

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Воздействие протеиназы *Aspergillus fumigatus* на белки плазмы кровиА.А. Осмоловский^{1,*} , Л. Шмидт², А.В. Орехова^{1,3}, В.Г. Крейер¹,
Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров⁴¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12;²Faculty of Science I, Halle-Wittenberg Martin Luther University, Germany, 06108, Halle, Universitätsplatz, 10;³Faculty of Pharmacology and Medicine, University of Rome "La Sapienza", Italy, 00185, Rome, Piazzale Aldo Moro, 5;⁴Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Выделена внеклеточная протеиназа условно-патогенного штамма *Aspergillus fumigatus* D-1 (молекулярная масса ~33 кДа, pI 4,6). Показано, что протеиназа в разной степени гидролизует казеин, фибрин, фибриноген, альбумин и гемоглобин. Однако протеолитическая активность по отношению к глобулярным белкам плазмы крови оказалась сопоставимой с фибринолитической. Протеиназа не коагулировала фибриноген человека, фибриноген быка, а также не свертывала плазму крови человека и кролика без разведения и разведенную в два раза. Была обнаружена активаторная к плазминогену активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1, что может указывать на ее способность к непрямому фибринолизу.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитическая активность, ферментные препараты, *Aspergillus fumigatus*, тромболитизис, изоэлектрофокусирование

Мицелиальный гриб *Aspergillus fumigatus* – условный патоген, широко распространенный в природе, его изоляты выделяются из различных экотопов, от органического компоста до тканей различных органов человека [1–5]. Известны мезофильные и термотолерантные штаммы этого микромицета, протеолитически активные в отношении таких белковых субстратов, как казеин, желатин, фибриноген, фибрин [2, 3, 6]. Считается, что протеиназы *A. fumigatus* выступают в качестве факторов патогенности, усиливая его проникновение в ткани хозяина, а геномный и протеомный анализ выявляют большое количество секретируемых протеиназ, обеспечивающих его чрезвычайную адаптивность во время заражения на основе обширной избыточности генов [7].

Геном *A. fumigatus* кодирует более 100 секретируемых протеиназ, из которых к настоящему времени охарактеризовано менее 15 [8]. Наиболее хорошо изучены свойства металлопротеазы и сериновой протеиназы *A. fumigatus*. Секретция обеих носит индуцибельный характер, что обуславливает их способность гидролизовать при патогенезе различные белки, доступные им в качестве субстратов в организме хозяина [2, 9]. Описанная щелочная сериновая протеиназа Alp1 секретируется преимущественно при прорастании спор *A. fumigatus* в легочной ткани и представляет собой белок с молекулярной массой около 33 кДа, рас-

щепляющий широкий круг белковых субстратов [2, 10]. С секретией именно этой протеиназы связывают различные физиологические реакции на проникновения грибковой инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом [11].

Среди вызываемых посредством протеолитической активности *A. fumigatus* заболеваний – тяжелая астма с грибковой сенсибилизацией, аллергический бронхолегочный аспергиллез [9] и гиперчувствительность дыхательных путей [12]. Показано, что *A. fumigatus* нарушает барьер альвеолярных эпителиальных клеток, секретируя протеиназы, которые действуют вместе, дезорганизуя актиновый цитоскелет и разрушая клетки [5], а также расщепляя белки C3, C4, C5, C1q системы комплемента и иммуноглобулин G [13, 14], уклоняясь таким образом от атаки комплемента хозяина.

Секретция протеиназ *A. fumigatus* в лабораторных условиях, как и секретия других ферментов, зависит от условий культивирования и состава питательной среды. В частности, было показано, что оба типа протеиназ микромицета, сериновые и металлопротеиназы, продуцируются в условиях глубинного культивирования, в то время как в условиях твердофазного культивирования выявлена секретия только сериновых протеиназ [15].

Согласно последним данным, протеиназы *A. fumigatus* могут выступать потенциальными диагностическими биомаркерами при грибном пато-

генезе и, соответственно, рассматриваться как новые мишени для терапии грибковой астмы [11]. В связи с этим актуальным становится расширение представлений о специфичности протеиназы данного микромицета *in vitro* и *in vivo* среди различных белков тканей внутренней среды организма человека.

Целью работы было выделение секретируемой протеиназы *A. fumigatus* D-1 и изучение ее воздействия на белки плазменного гемостаза человека.

Материалы и методы

Получение и фракционирование препарата внеклеточной протеиназы микромицета *A. fumigatus* D-1. Штамм микромицета выращивали в течение 7 сут в пробирке на скошенном сусло-агаре, после чего споры смывали стерильным физиологическим раствором в качалочную колбу объемом 750 мл со 100 мл среды, содержащей сусло, глюкозу и пептон [16]. Культивирование проводили 2 сут при 28°C и скорости вращения платформы 200 об./мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 («BioSan», Латвия). После этого часть полученного посевного материала переносили в качалочные колбы со средой следующего состава (в %): глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05, pH 5,5–6,0 и продолжали культивирование в тех же условиях. По истечении 5 сут культуральную жидкость отделяли от биомассы микромицета фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия) и осаждали из нее внеклеточные белки сульфатом аммония (степень насыщения 0,8). Осадок, содержащий протеазы микромицета, отделяли центрифугированием при 4°C и 15000 g в течение 15 мин на центрифуге Beckman J2-21 («Beckman», Германия). Полученный осадок перерастворяли в 0,001 М Трис-НСl буфере, pH 8,2 и диализовали в диализном мешочке против этого же буфера в течение 12 ч при 4°C, после чего диализат повторно центрифугировали. Для фракционирования выделенных белков супернатант наносили на препаративную колонку для изоэлектрофокусирования (объем 110 мл, «ЛКВ», Швеция). Изоэлектрофокусирование проводили в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга (800 В, 4°C, 36 ч) [17], используя амфолины фирмы ЛКВ (Швеция) с pH 2,5–10. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1,5 мл с помощью коллектора фракций («ЛКВ», Швеция), в которых определяли белок (поглощение при 280 нм), pH и протеолитическую активность. Фракции с наибольшей протеолитической активностью замораживали и использовали для дальнейших исследований.

Электрофоретический анализ выделенной протеиназы *A. fumigatus* D-1. Для подтверждения гомогенности выделенной протеиназы проводили

электрофорез по Лэммли в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) [18]. Для окраски гелей использовали 0,25%-ный раствор Кумасси (бриллиантового голубого) R-250 в 46%-ном этаноле и 10%-ной уксусной кислоте. Молекулярную массу протеиназы определяли в присутствии маркеров Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo Scientific», США).

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ определяли с помощью 1%-ных суспензий казеина по Хаммерштейну («Sigma-Aldrich», США), бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich», США) и гемоглобина лошади («Reanal», Венгрия) по модифицированному методу Ансона-Хагихары [19]. Для реакций брали по 200 мкл пробы и 400 мкл суспензии соответствующего белкового субстрата, приготовленного на 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 8,2), инкубировали 10 мин при 37°C при постоянном встряхивании (600 об./мин). Реакцию останавливали 600 мкл 10%-ной трихлоруксусной кислоты, после чего образцы центрифугировали (12400 g, 10 мин) и измеряли поглощение при 275 нм в супернатанте. Активность выражали в мкмольях тирозина, образовавшегося за 1 мин в 1 мл пробы ($E_{\text{тир}}$).

Плазминоподобную активность (на прогретых фибриновых пластинах) и активность активаторов плазминогена (на непрогретых фибриновых пластинах) определяли по модифицированному методу Аструпа–Мюллертца–Лансена и выражали в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости [20, 21]. Инкубацию фибриновых пластинок с нанесенными образцами фильтрата культуральной жидкости микромицетов проводили в течение 3 ч. Активность выражали в усл. ед./мл.

Изучение коагулирующего действия протеиназы *A. fumigatus* D-1. Способность выделенной протеиназы коагулировать белки плазмы крови определяли по свертыванию 0,4%-ных растворов человеческого и бычьего фибриногена («Sigma-Aldrich», США) и не разведенных или разведенных в 2 раза плазм человека и кролика («Ренам», Россия). В обоих случаях к 200 мкл раствора субстрата добавляли 100 мкл пробы и инкубировали в статических условиях 10 мин при 37°C. 0,1%-ный раствор тромбина («Sigma-Aldrich», США) использовали в качестве положительного контроля.

Тромболизис *in vitro*. Тромболитическую активность протеиназы измеряли гравиметрически, как описано Котбом с соавт. [4, 21]. Для приготовления тромбов в предварительно взвешенных пробирках «Эппендорф» смешивали 200 мкл плазмы человека («Ренам», Россия) и 20 мкл 0,1%-ного раствора тромбина («Sigma-Aldrich», США), выдерживали 30 мин при 37°C, после чего их повторно взвешивали с полученными тромбами. Затем к тромбам добавляли 250 мкл пробы и инкубировали при перемешивании (250 об./мин) при 37°C

в течение 30, 60, 90, 120 и 180 мин. По окончании инкубирования лизат удаляли с помощью фильтровальной бумаги и еще раз взвешивали пробирки, после чего рассчитывали процент негидролизованых тромбов.

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд, для чего к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Кумасси (бриллиантового голубого) G-250 и регистрировали светопоглощение при 595 нм [22].

Расчет выраженности действия протеиназы. Для оценки эффективности действия выделенной протеиназы по отношению к фибрину и к фибриногену рассчитывали соотношения $\Phi A/KA$ и $\Phi A/\Phi GA$, где ΦA – фибринолитическая активность, KA – казеинолитическая активность, ΦGA – фибриногенолитическая активность [23–26].

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic («Eppendorf», Германия).

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выделение внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1 осуществляли путем высаливания внеклеточных белков сульфатом аммония из культуральной жидкости микромицета с их последующим диализом и разделением с помощью препаративного колоночного изоэлектрофокусирования. Результаты разделения внеклеточных белков методом изоэлектрофокусирования пред-

ставлены на рис. 1, из которого видно, что удалось выделить несколько протеолитически активных фракций в диапазоне pI от 4,5 до 5,7 с максимальной активностью при pI 4,6. Электрофорез по Лэммли в присутствии SDS показал содержание во фракции одного полипептида с молекулярной массой около 33 кДа (рис. 2).

Воздействие выделенной протеиназы микромицета на систему гемостаза изучали по двум типам реакций: свертывающим и протеолитическим.

В качестве субстратов для коагулирования использовали плазму крови и раствор фибриногена. Свертывание обоих субстратов должно приводить к образованию визуализируемого тромба. Как видно из табл. 1, протеиназа *A. fumigatus* D-1 не обладала способностью коагулировать ни фибриноген человека, ни фибриноген быка. Аналогичный результат был получен при изучении коагулирования протеиназой плазмы крови кролика и плазмы крови человека, в том числе при их разведении в два раза. Известно, что протеиназы микромицетов различаются по способности оказывать свертывающее воздействие на плазму [27]. Так, например, протеиназа *A. ochraceus* L-1 коагулирует плазму человека вследствие активации фактора X системы гемостаза человека [28].

Таблица 1

Коагулирующее действие протеиназы *A. fumigatus* D-1

Субстрат	Фибриноген человека	Фибриноген быка	Плазма человека 1:1	Плазма человека 1:2	Плазма кролика 1:1	Плазма кролика 1:2
Протеиназа						
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-
Тромбин	+	+	+	+	+	+

В табл. 2 представлены данные по активности протеиназы *A. fumigatus* D-1 в отношении различных белковых субстратов. Выделенная протеиназа

