иммобилизации не только сывороточного альбумина, но других субстратов позволяет определять особенности физической адсорбции и хемосорбции протеолитических ферментов *Candida* на мембранах с постоянными свойствами. Полученные результаты могут быть использованы для оценки влияния различных дозировок фармпрепаратов на сорбционные способности протеиназ *Candida*, позволяют регулировать механизм их инвазии и миграции в организме, а следовательно, управлять патогенностью грибковой культуры *Candida albicans*.

Summary

M.P. Kutyreva, A.R. Mukhametzyanova, N.A. Ulakhovich, A.A. Ivanova, N.I. Glushko.
Absorption of Aspartyl Proteinases *Candida albicans* on a Nitrocellulose Membrane.

The absorption of the secretory aspartyl proteinases (SAP) of three samples of *Candida albicans* with various sensitivity to antimycotic drug “Fluconazole” (control – SAP_М, sensitive to Fluconazole – SAP_{сФ}, and nonsensitive to Fluconazole – SAP_{н/сФ}) was estimated. Physical adsorption and chemical adsorption of *Candida albicans* proteinases on a nitrocellulose membrane were studied. Using Scatchard method, the affinity and stoichiometry constants in system [SAP *Candida albicans* – human serum albumin (HAS)] were determined. The obtained Scatchard plots indicated the presence of one specific binding site at the interaction of chemisorbed SAP_М and SAP_{сФ} with immobilized HAS, and two specific binding sites of the substrate at the sorption of SAP_{н/сФ}. The values of affinity constants were $K_A = (12.86 \pm 0.01) \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1}$ for SAP_М, $K_A = (19.78 \pm 0.05) \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}$ for SAP_{сФ}, and $K_A^I = (13.35 \pm 0.05) \cdot 10^{11} \text{ mol}^{-1}$ and $K_A^{II} = (3.26 \pm 0.07) \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}$ for SAP_{н/сФ}.

Key words: secretory aspartyl proteinases *Candida albicans*, sorption, adhesion, affinity constants.

Литература

1. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67, No 3. – P. 400–428.
2. Calderone R.A., Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans* // *Trends Microbiol.* – 2001. – V. 9, No 7. – P. 327–335.
3. Hube B., Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family // *Microbiol.* – 2002. – V. 147, No 8. – P. 1997–2005.
4. Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W., Hutchins C., Stewart K., Navaza J., Payne C.D., Ray T.L. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents // *Protein Sci.* – 1996. – V. 5, No 4. – P. 640–652.
5. Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans* // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – V. 2, No 4. – P. 353–357
6. Borg-von Zepelin M., Beggah S., Boggian K., Sanglard D, Monod M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 28, No 3. – P. 543–554.
7. Smolenski G., Sullivan P.A., Cutfield S.M., Cutfield J.F. Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes // *Microbiol.* – 1997. – V. 143, No 2. – P. 349–356.
8. White T.C., Miyasaki S.H., Agabian N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans* // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175, No 19. – P. 6126–6133.
9. Schaller M., Hube B., Ollert M.W., Schäfer W., Borg-von Zepelin M., Thoma-Greber E., Korting H.C. In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients // *J. Invest. Dermatol.* – 1999. – V. 112, No 3. – P. 383–386.
10. Кашкин А.П. Иммуноферментный анализ биологически активных веществ – М.: Мед. пром-сть, 1985. – 43 с
11. Атякиева Л.Ф., Полторац О.М., Чухрай Е.С., Пилипенко О.С. Адсорбционные и каталитические свойства β -галактозидазы // *Журн. физ. химии.* – 2002. – Т. 76, № 7. – С. 1314–1317.
12. Macdonald F., Odds F.C. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis // *J. Med. Microbiol.* – 1980. – V. 13, No 3. – P. 423–435.
13. Маршелл Э. Биофизическая химия: в 2 т. – М.: Мир, 1981. – Т. 1. – 358 с.
14. Сергеев А.Ю. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: ООО «Бином-пресс», 2003. – 440 с.

Поступила в редакцию
23.06.10

Кутырева Марианна Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: mkutyrev@mail.ru

Мухаметзянова Алсу Ринатовна – аспирант кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: alsumuhametz@mail.ru

Улахович Николай Алексеевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Иванова Ангелина Александровна – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

Глушко Надежда Ивановна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории грибковых аллергенов Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии.