Аспартат протеазы грибов рода *Candida* – потенциальная мишень для антивирулентной терапии

И.В. ЧЕБОТАРЬ[1]

ГОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития РФ, Нижний Новгород

Aspartate proteases of *Candida* fungi – a potential target for anti-virulent therapy

I.V. CHEBOTAR'

State budgetary educational institution of higher professional education Nizhni Novgorod State Medical Academy, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Nizhni Novgorod

Ключевые слова: кандидоз, грибы рода Candida, фактор патогенности, вирулентность, секретируемые аспартат протеазы, антивирулентная терапия.

Key words: candidiasis, fungi of the genus Candida, pathogenicity factor, virulence, secretory aspartate proteases, anti-virulent therapy.

Наиболее существенное значение в патологии человека имеют грибы рода *Candida*, которые относятся к оппортунистическим инфекциям и являются актуальной проблемой современной медицины. Опасность возникновения кандидозов и тяжесть их течения возрастает при длительной антибактериальной химиотерапии, а также при разнообразных иммунодефицитных состояниях [1]. Грибы рода *Candida* реализуют свой болезнетворный потенциал через набор факторов патогенности, к числу которых относятся адгезины (семейство адгезинов Als, Hwp1, Int1), гифы, внеклеточные энзимы-гидролазы — фосфолипаза Б, липазы, аспартат протеазы [22].

Важнейшим фактором патогенности, обеспечивающим деструкцию тканей человека, являются аспартат протеазы [16], которые, концентрируясь на терминальных окончаниях гиф, обеспечивают непосредственную инвазию кандид в ткани человека. Доктором B. Hube отмечено, что патогенность кандид является мультифакторной, а вирулентность определяется аспартат протеазами [16]. Следовательно, возможность нейтрализации аспартат протеаз может стать эффективным инструментом антивирулентной терапии при кандидозах.

Цель работы — структурно-функциональная характеристика аспартат протеаз дрожжеподобных грибов рода *Candida* и поиск возможных путей фармакологической нейтрализации их активности.

Аспартат протеазы (синоним — аспартильные протеазы) — семейство ферментов-протеаз, в составе активного центра которого имеются остатки аспарагиновой кислоты (Asp) для катализа соответствующих пептидных субстратов. В англоязычной литературе они обозначаются как «aspartic proteases» и имеют много синонимов: «aspartic proteinases», «aspartic endopeptidases», «aspartate proteases», «aspartic-type endopeptidases», «aspartyl proteinases», реже — «acid proteases». В русскоязычных научных текстах часто используется термин «аспартаткислые протеазы» для того, чтобы подчеркнуть оптимальную активность этих ферментов при кислых значениях pH.

В общей биохимической классификации белков по своим молекулярно-функциональным характеристикам они относятся к классу ферментов-гидролаз, гидролизующих пептидные связи в белках, т.е. принадлежат к подклассу ферментов-протеаз. Изученные аспартат протеазы дрожжеподобных грибов являются эндопептидазами, т.е. ферментами, гидролизирующими внутренние, α-пептидные связи в полипептидных цепях (этим они отличаются от амино- и карбоксипротеаз, отщепляющих от полипептидной цепи концевые аминокислоты). Согласно классификации UniProtKB (http://www.uniprot.org), группа EC 3.4.23 «Aspartic endopeptidases» включает более 40 видов аспартат протеаз, выделенных от

© И.В. Чеботарь, 2012

[1]Тел.: +7 (831) 465-4271

Klin Dermatol Venerol 2012;1:33

представителей разных таксономических групп — грибов, позвоночных (в том числе млекопитающих), растений, вирусов [27]. Типовой аспартат протеазой кандид является кандидапепсин (candidapepsin), который относится к группе секретируемых аспартат протеаз (САП; англ. акроним — Sap). В настоящее время установлено, что важнейший в патогенетическом отношении представитель кандид — *Candida albicans* секретирует 10 типов САП. Соответственно, доказано существование 10 генов *C. albicans*, кодирующих белки семейства САП [26]. На рис. 1. представлена дендрограмма, созданная J. Naglik и соавт. [22]: она демонстрирует наличие трех разных групп изоферментов внутри семейства САП. В целом гомология между разными формами этого фермента составляет от 98% (между САП 4 и САП 6) до 20—27% (между САП 7 и другими представителями этого семейства).

Полная последовательность строения аспартат протеазы *C. albicans* была изучена в середине 90-х годов XX века [2]. В этой же работе была построена трехмерная модель молекулы САП. В настоящее время можно легко познакомиться как с аминокислотными последовательностями, так и с трехмерной организацией разных вариантов семейства САП, используя ресурсы базы данных Structure (Национальный центр биотехнологической информации, США). Например, на этом сайте представлен великолепный образец реконструкции 3D-структуры (программа Cn3D 4,3) кандидапепсина 1 или САП 1 (рис. 2), построенный на основе данных C. Borelli и соавт. [6].

Классическим ингибитором аспартат протеаз является пепстатин.

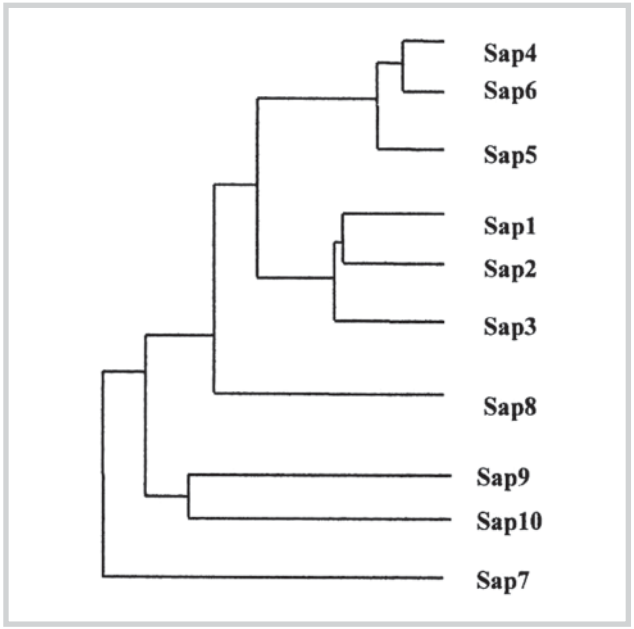

Рис. 1. **Дендрограмма изоферментов группы аспартат протеаз *Candida albicans* [22].**

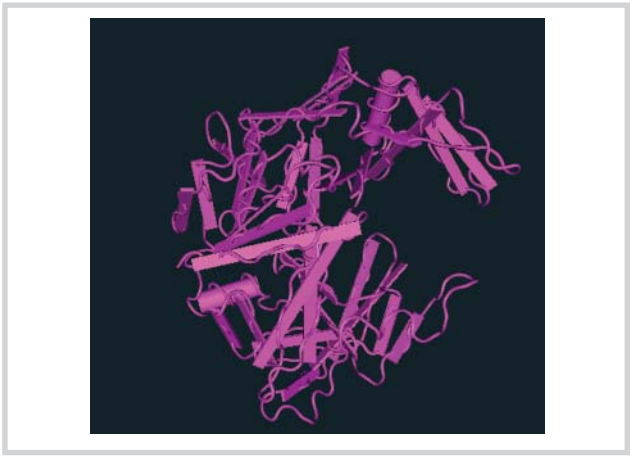

Рис. 2. **Виртуальная 3D-модель кандидапепсина 1 (САП 1), построенная с помощью программы Cn3D 4,3 (Национальный центр биотехнологической информации, США) на основании данных C. Borelli и соавт. [6].**

Молекулярная масса аспартат протеаз кандид составляет около 40 кД и варьирует от 37 кД у САП 5 до 49 у САП 2 [2]. Оптимальная активность разных изоформ САП варьирует в пределах значений pH от 3,2—3,5 (САП 2 и САП 3), 3,2—4,5 (САП 1) до 5,0 (САП 4, САП 5, САП 6) [2].

Ферменты семейства САП продуцируются многими видами рода *Candida*: они идентифицированы у *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* [22].

Сценарий кандидоза определяется субстратами, которые могут стать мишенями для аспартат протеаз. Субстратами для САП могут служить разнообразные простые и сложные белки человека. Среди них — молекулы, защищающие слизистые оболочки человека, например, муцин или секреторный IgA [8, 15]. Доказано, что САП может вызывать прямую деградацию целой группы неспецифических факторов защиты слизистых оболочек — лактоферрина, лактопероксидазы, катепсина D и факторов комплемента [14, 16, 17]. Кроме того, САП могут гидролизировать такие белки, как цистатин A, являющийся ингибитором цистеинпротеазы в клетках человеческого эпидермиса [28]. Инвазия непосредственно в эпителиоциты также осуществляется за счет САП. Активность изоферментов САП в процессе инвазии в ткани может существенно различаться. На модели человеческих кератиноцитов показано, что экспрессия семейства генов САП наблюдалась в начале инвазии в следующем порядке: САП 1 и САП 2>САП 8>САП 6>САП 3; глубокая инвазия — в большей степени САП 8 [26]. Пепстатин A ингибировал процесс повреждения тканей; результаты наблюдения за САП-дефицитными мутантами кандид также свидетельствовали о корреляции между активностью САП и повреждением тканей [26]. Аспартат-протеазы могут оказывать на ткани непрямой по-

вреждающий эффект через активацию воспаления. САП способны вызывать стимуляцию флогогенеза, обеспечивая трансформацию прекурсора интерлейкина-1β (ИЛ-1β) в полноценный (ИЛ-1β), который является цитокином с выраженной провоспалительной активностью [5]. Еще один флогогенный эффект, связанный с САП, был изучен на модели человеческого вагинального эпителия [25]. В этой работе была доказана САП-зависимая стимуляция выработки ИЛ (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), гранулоцитарно-макрофагального колоний-стимулирующего фактора, γ-интерферона (относительно экспрессии цитокинов в неинфицированной ткани). Важнейший плазменный фактор — α_2-макроглобулин человека также подвергается САП-опосредованной деградации [24].

Все перечисленные случаи вскрывают механизмы, с помощью которых кандиды реализуют свой инвазивный потенциал. Неоспоримые доказательства ведущей роли САП в развитии кандидоза получены в многочисленных опытах на животных [22]. Особого внимания заслуживают эксперименты по моделированию местного или диссеминированного кандидоза, в которых активность аспартат протеаз подавлялась ингибиторами (пепстатин); в этих случаях развития патологического процесса не отмечено [13, 22]. Подобные результаты наблюдались при попытке моделирования кандидозного вагинита у крыс с использованием анти-САП-антител, которые оказывали выраженный протективный эффект, тормозя развитие инфекционного процесса [12]. Все эти факты служат прямыми доказательствами того, что аспартат протеазам принадлежит главная роль в патогенезе разных форм кандидоза. Существуют и косвенные доказательства, к которым относятся корреляция между вирулентностью кандид и уровнем продукции САП *in vitro*, повышение уровня экспрессии генов САП при кандидозной инфекции (*in vivo)*, корреляция между САП-продукцией и иммунным ответом хозяина, экспрессией САП и другими факторами патогенности кандид, авирулентность многих штаммов-мутантов кандид, не способных секретировать САП [22].

Однако требуется существенное уточнение. Аспартат протеазы – ведущий, но не единственный фактор инвазии кандид. В работе U. Lermann и J. Morschhauser доказано, что филаменты мутантов *C. albicans*, не способных к секреции аспартат протеаз, могут опосредовать вирулентность кандид. Штаммы-мутанты, дефектные по САП и филаментам efg1D, были авирулентны [19].

Говоря о патогенности, нужно вспомнить о возможности кандид формировать особые микробные сообщества — биопленки [10]. Эту способность в настоящее время можно расценивать как фактор патогенности: внутри биопленок микробы приобретают выраженную устойчивость к эффекторам иммунной защиты и противомикробным препаратам. При росте в форме биопленок *C. albicans* проявляла более выраженную секрецию аспартат протеаз по сравнению с существованием в планктонных формах. Авторы [20], наблюдавшие этот феномен, склонны расценивать его как один из механизмов повышения вирулентности кандид в составе биопленок.

Специфическая инактивация аспартат протеаз возможна при использовании трех подходов: 1) классического метода нейтрализации факторов патогенности на основе антител; 2) создании химиопрепаратов, специфично ингибирующих САП за счет прямого связывания; 3) поиска препаратов, негативно регулирующих экспрессию САП (на уровне генов или посттрансляционных и/или посттранскрипционных событий).

Возможность реализации первого подхода проверена лишь в экспериментальных работах. Нами уже упоминалась работа, в которой показана протективная роль антител к САП при экспериментальных кандидозных вагинитах [12]. К сожалению, за прошедшее с момента публикации время никому не удалось реализовать изложенную в ней идею — препараты на основе анти-САП-антител в клинической практике так и не появились. Это может свидетельствовать о недостатках подобного подхода к антивирулентной терапии кандидоза.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана возможность прямой специфической блокады САП пепстатином, при этом активность кандидозного процесса снижалась [22]. Однако пепстатин не является специфичным для грибковых САП и блокирует активность аспартат протеаз млекопитающих. С этих позиций широкое применение пепстатина для лечения кандидозов является сомнительным.

Первые научно обоснованные теории, предлагающие пути создания фармацевтических препаратов, прямо инактивирующих САП, были предложены в 1996 г. C. Abad-Zapatero и соавт. [2]. В этой работе была создана 3D-модель кандидапепсина и намечены первые уязвимые участки молекулы, воздействие на которые должно вызвать «драматичную альтерацию» фермента. Более того, было доказано, что эти области специфичны для кандид и не встречаются в составе аспартат протеаз млекопитающих — ренина, пепсина, гастрина. Такая автономность, по справедливому мнению авторов, позволяет создать высокоспецифичные ингибиторы главных факторов вирулентности кандид — ферментов семейства САП.

В конце XX века появились антиретровирусные препараты (для лечения ВИЧ-инфекции), действие которых было направлено на ингибирование ВИЧ-специфических ферментов — ревертазы (обратной транскриптазы), интегразы и ретровирусной аспартат протеазы. Практически сразу же после появле-

ния препаратов-ингибиторов ретровирусной аспартат протеазы (ритонавир, саквинавир, индинавир) были предприняты успешные попытки использовать их для лечения экспериментальных кандидозов, вызванных *C. albicans* [7, 18]. Антикандидозный эффект индинавира и ритонавира был сравним с эффектом флуконазола [7]. В работе I. Pichova и соавт. [23] активность ритонавира и саквинавира показана в отношении кандидозов, вызванных разными представителями рода *Candida* – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*.

Серия работ была посвящена исследованию влияния противогрибковых химиопрепаратов на секрецию кандидами аспартат протеаз. Результаты оказались неожиданными. Субингибирующие концентрации флуцитозина, флуконазола, итраконазола, миконазола и каспофунгина вызывали активацию САП, хотя клеточный рост при обработке итраконазолом, миконазолом, флуцитозином и каспофунгином замедлялся [9]. Даже резистентный к азолам и флуцитозину штамм *C. albicans* демонстрировал повышение секреции аспартат-протеаз при обработке флуконазолом [9]. Топически активация САП 4 и САП 6 под воздействием флуконазола и флуцитозина наблюдалась в растущих клетках [4]. Удивительным оказалось то, что другой представитель семейства азолов — фентиконазол вызывал стойкое ингибирование протеиназной активности *C. albicans* даже в концентрациях 0,01 и 1—10 мкг/мл, 5-флуороцитозин ингибировал активность САП в концентрации 1—10 мкг/мл [3]. Подобные результаты получены и в другой работе, в которой фентиконазол в отличие от эконазола тоже вызывал сильное подавление активности САП [11]. В обоих случаях авторы обсуждают полученный эффект с позиции непрямого взаимодействия фентиконазола и протеаз; наиболее вероятное объяснение ингибирования САП связано с воздействием на общие механизмы синтеза белка. Попытка непрямого подавления протеазной секреции *C. albicans* была сделана в работе S. Milewski и соавт. [21]. Авторы использовали антигрибковый агент L-lysyl-L-norvalyl-[N3-(4-methoxyfumaroyl)]-L-2,3-diamino pro panoic acid (Lys-Nva-FMDP), который в минимальных концентрациях угнетал секрецию САП. При этом специфичность ингибирования была выше, чем при использовании фентиконазола.

Анализ большого объема научной информации, посвященной исследованиям аспартат протеаз у грибов рода *Candida*, позволяет рассматривать семейство САП в качестве системы, определяющей вирулентность кандид. Подавление вирулентности за счет специфического ингибирования аспартат протеаз подтверждает тезис о том, что аспартат протеазы могут стать основной мишенью для антивирулентной терапии кандидоза. Можно с уверенностью заключить, что современные достижения молекулярного моделирования позволят создать новые высокоспецифичные препараты для блокады секретируемых аспартат протеаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В.* Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М: Триада-Х 2001; 472.
2. *Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W. et al.* Structure of a secreted aspartic protease from C. albicans complexed with a potent inhibitor: Implications for the design of antifungal agents. Protein Sci 1996; 5: 4: 640—652.
3. *Angiolella L., De Bernardis F., Bromuro C. et al.* The effect of antimycotics on secretory acid proteinase of Candida albicans. J Chemother 1990; 2: 1: 55—61.
4. *Barelle C.J., Duncan V.M.S., Brown A.J.P. et al.* Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous Candida albicans cells in vitro and in vivo. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 2: 315—322.
5. *Beausejour A., Grenier D., Goulet J. P., Deslauriers N.* Proteolytic activation of the interleukin-1 beta precursor by Candida albicans. Infect Immun 1998; 66: 2: 676—681.
6. *Borelli C., Ruge E., Lee J.H. et al.* X-ray structures of Sap1 and Sap5: structural comparison of the secreted aspartic proteinases from Candida albicans. Proteins 2008; 72: 4: 1308—1319.
7. *Cassone A., De Bernardis F., Torosantucci A. et al.* In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. J Infect Dis 1999; 180: 2:453—488.
8. *Colina A.R., Aumont F., Deslauriers N. et al.* Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by Candida albicans secretory aspartyl proteinase. Infect Immun 1996; 64: 11: 4514—4519.
9. *Copping V.M., Barelle C.J., Hube B. et al.* Exposure of Candida albicans to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. J Antimic Chemother 2005; 55: 5: 645—654.
10. *Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1318—1322.
11. *De Bernardis F., Cassone A.* Comparison of the effects of fenticonazole and econazole on the aspartic proteinase secreted by Candida albicans. Contracept Fertil Sex 1996; 24: 2: 163—165.
12. *De Bernardis F., Boccanera M., Adriani D. et al.* Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of Candida albicans vaginitis in rats. Infect Immun 1997; 65: 8: 3399—3405.
13. *Fallon K., Bausch K., Noonan J. et al.* Role of aspartic proteases in disseminated Candida albicans infection in mict. Infect Immun 1997; 65: 2: 551—556.
14. *Germaine G.R., Tellefson L.M.* Effect of pH and human saliva on protease production by Candida albicans. Infect Immun 1981; 31: 323—326.
15. *Goldman R.C., Frost D.J., Capobianco J.O. et al.* Antifungal drug targets: Candida secreted aspartyl protease and fungal wall beta-glucan synthesis. Infect Agents Dis 1995; 4: 4: 228—247.
16. *Hube B.* Candida albicans secreted aspartyl proteinases. Curr Top Med Mycol 1996; 7: 1: 55—69.
17. *Kaminishi H., Miyaguchi H., Tamaki T. et al.* Degradation of humoral host defense by Candida albicans proteinase. Infect Immun 1995; 63: 3: 984—988.

18. *Korting H.C., Schaller M., Eder G. et al.* Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of Candida albicans isolates from HIV-infected patients. Antimicrob Agents Chemoter 1999; 43: 8: 2038—2042.
19. *Lermann U., Morschhauser J.* Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by Candida albicans. Microbiology 2008; 154: Pt 11: 3281—3295.
20. *Mendes A., Mores A.U., Carvalho A.P. et al.* Candida albicans biofilms produce more secreted aspartyl protease than the planktonic cells. Biol Pharm Bull 2007; 30: 9: 1813—1815.
21. *Milewski S., Mignini F, Covelli I, Borowski E.* Specific inhibition of acid proteinase secretion in Candida albicans by Lys-Nva-FMDP. J Med Vet Mycol 1994; 32: 1: 1—11.
22. *Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.* Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67: 3: 400—428.
23. *Pichova I., Pavlickova L., Dostal J. et al.* Secreted aspartic proteases of Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosis and Candida lusitaniae. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem 2001; 268: 9: 2669—2677.
24. *Rüchel R., Boning B.* Detection of Candida proteinase by enzyme immunoassay and interaction of the enzyme with alpha-2-macroglobulin. J Immunol Methods 1983; 61: 1: 107—116.
25. *Schaller M., Korting H.C., Borelli C. et al.* Candida albicans-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. Infect Immun 2005; 73: 5: 2758—2765.
26. *Schaller M., Schackert C., Korting H.C. et al.* Invasion of Candida albicans correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. J Invest Dermatol 2000; 114: 4: 712—717.
27. *Szecsi P.B.* The aspartic proteases. Scand J Clin Lab Invest 1992; 210: Suppl: 5—22.
28. *Tsushima H., Mine H., Kawakami Y. et al.* Candida albicans aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. Microbiology 1994; 140: Pt 1: 167—171.