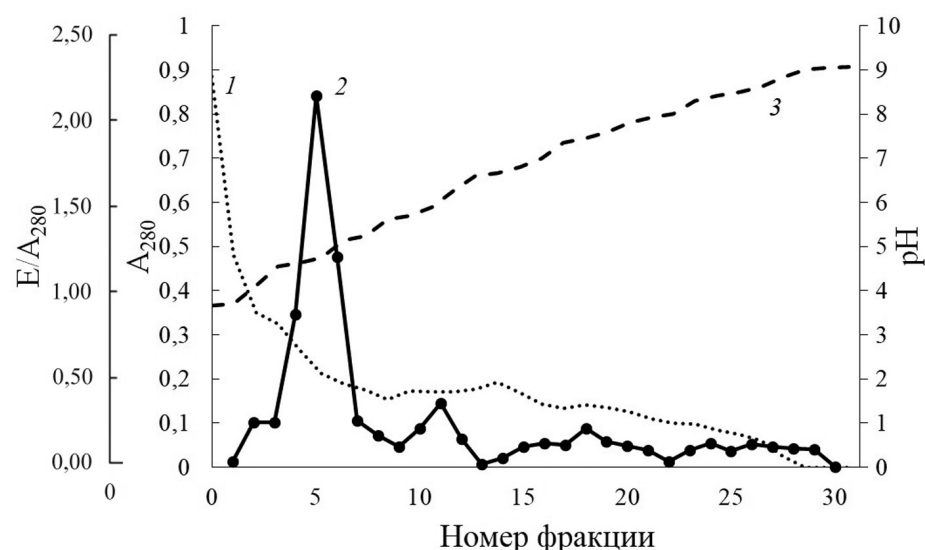


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. fumigatus* D-1: 1 – белок, A280; 2 – протеолитическая активность; 3 – pH.

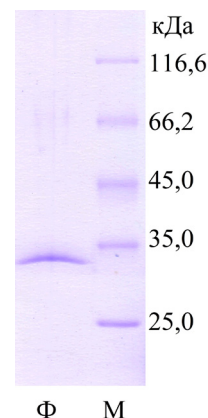


Рис. 2. Электрофорез в SDS-ПААГ протеиназы *A. fumigatus* D-1: Ф – протеолитически активная фракция, М – белки-маркеры молекулярной массы (сверху вниз: β -галактозидаза, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, лактатдегидрогеназа, эндонуклеаза рестрикции Bsp981).

в разной степени гидролизовала казеин, фибрин, фибриноген, альбумин и гемоглобин. Наиболее активный протеолиз среди изученных субстратов был выявлен по отношению к казеину (1363,5 Е_{Тур}/мг белка). Казеинолитическая активность превышала в 4,5–13 раз активность по отношению к другим белковым субстратам (табл. 2). Выделенная протеиназа также была способна эффективно гидролизовать гемоглобин и в меньшей степени фибрин и фибриноген. Фибринолитическая активность протеиназы оказалась сопоставимой с ее альбуминолитической активностью. Показатель выраженности действия протеиназы по отношению к фибрину (соотношение ФА/КА) составил 0,13, а к фибриногену (соотношение ФА/ФгА) – 1,78. Из полученных данных следует, что протеиназа *A. fumigatus* D-1 обладает сродством к фибрину. Для протеиназы другого микромицета – *A. ochraceus* L-1 – соотношение ФА/ФгА превышает соотношение ФА/КА лишь в 2 раза, что может указывать на ее большую специфичность к фибриногену, чем к фибрину [26]. Следует отметить, что непатогенный микромицет *A. ochraceus* L-1 по сравнению с условно патогенным *A. fumigatus* D-1 обладает меньшей казеинолитической активностью. Это подтверждает немногочисленные данные о различии в спектре гидролизуемых белковых субстратов и специфичности протеолитических ферментов микромицетов из разных эколого-трофических групп [29].

Таблица 2

Протеолитическая активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1

Активность	Единицы измерения	Значение активности
Казеинолитическая	Е _{Тур} /мг	1363,5
Фибринолитическая	Е _{Тур} /мг	183,4
Фибриногенолитическая	Е _{Тур} /мг	102,7
Альбуминолитическая (бычий сывороточный альбумин)	Е _{Тур} /мг	201,9
Гемоглобинолитическая	Е _{Тур} /мг	301,6
Фибринолитическая (фибриновые пластины)	Усл.ед./мг	628,4
Активаторная к плазминогену (фибриновые пластины)	Усл.ед./мг	862,7

Также была обнаружена активаторная к плазминогену активность внеклеточной протеиназы *A. fumigatus* D-1, что может указывать на ее способность к непрямому фибринолизу. Ее значение было в 1,4 раза выше фибринолитической активности. Фибринолитическая активность протеина-

зы микромицета в опытах на фибриновых пластинах была сопоставимой с этим показателем для других микромицетов – *A. niger* 29, *A. ochraceus* L-1, *A. versicolor* 1, *Beauveria bassiana* 2 [20].

Обладание сопоставимой протеолитической активностью к глобулярным и фибриллярным белкам плазмы крови протеиназой микромицета *A. fumigatus* D-1, включая способность активировать плазминоген, может свидетельствовать о ее роли в качестве фактора вирулентности и подтвердить участие грибных протеолитических ферментов в патогенезе [29].

На следующем этапе работы проводили оценку способности протеиназы к лизису новообразованных тромбов (рис. 3). Протеиназа *A. fumigatus* D-1 достаточно быстро растворяла тромбы: через 30 мин инкубации остаточная масса тромба составила 35%, через 90 мин – 14%. Полностью тромб был гидролизован за 180 мин. Высокая скорость лизиса тромбов свидетельствует о сродстве протеиназы *A. fumigatus* D-1 к фибрину.

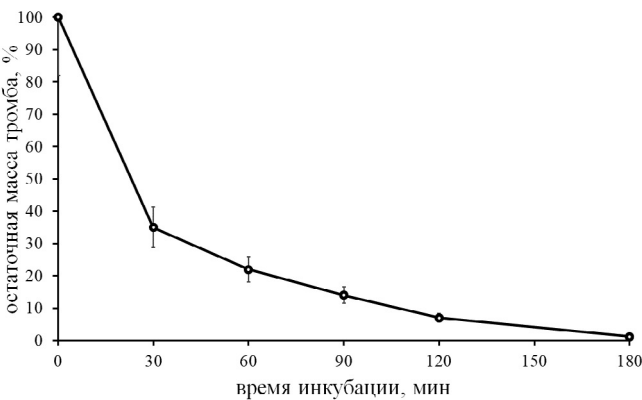


Рис. 3. Динамика тромболитического действия протеиназой *A. fumigatus* D-1.

Таким образом, была выделена в гомогенном виде новая секретируемая протеиназа условно патогенного штамма *A. fumigatus* D-1 и изучена ее протеолитическая активность в отношении различных белковых субстратов. Показано, что, помимо глобулярных белков, протеиназа может гидролизовать фибрин и, по-видимому, выступать в качестве фактора патогенности. Протеиназа не обладала фибриногенсвертывающей и плазмасвертывающей активностью.

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jönsson A.G., Martin S.M. Protease production by *Aspergillus fumigatus* // Agric. Biol. Chem. 1964. Vol. 28. N 10. P. 734–739.
2. Abdel-Rahman T.M.A., Salama A.A.M., Ali M.I.A., Tharwat N.A.H. Fibrinolytic activity of some fungi isolated

from self-heated composted fertilizer // Bot. Mag. (Tokyo). 1990. Vol. 103. P. 313–324.
3. Oyeleke S.B., Egwim E.C., Auta S.H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production // J. Microbiol. Antimicrob. 2010. Vol. 2. N 7. P. 83–87.

4. Kotb E., Helal G.E.-D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // *Biologia*. 2015. Vol. 70. N 12. P. 1565–1574.
5. Kogan T.V., Jadoun J., Mittelman L., Hirschberg K., Osharov N. Involvement of secreted *Aspergillus fumigatus* proteases in disruption of the actin fiber cytoskeleton and loss of focal adhesion sites in infected A549 lung pneumocytes // *J. Infect. Dis.* 2004. Vol. 189. N 11. P. 1965–1973.
6. Bouchara J.-P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G., Chabasse D. Extracellular fibrinogenolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus*: substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1993. Vol. 7. N 1. P. 81–91.
7. Shemesh E., Hanf B., Hagag S., Attias S., Shadkchan Y., Fichtman B., Harel A., Krüger T., Brakhage A.A., Knemeyer O., Osharov N. Phenotypic and proteomic analysis of the *Aspergillus fumigatus* ΔPrtT, ΔXprG and ΔXprG/ΔPrtT protease-deficient mutants // *Front Microbiol.* 2017. Vol. 12. N 8: 2490.
8. Watson D.S., Feng X., Askew D.S., Jambunathan K., Kodukula K., Galande A.K. Substrate specificity profiling of the *Aspergillus fumigatus* proteolytic secretome reveals consensus motifs with predominance of Ile/Leu and Phe/Tyr // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 6: e21001.
9. Farnell E., Rousseau K., Thornton D.J., Bowyer P., Herrick S.E. Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates // *Fungal Biol.* 2012. Vol. 116. N 9. P. 1003–1012.
10. Moutaouakil M., Monod M., Prévost M.C., Bouchara J.P., Paris S., Latgé J.P. Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* *in vitro* and *in vivo* // *J. Med. Microbiol.* 1993. Vol. 39. N 5. P. 393–399.
11. Druet K.M., McCullough M., Krishnan R. *Aspergillus fumigatus* protease alkaline protease 1 (Alp1): a new therapeutic target for fungal asthma // *J. Fungi (Basel)*. 2020. Vol. 6. N 2: 88.
12. Redes J.L., Basu T., Ram-Mohan S., Ghosh C.C., Chan E.C., Sek A.C., Zhao M., Krishnan R., Rosenberg H.F., Druet K.M. *Aspergillus fumigatus* – secreted alkaline protease 1 mediates airways hyperresponsiveness in severe asthma // *Immunohorizons*. 2019. Vol. 3. N 8. P. 368–377.
13. Behnsen J., Hartmann A., Schmalzer J., Gehrke A., Brakhage A.A., Zipfel P.F. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system // *Infect. Immun.* 2008. Vol. 76. N 2. P. 820–827.
14. Behnsen J., Lessing F., Schindler S., Wartenberg D., Jacobsen I.D., Thoen M., Zipfel P.F., Brakhage A.A. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5 // *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78. N 8. P. 3585–3594.
15. da Silva R.R., de Freitas Cabral T.P., Rodrigues A., Cabral H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation // *Braz. J. Microbiol.* 2013. Vol. 44. N 1. P. 235–243.
16. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
17. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins // *Methods in Enzymology*, vol. 22. / Ed. W.B. Jakoby. Cambridge: Academic Press, 1971. P. 389–412.
18. Laemly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227. N 6. P. 680–685.
19. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 62–66.
20. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // *Microbiology*. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
21. Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* // *Applied Biochem. Microbiol.* 2021. Vol. 57. N 1. P. 429–434.
22. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.
23. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.
24. Kim W., Choi K., Kim Y., Park H., Choi J., Lee Y., Oh H., Kwon I., Lee S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. Vol. 62. N 7. P. 2482–2488.
25. Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from Kishk, a traditional Egyptian fermented food // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. Vol. 51. N 1. P. 34–43.
26. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
27. Ключевская В.В., Егоров Н.С. О плазмокоагулирующей и фибринолитической активности грибов рода *Aspergillus* // *Микробиология*. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
28. Orekhova A.V., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility for application of extracellular protease of micromycete *Aspergillus ochraceus* for determining factor X content in human blood plasma // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 117–120.
29. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // *Mycopathologia*. 2011. Vol. 171. N 5. P. 299–323.

Поступила в редакцию 31.01.2021 г.

После доработки 21.03.2021 г.

Принята в печать 05.04.2021 г.

SHORT COMMUNICATION

Effect of *Aspergillus fumigatus* proteinases on blood plasma proteins

A.A. Osmolovskiy^{1,*} , L. Schmidt², A.V. Orekhova^{1,3}, V.G. Kreyer¹,
N.A. Baranova¹, N.S. Egorov⁴

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Science I, Halle-Wittenberg Martin Luther University, Universitätsplatz 10, Halle, 06108, Germany;

³Faculty of Pharmacology and Medicine, University of Rome “La Sapienza”, Piazzale Aldo Moro 5, Rome, 00185, Italy;

⁴International Biotechnological Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: aosmol@mail.ru

Extracellular proteinase of the opportunistic *Aspergillus fumigatus* D-1 strain (molecular weight ~ 33 kDa, pI 4.6) was isolated. It has been shown that proteinase hydrolyzes casein, fibrin, fibrinogen, albumin, and hemoglobin to varying degrees. However, proteolytic activity in relation to globular proteins of blood plasma was comparable to fibrinolytic activity. Proteinase did not coagulate human fibrinogen, bovine fibrinogen, and also did not coagulate human and rabbit blood plasma without dilution and twice diluted. A plasminogen activating activity of *A. fumigatus* D-1 extracellular proteinase was found, which may indicate its ability to indirect fibrinolysis.

Keywords: *proteinases of micromycetes, fibrinolytic activity, enzyme preparations, Aspergillus fumigatus, thrombolysis, isoelectric focusing*

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Шмидт Лаура (Laura Schmidt) — магистр университета Галле-Виттенберга. Тел.: 0345-55-25072; e-mail: laura-schmidt.96@gmx.de

Орехова Анастасия Владимировна — вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: baranovana2012@mail.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru