

На правах рукописи

Константинов Михаил Александрович

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЕКРЕТИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *LYSOBACTER***

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук,
Торопыгин Илья Юрьевич

Научный консультант:

Доктор биологических наук, доцент
Жданов Дмитрий Дмитриевич

Официальные оппоненты:

Лазарев Василий Николаевич,
доктор биологических наук, ФГБУ
«Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины имени
академика Ю.М. Лопухина Федерального
медико-биологического агентства»,
заместитель генерального директора по
научной работе, заведующий лабораторией
генной инженерии

Серебрякова Марина Васильевна,
кандидат химических наук,
МГУ имени М.В. Ломоносова
(Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии имени
А.Н. Белозерского), ведущий научный
сотрудник отдела химии белка

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Защита состоится «23» апреля 2026 года в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Протеолитические ферменты играют ключевую роль в регуляции биологических процессов и находят широкое применение в биотехнологии, фармацевтике, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и экологических технологиях. Одним из перспективных направлений является использование бактериальных протеаз, обладающих бактериолитической активностью, то есть способностью разрушать клеточные стенки других микроорганизмов за счёт гидролиза ее компонентов. Такие ферменты применимы в качестве средств биоконтроля патогенной микрофлоры, ферментных добавок в кормах, агробиологических препаратов.

Особый интерес представляют внеклеточные ферменты бактерий рода *Lysobacter*, известные своей способностью лизировать широкий спектр микробных организмов, что связано с секрецией внеклеточного комплекса литических ферментов. Эти микроорганизмы продуцируют широкий спектр гидролаз, включая сериновые и металлопротеазы, липазы и глюканазы, которые реализуют внеклеточное пищеварение. Хотя ферменты *Lysobacter* обладают высоким биотехнологическим потенциалом, их молекулярная характеристика, включая аминокислотную специфичность и кинетические параметры, остаётся недостаточно изученной.

Традиционные методы изучения активности протеаз, основанные на использовании хромогенных или флуорогенных субстратов, часто не позволяют охарактеризовать природные ферменты с нестандартной или широкой специфичностью. Аналогичные сложности возникают при определении кинетических параметров, прежде всего в тех случаях, когда отсутствуют подходящие коммерческие субстраты для фермента. В таких условиях особенно востребованы универсальные подходы, позволяющие исследовать как специфичность, так и каталитические параметры таких ферментов в условиях, близких к физиологическим.

В настоящей работе объектами исследования были выбраны две внеклеточные протеазы из *Lysobacter capsici* – β -литическая протеаза (Vlp) и протеаза L5, отличающиеся по предполагаемому механизму действия и спектру субстратов. Целью исследования являлось определение аминокислотной специфичности и кинетических характеристик этих ферментов методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) для определения субстратной специфичности и метода количественной масс-спектрометрии с меткой ^{18}O для определения кинетических параметров протеаз. Впервые была представлена полная характеристика сайтов гидролиза Vlp и L5 с использованием программы собственной разработки (CleaveScope), а также проанализированы мотивы аминокислотного окружения сайтов гидролиза. Кроме того, были определены кинетические параметры исследуемых ферментов с применением собственного метода определения кинетических параметров с использованием изотопно-меченых пептидов и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Этот подход позволил получить значения K_M , k_{cat} и k_{cat}/K_M без использования синтетических субстратов.

Цель данной работы – идентификация литически активных ферментов из внеклеточной жидкости представителей группы *Lysobacter*, определение их специфичности и активности для оценки их возможного применения в биотехнологии и биомедицинских исследованиях.

Для достижения указанной цели поставлены следующие **задачи**:

1. Провести идентификацию литически активных протеаз во внеклеточной жидкости бактерий рода *Lysobacter*, обладающих активностью в отношении белковых субстратов.

2. Определить протеолитическую специфичность выделенных ферментов на модельных белках, провести анализ мотивов в окрестности сайтов гидролиза и предположить возможные механизмы действия.

3. Разработать модельную систему для определения кинетических параметров протеаз с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF и изотопно-меченых стандартов.

4. Рассчитать кинетические параметры исследуемых ферментов на выбранных субстратах с использованием предложенного подхода.

Личный вклад автора

Работа была выполнена на базе ИБМХ им. В. Н. Ореховича в период с 2019 по 2025 год. Автором осуществлено планирование и выполнение экспериментальных исследований, включая биоинформатическую обработку данных с использованием разработанных им специализированных программных инструментов. Разработан и реализован подход к определению кинетических параметров протеаз на основе количественной MALDI-TOF масс-спектрометрии с изотопными метками ^{18}O . Предложен способ получения и валидации изотопно-меченых стандартов из продуктов гидролиза модельных белков, а также методика расчёта их концентрации с учётом распределения изотопных форм. Все представленные в работе результаты получены лично автором либо при его непосредственном участии.

Научная новизна работы

Впервые проведена комплексная идентификация сайтов преимущественного гидролиза белков под действием протеаз Vpr и L5, выделенных из внеклеточных везикул *Lysobacter capsici* ВКМ В-2533^T и культуры *Lysobacter capsici* XL1, соответственно. В отличие от ранее опубликованных данных, основанных на ограниченном числе модельных субстратов, в настоящей работе использован подход, основанный на неселективном картировании продуктов гидролиза большого пула белков с последующей идентификацией пептидов методом LC-MS/MS и статистической обработкой результатов. Это позволило получить достоверную информацию о субстратной специфичности ферментов и выявить воспроизводимые аминокислотные предпочтения в окружении сайтов гидролиза.

Также впервые для указанных ферментов были определены кинетические параметры с использованием количественной масс-спектрометрии MALDI-TOF и стабильной изотопной метки ^{18}O , внедряемой методом изотопного обмена. Полученные данные позволили количественно охарактеризовать каталитическую активность Vpr и L5 по отношению к индивидуальным пептидам, что ранее не проводилось.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о специфичности Vpr и L5 позволяют точно определять сайты протеолиза в белках, включая трудногидролизуемые участки, нечувствительные к стандартным протеазам. Это расширяет возможности ферментативной обработки в протеомике, включая анализ рекомбинантных белков без сайтов для трипсина, что показано на примере использования Vpr. Идентифицированные сайты и кинетические характеристики также имеют прикладное значение для разработки антимикробных препаратов на основе ферментов *Lysobacter*, включая потенциальную замену препарата Лизоамидаза, ранее производимого из *L. capsici* XL1. Разработанный метод определения кинетических параметров на основе MALDI-TOF и ^{18}O -меченых пептидов может быть применён для количественной оценки активности различных протеаз без использования флуоресцентных или радиоактивных меток.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Идентифицированы и охарактеризованы две внеклеточные протеазы Vpr из *Lysobacter capsici* ВКМ В-2533^T и L5 из *Lysobacter capsici* XL1, обладающие

протеолитической активностью в отношении белковых субстратов. Показана гомология с литическими протеазами других представителей рода *Lysobacter*.

2. Субстратная специфичность ферментов V1p и L5 определена на основе данных LC-MS/MS. Для определения специфичности разработан универсальный программный инструмент CleaveScore. Впервые построены профили частот аминокислотных остатков, выявлены характерные предпочтения и мотивы, отражающие различия в механизмах действия ферментов.

3. Разработан универсальный масс-спектрометрический подход к определению кинетических параметров протеаз, основанный на использовании изотопно-меченых (^{18}O) пептидных стандартов и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Метод не требует применения синтетических субстратов и позволяет количественно оценивать активность ферментов в нативных условиях.

4. Впервые рассчитаны кинетические параметры K_M , k_{cat} и k_{cat}/K_M для ферментов V1p и L5 на модельных белковых субстратах. Методика оказалась применимой как для фермента с широкой специфичностью и высокой скоростью реакции (L5), так и для фермента, активность которого не удавалось оценить стандартными методами (V1p), что подтверждает универсальность предложенного подхода.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения работы были опубликованы в рецензируемых научных изданиях, а также представлены в виде постерных докладов на 68-й конференции Американского масс-спектрометрического общества ASMS (Virtual ReBoot 2020), VII съезде биохимиков России, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2022), устных докладов на VII съезде биохимиков России, X Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Сочи, 2022), XIX Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток 2022), VI Международной конференции Постгеном 2024 (Москва, 2024).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ – 3 статьи в рецензируемых научных журналах, 2 из которых соответствуют рубрике ВАК по специальности «Биохимия» и 7 в трудах конференций. Также получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, включает 36 рисунков и 9 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы, состоящего из 156 источников.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№122030100168-2)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Определение специфичности V1p с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии

3.1.1. Гидролиз белков с использованием V1p

Для оценки специфичности V1p использовали модельные белки: миоглобин, гемоглобин, казеин, BSA, овальбумин, овомукоид и рекомбинантную енолазу 2 (все – Sigma-Aldrich, США). Белки предварительно очищали от низкомолекулярных примесей ультрафильтрацией через Microcon YM-3. После восстановления концентрации до 1 мг/мл

реакции ставили в буфере 50 мМ NH₄HCO₃ (рН 7,8), при соотношении 4:1 (белок:фермент). Инкубацию проводили при 37 °С в течение 3 часов.

3.1.2. MALDI-TOF анализ

Продукты гидролиза анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker) с лазером Nd:YAG (355 нм). Матрица: 2,5-дигидроксибензойная кислота (10 мг/мл в 50% АСN, 0,35% TFA). Смесь образца и матрицы (1:1) наносили на мишень и сушили на воздухе. Спектры регистрировали в рефлекторном режиме с положительной ионизацией. Параметры MS/MS: модуль LIFT, ускоряющее напряжение 8–29,5 кВ. Обработка данных – FlexAnalysis 3.0. Калибровку проводили внешнюю (стандарт Peptide Calibration II) и внутреннюю (по автолизным пептидам Wp, идентифицированным ранее).

3.1.3. Идентификация пептидов

Идентификацию продуктов гидролиза выполняли с помощью BioTools 3.0 и Mascot (поиск без указания специфичности фермента). Спектры MS и MS/MS объединяли. Также использовали программу GPMW для сопоставления масс пептидов с теоретическими. Учитывались модификации: окисление Met и пропионамидирование Cys. Порог ошибки измерения – 70 ppm.

3.2. Гидролиз белков лизата печени крысы и сыворотки человека ферментами Wp и L5 с последующим LC-MS/MS-анализом

3.2.1. Получение лизата печени крысы

Образцы печени были получены от самцов крыс линии Wistar (5 месяцев, масса 200–240 г). Эвтаназия проводилась под эфирным наркозом методом декапитации в соответствии с Руководством AVMA (2020). Печень промывали физиологическим раствором и замораживали в жидком азоте. Образцы от трёх животных объединяли и гомогенизировали в PBS (рН 7,4) с ингибиторами протеаз, используя роторный гомогенизатор Silent Crusher S (Heidolph, Германия).

3.2.2. Получение сыворотки человека

Сыворотка (1 мл) получена от здорового донора (женщина, 30 лет; ООО «АБМ»). Добровольное согласие и анкета утверждены протоколом №309 независимого этического комитета (ООО «Арте Мед Ассистанс», 25.10.2023). Все процедуры соответствовали Приказу Минздрава №199н (2016) и Директиве 2010/63/EU.

3.2.3. Фракционирование белков методом эксклюзионной хроматографии

Лизат печени (2 мл, ~40 мг белка) инкубировали при +4 °С, центрифугировали (12 000 g, 10 мин), затем разделяли на системе ÄKTA Purifier 10 (Cytiva) с колонкой HiLoad 16/600 Superdex 200 (15 °С, 800 мкл/мин, буфер SEC). Получали 6 фракций. Концентрацию белка оценивали при 280 нм.

Сыворотку фракционировали на той же системе с колонкой Superose 6 10/300 GL (4 °С, 0,3 мл/мин), собирая 10 фракций по 500 мкл. Концентрации белка в обеих сериях определяли методом Бредфорда (ClarioStar, BMG).

3.2.4. Гидролиз белков

Ферменты Wp (штамм ВКМ В-2533^T) и L5 (штамм XL1) получены по ранее опубликованным протоколам [Кудрякова И., 2022; Васильева Н.В., 2014; Васильева Н.В., 2008]. Фракции по 10 мкг белка подвергали восстановлению (10 мМ ТСЕР) и алкилированию (40 мМ САА) при 37 °С, 15 мин. Гидролиз проводили добавлением L5 (3 мкл, 46 мкг/мл) или Wp (3 мкл, 289 мкг/мл) в аммонийбикарбонатном буфере (50 мМ). Для контроля применяли трипсин (10 мкл, 20 мкг/мл). Аналогично обрабатывали и индивидуальные белки (казеин, BSA, CPOX, FXN, PPOX, SULT2A1). Инкубация – при 37 °С, 16 часов.

3.2.5. LC-MS/MS анализ

Образцы обессоливали на C18 StageTips, растворяли в 0,1% муравьиной кислоте и загружали (1–6 мкл) на колонку-ловушку Acclaim PepMap C18 (Thermo). Разделение выполняли на колонке Aurora Ultimate CSI C18 (IonOpticks) с градиентом 2–85% фазы В (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле) за 100 мин при 50 °С, 300 нл/мин. Масс-

анализатор: micrOTOF-QII (Bruker) с источником CaptiveSpray. Режим DDA, диапазон m/z 150-2200, CID-фрагментация, скорость MS1 – 2 Гц, MS/MS – 8-32 Гц. Пробы анализировали в положительном режиме.

Пики обрабатывали в Compass DataAnalysis 5.1, экспортировали в формат MGF и искали с помощью Mascot 2.3.0 (Matrix Science). Параметры поиска: unspecific enzyme, модификации – карбамидометилирование (C), окисление (M), дезамидирование (NQ); допуски – 4,5 ppm (MS), 0.2 Да (MS/MS); заряды – 2+, 3+, 4+; таксономия – *Rattus norvegicus* или *Homo sapiens*.

3.2.6. Биоинформатический анализ специфичности

Стандартный контроль FDR невозможен из-за низкой чувствительности прибора и малых выборок (<100 белков/образец). Вместо этого использовали порог Ion Score ≥ 20 , обеспечивающий стабильность профилей и исключающий случайные совпадения.

Файлы Mascot экспортировали в формате XML с включением последовательностей белков и пептидов, с фильтром $p < 0,05$. Для анализа сайтов гидролиза применялась авторская программа CleaveScore (см. 4.3). Референсный набор для нормализации строили из трипсин-генерированных фрагментов белков сыворотки человека, с использованием «скользящего окна» и Python-скрипта.

Для поиска повторяющихся мотивов из каждого уникального пептида извлекались фрагменты P₂-P₁ и P₃-P₂-P₁, при этом пептиды учитывались однократно. Частотные профили визуализировали в виде тепловых карт, что позволило определить предпочтительные аминокислотные остатки и их окружение.

3.3. Определение кинетических параметров методом изотопного мечения и MALDI-TOF масс-спектрометрии

3.3.1. Получение пептидов для включения изотопной метки

Для валидации методики использовали трипсин как модельный фермент с известными параметрами. Пептид TTMPLW получали гидролизом казеина (15,5 мкМ) трипсином (1,84 мкМ) в 100 мМ аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,8. Для анализа B1p-пептидов (AWYYVPLG, SENSEKTTMPLW, TQYTDAPSFSDIPNPIG) казеин (18,5 мкМ) гидролизовали ферментом B1p (1,69 мкМ) при 37 °С, 30 мин.

Пептиды выделяли через центрифужные фильтры Microcon YM-3 и разделяли методом ВЭЖХ на колонке Luna® C18(2) (5 мкм, 150×4,6 мм). Условия: градиент 4-75% ацетонитрила (с 0,1% ТФУ) за 40 мин, поток 1 мл/мин, 40 °С. Детекция: 215 и 280 нм. Фракции анализировали MALDI-TOF/TOF и концентрировали до 5 мкл. Концентрации рассчитывали по площадям хроматографических пиков, с учётом содержания Tyr/Trp. Пептиды RFFVAPF и RGPFPPIV для анализа L5 были синтезированы.

3.3.2. Введение изотопной метки (изотопный обмен)

Пептиды высушивали в вакуумном концентраторе SpeedVac, затем растворяли в 10% растворе ТФУ в воде, обогащённой ¹⁸O (H₂¹⁸O, ТОО «НПО Изотоп», Россия), и инкубировали при 60 °С от 20 минут до 12 часов. Степень метки контролировали масс-спектрометрически.

3.3.3. Определение кинетических параметров по накоплению продуктов

Для трипсина использовали казеин в концентрациях 5,25; 2,62; 1,51 мкМ и трипсин (0,37 мкМ) в 100 мМ аммоний-бикарбонатном буфере, pH 7,8. Через 5 минут после начала инкубации отбирали пробы (3-10 мкл) и добавляли стандарт TTMPLW-¹⁸O (6,47 мкМ) в соотношениях 1:2, 1:1, 2:1. Образцы перемешивали и немедленно наносили на MALDI-мишень. Пробы отбирали каждые 10 мин до 60-й минуты.

Для B1p использовали казеин (0,89-7,11 мкМ) и B1p (1,69 мкМ). Аналогично отбирали пробы через 5 мин, добавляли 3 мкл изотопно меченых стандартов (AWYYVPLG, SENSEKTTMPLW, TQYTDAPSFSDIPNPIG), перемешивали и наносили на мишень. Пробы отбирали с интервалом 10 мин до 30 мин.

Для L5 применяли казеин (1,28-25,6 мкМ) и L5 (0,15 мкМ). Отбор проб проводили как указано выше, с добавлением стандартов RFFVAPF-¹⁸O и RGPFPiIV-¹⁸O. Пробы отбирали каждые 10 мин до 60 мин и дополнительно через 147 мин.

3.3.4. MALDI-TOF масс-спектрометрия

Образцы готовили и анализировали как в разделе 3.1.2. Использовали матрицу DHB, регистрация – в рефлекторном режиме, тандемные спектры – в режиме TOF/TOF с блоком LIFT. Спектры обрабатывали в FlexAnalysis 3.0 (Bruker): сглаживание – Savitzky–Golay, базовая линия – TopHat, определение пиков – Centroid, порог S/N=4. Значения m/z и интенсивности экспортировали в Excel для расчёта концентраций продуктов реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Идентификация внеклеточных протеаз бактерий рода *Lysobacter* и анализ их гомологии с родственными протеазами

Рекомбинантные белки Vlp и L5 были охарактеризованы методом LC-MS/MS. Покрывание зрелой части молекулы Vlp (179 а.о.) составило 88%, а для L5 (205 а.о.) – 97%, что подтверждает высокую достоверность их идентификации. Диагностические пептиды перекрывали ключевые структурные и каталитические участки, включая сигнальные и активные домены.

Аминокислотная последовательность Vlp полностью идентична β-литической металлопротеазе *Achromobacter lyticus* (100%, E-value $7e^{-136}$), а также имеет высокую гомологию с протеазами *Lysobacter enzymogenes* (97%) и *Lysobacter antibioticus* (84%). Ближайшие гомологи Vlp относятся к семейству металлопротеаз M23, известных своей бактериолитической активностью. В частности, высокая степень сходства выявлена с протеазой LasA из *Lysobacter capsici* AZ78 (98% идентичности, 99% покрытия). Кроме того, гомологи Vlp обнаружены в других родах бактерий (*Montanilitibacter*, *Marilitibacter*, *Kinneretia*), что подчёркивает консервативность структурных мотивов M23-протеаз, ответственных за гидролиз пептидогликана.

Протеаза L5 имеет гомологию с сериновыми протеазами семейства S1A. Наиболее близким аналогом является стрептогризин С (*Streptomyces griseus*), с которым уровень идентичности достигает ~50% при >90% покрытия (E-value до $7e^{-142}$). Также наблюдается сходство с α-литическими протеазами *Lysobacter enzymogenes* и другими представителями рода *Lysobacter*. Это позволяет отнести L5 к трипсиноподобным сериновым эндопептидазам.

Таким образом, оба фермента представляют собой внеклеточные протеазы рода *Lysobacter*, относящиеся к различным семействам – Vlp к металлопротеазам M23, а L5 к сериновым протеазам S1. Совместное присутствие таких ферментов отражает характерную для *Lysobacter* стратегию синтеза комплекса протеаз разной природы, обеспечивающих разрушение как белковых, так и бактериальных субстратов.

4.2. Идентификация Vlp и L5. Определение протеолитической специфичности на модельных белках методом MALDI-TOF MS

Ранее протеолитическая активность Vlp изучалась преимущественно на ограниченном наборе белковых субстратов (например, инсулин, казеин), причём работы 1960-1990-х годов не предусматривали систематического или статистического анализа специфичности. В настоящем исследовании использован подход, основанный на гидролизе отдельных модельных белков с последующим анализом продуктов реакции методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Этот метод из-за своей высокой чувствительности,

простоты пробоподготовки и совместимостью с летучими буферами, подходящими для фермента.

В качестве субстратов использованы миоглобин, казеин, гемоглобин, овальбумин, овомукоид, енолаза 2 и альбумин, что обеспечило разнообразие аминокислотного состава, приближенного к усреднённым значениям в базе Swiss-Prot (рис. 1). Для исключения влияния примесей часть белков предварительно разделяли методом ПААГ-электрофореза с последующим гидролизом исследуемыми ферментами непосредственно в геле.

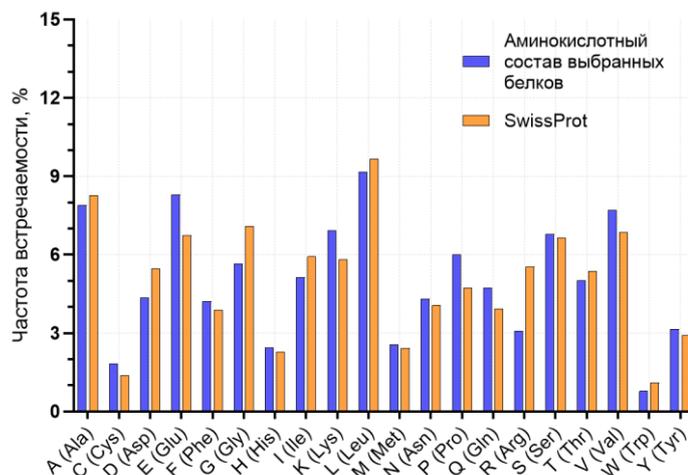


Рисунок 1. Сравнение аминокислотного состава базы Swiss-Prot и набора белков, использованных в качестве субстрата.

По результатам MALDI-TOF MS с последующей верификацией тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) были идентифицированы сайты гидролиза В₁р. Основные аминокислоты в позиции Р₁ представлены в таблице 1. Наиболее часто встречались остатки глицина (44,8%), аланина (23,8%), лизина (13,4%), а также в меньшей степени – аргинина, серина, треонина и других. Таким образом, фермент имеет выраженное предпочтение к мелким или основным остаткам (Gly, Ala, Lys), что позволяет предположить наличие расширенной, но не жёстко ограниченной специфичности.

Таблица 1. Идентифицированные сайты гидролиза В₁р по данным, полученным с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Белок	Идентифицированные сайты гидролиза
Миоглобин	Gly, Lys, Ala, Phe, Ser, Asp, Thr
Альфа-S1-казеин	Gly, Lys, Ala
Гемоглобин (А/В)	Gly, His
Овальбумин	Gly, Ala, Lys, Thr
Овомукоид	Gly, Lys, Ala, Val, Glu
Енолаза 2	Gly, Ala
BSA	Gly, Ala, Lys, Thr, Val, Arg, Cys, Ser

Несмотря на полученные данные, объём выборки (67 сайтов) ограничен, что затрудняет построение надёжной модели специфичности. Поэтому подобный подход следует рассматривать как предварительный, требующий дальнейшего подтверждения более чувствительными методами и на более широком наборе субстратов.

Что касается протеазы L5, то на момент начала исследования экспериментальные данные о её специфичности отсутствовали. Полученные результаты свидетельствуют о более размытом профиле расщепления без выраженного предпочтения к конкретным аминокислотам. Это указывает на необходимость применения более чувствительных

методов – в частности, LC-MS/MS с последующей статистической нормализацией – для надёжной характеристики специфичности L5.

4.3. Разработка и применение программного инструмента CleaveScore для анализа специфичности протеаз

Для количественной оценки вариативной специфичности протеазы L5 был применён подход на основе LC-MS/MS, обеспечивающий идентификацию тысяч пептидов, полученных при гидролизе сотен белков. Однако объём таких данных требует автоматизации, поскольку стандартные поисковые системы (Mascot, MaxQuant и пр.) не предназначены для анализа ферментной специфичности, а специализированные программы (например, IceLogo) требуют заранее подготовленных выровненных фрагментов.

Чтобы автоматизировать обработку большого объёма данных устранить ограничения существующих инструментов, была разработана программа CleaveScore, реализующая полный цикл анализа: от чтения XML-отчётов Mascot до построения тепловых карт и логотипов последовательности (пример – рис. 4). Обработка включает:

1. Исключение дублирующихся пептидов (учёт только уникальных пептидов);
2. Учет уникальных положений остатков P₁, чтобы исключить повторный учёт одного и того же сайта;
3. Исключение терминальных остатков (инициирующий метионин и С-концевые аминокислоты);
4. Одновременный анализ нескольких независимых экспериментов (например, фракции печени и сыворотки).

Для каждого уникального сайта гидролиза программа извлекает окно заданной длины (например, P₁₂-P_{12'}), формируется позиционно-специфичная матрица частот. Однако из-за неравномерного распределения аминокислот в белках (например, в БД Swiss-Prot триптофан встречается в 9 раз реже лейцина) требуется нормализация на фоновый состав аминокислот, рассчитываемая либо по БД в формате FASTA (например, Swiss-Prot), либо автоматически по идентифицированным белкам.

С учётом ограничений существующих решений, в программе реализованы четыре метода нормализации:

1. Прямая нормализация – частоты делятся на фоновые;
2. Z-оценка (глобальная) – стандартизация по всей матрице;
3. Z-оценка (по а.о.) – стандартизация по каждой аминокислоте (вспомогательный режим);
4. Процентное соотношение аминокислот – доля каждой аминокислоты по позициям в процентах.

Разнообразие реализованных методов нормализации обеспечивает гибкий и биологически корректный анализ. Например, в отличие от IceLogo, где метод PD может исказить значимость редких остатков, CleaveScore учитывает как кратность изменения (Fold Change), так и распределение по позициям. Верификация была проведена с использованием хорошо охарактеризованного фермента – трипсина: на тепловой карте, построенной в CleaveScore по глобальной Z-оценке, отчётливо наблюдается доминирование Arg и Lys в позиции P₁ (рис. 2), в то время как методы FC и PD в IceLogo имели менее выразительную визуализацию.

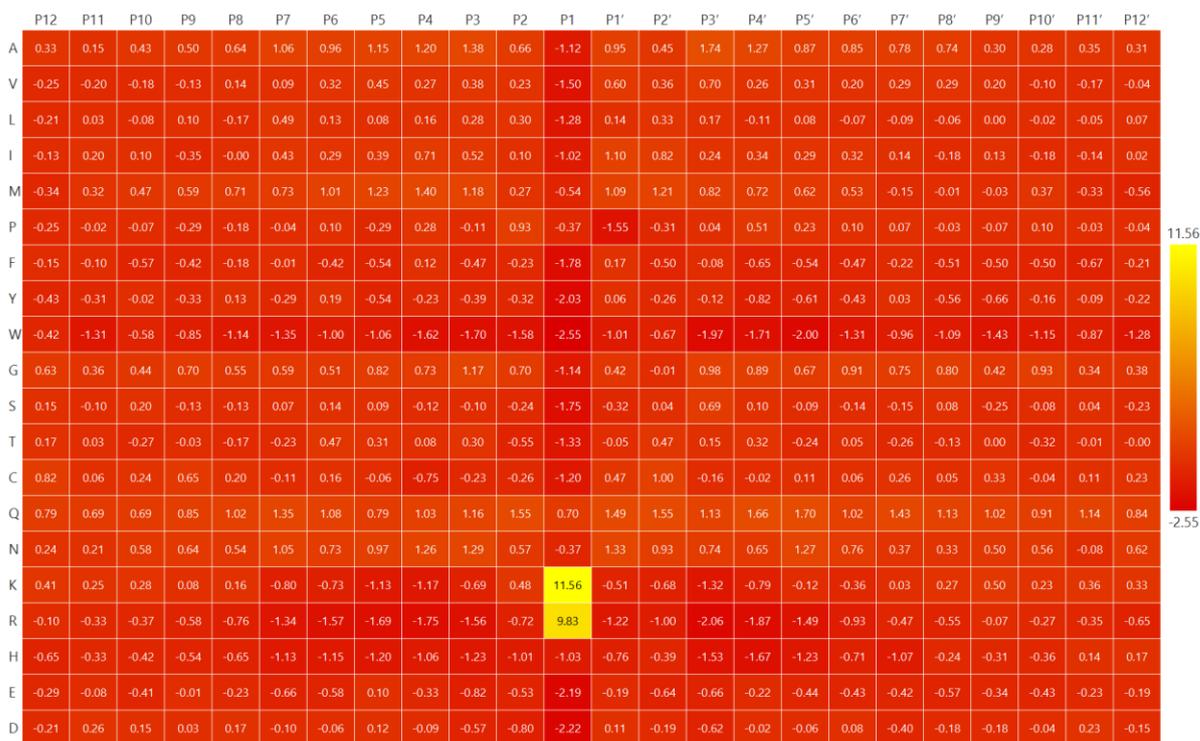


Рисунок 2. Тепловая карта, построенная по экспериментальным данным для трипсина с использованием программы CleaveScore. Данные выражены в виде Z-оценки (глобальной).

Таким образом, CleaveScore обеспечивает воспроизводимый, автоматизированный и статистически обоснованный анализ специфичности протеаз, реализуя несколько режимов нормализации и визуализации, что делает возможной корректную интерпретацию даже при сложной специфичности и большом объеме данных.

4.4. Анализ специфичности протеаз на основе данных LC-MS/MS

Для оценки специфичности протеаз использовали анализ продуктов гидролиза методом LC-MS/MS. Чтобы охватить широкий набор возможных сайтов расщепления, в экспериментах применяли белки из лизата печени крыс и сыворотки крови человека. Эти образцы предварительно разделяли на фракции методом эксклюзионной хроматографии (SEC), что позволило повысить число идентифицированных пептидов и, соответственно, общее количество сайтов расщепления.

Для фермента Vpr проанализировали 8 образцов, в которых определено 314 белков и 1212 уникальных сайтов гидролиза. Для L5 исследовали 9 образцов, выявлено 526 белков и 3442 сайта. При этом анализировали аминокислотный состав в позициях от P₆ до P₅'. Для Vpr основными остатками в позиции P₁ были глицин (419 а.о., 34,5%) и лизин (196 а.о., 16,1%) (рис. 3 А), а для L5 – неполярные аминокислоты: лейцин (532 а.о., 14,8%), валин (370 а.о., 10,6%), аланин (309 а.о., 9%), и фенилаланин (266 а.о., 7,4%), а также по а.о. полярной незаряженной аминокислоты – треонина (273 а.о., 8%) (рис. 3 Б).

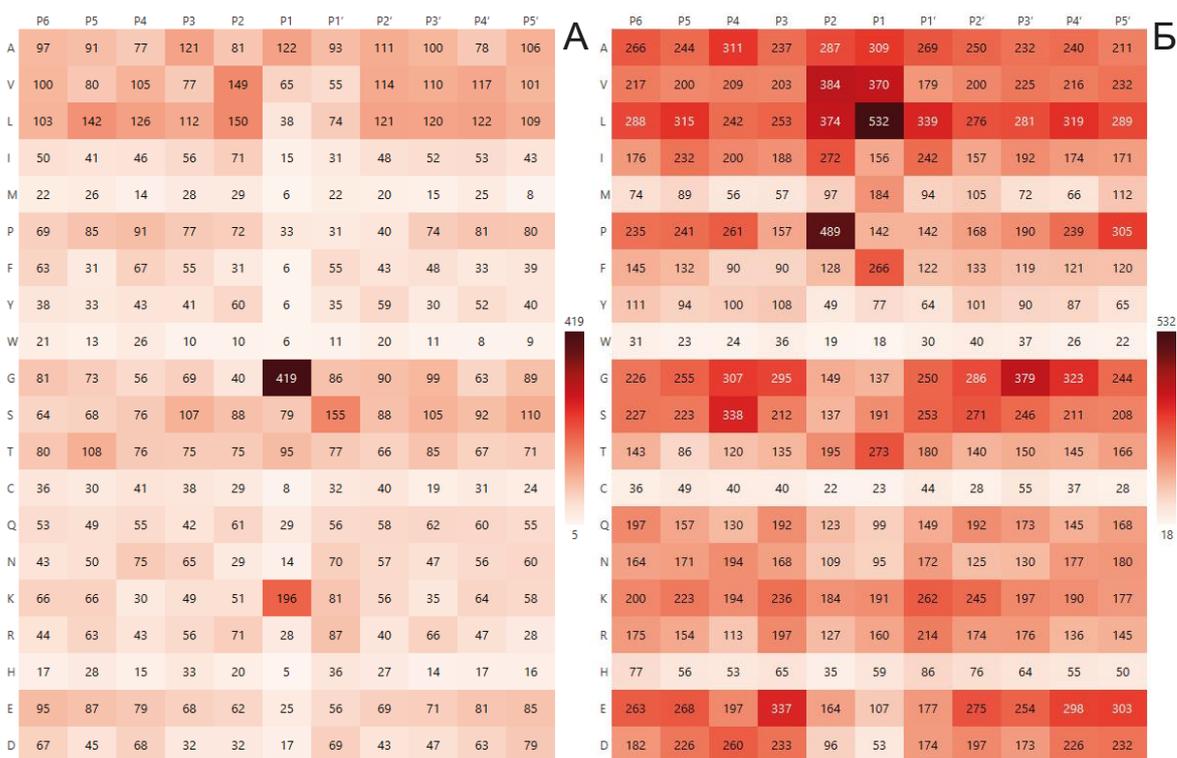


Рисунок 3. Тепловые карты исходных значений частоты встречаемости аминокислот после гидролиза исследуемыми ферментами для V1p (А) и L5 (Б).

Для учёта фонового распределения аминокислот была проведена нормализация данных с расчётом Z -оценки. В качестве фона использовался как аминокислотный состав базы данных Swiss-Prot, так и состав белков, идентифицированных в эксперименте. Корреляционный анализ показал их высокое сходство (коэффициент Спирмена – 0,91 для V1p и 0,93 для L5; коэффициент Пирсона – 0,93 и 0,96 соответственно), поэтому в дальнейшем использовалась нормализация на аминокислотный состав идентифицированных белков как более точно отражающий набор остатков, доступных для фермента в условиях эксперимента.

На тепловых картах (рис. 4 А) и логотипе последовательности (рис. 4 В) для V1p отчётливо видны предпочтения к Gly ($Z = 9,66$) и Lys ($Z = 3,51$) в позиции P₁. В остальных позициях выраженных предпочтений не выявлено. Это подтверждает ограниченную специфичность фермента, ранее наблюдавшуюся при анализе модельных белков методом MALDI и согласуются с предыдущими наблюдениями других авторов (Уитакер Д.Р., 1965; Ахмед К., 2003), где специфичность фермента оценивалась с использованием пентаглициновых пептидов.

Профиль фермента L5 оказался более разнообразным. В позиции P₁ выявлены аминокислоты с разной степенью предпочтения – метионин, фенилаланин, лейцин, валин и треонин (рис. 4 Б, Г). Для сравнения нормализованных данных с использованием Z -оценки и исходных частот аминокислот была рассчитана так называемая «локальная» Z -оценка, основанная на средних значениях и стандартных отклонениях, полученных отдельно по каждой позиции.

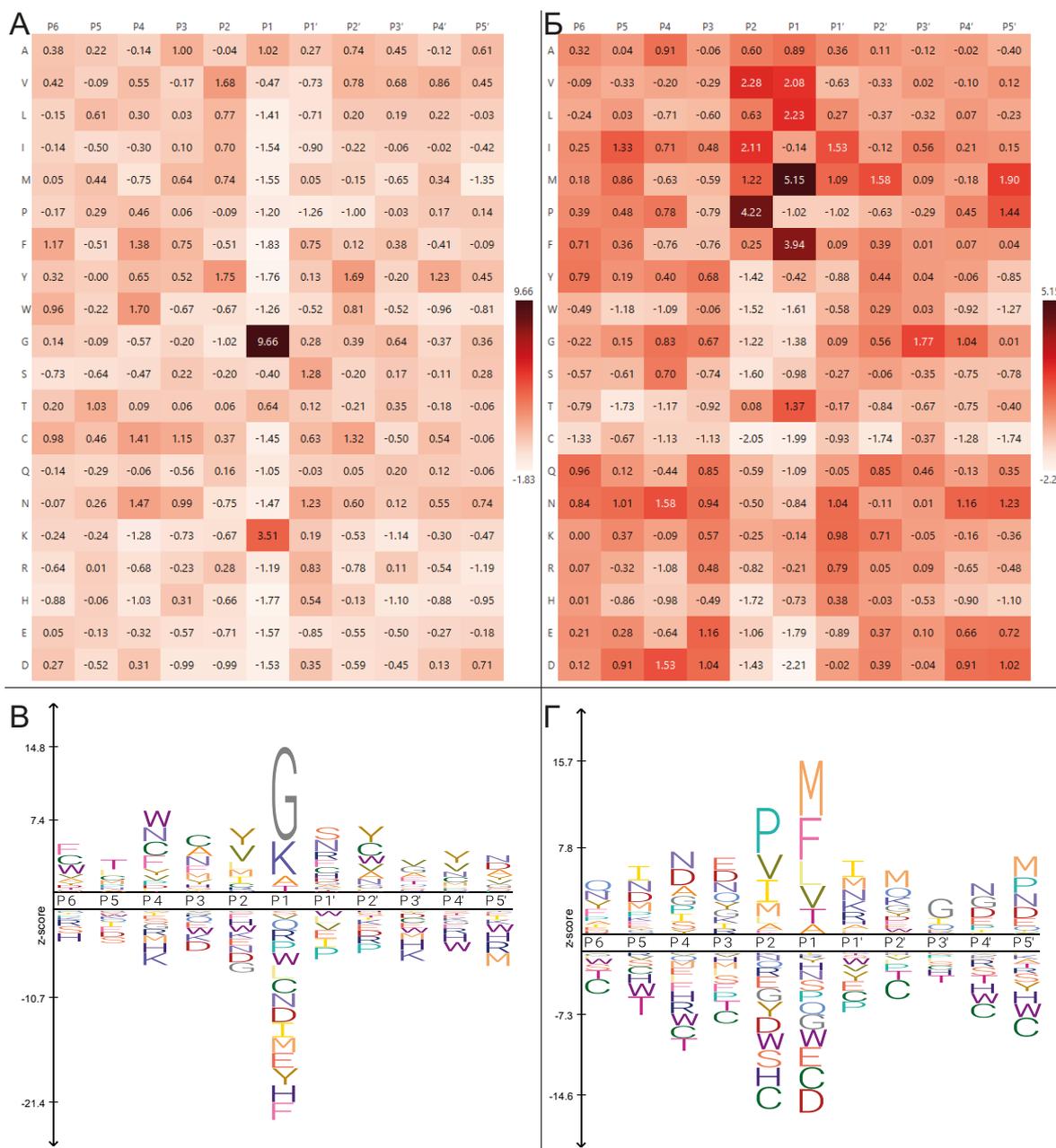


Рисунок 4. Тепловые карты специфичности фермента Vpr (A) и L5 (Б) и логотипы последовательности фермента Vpr (В) и L5 (Г), нормализованные на аминокислотный состав экспериментального набора данных. Данные представлены в виде Z-оценок.

Результаты, полученные с использованием такой «локальной» Z-оценки (на основе частот в позиции P₁), показали наибольшее отклонение у лейцина (Z = 3,04) и валина (Z = 1,70), тогда как метионин (Z = 0,15) имеет умеренное значение (рис. 5 А). Напротив, при глобальной нормализации, где учитывается фоновое распределение аминокислот в белках, подвергшихся гидролизу, наиболее значимыми стали метионин (Z = 5,15) и фенилаланин (Z = 3,93), тогда как частота встречаемости лейцина и валина менее выражена (Z = 2,23; Z = 2,07) (рис. 5 Б). Таким образом, при локальной нормализации доминирующими субстратами для фермента кажутся лейцин, валин и аланин, тогда как при учете аминокислотного распределения наиболее часто встречающимся а.о. являются метионин и фенилаланин, лейцин валин и треонин. Это еще раз подчеркивает, что интерпретация специфичности очень зависит от метода обработки данных.

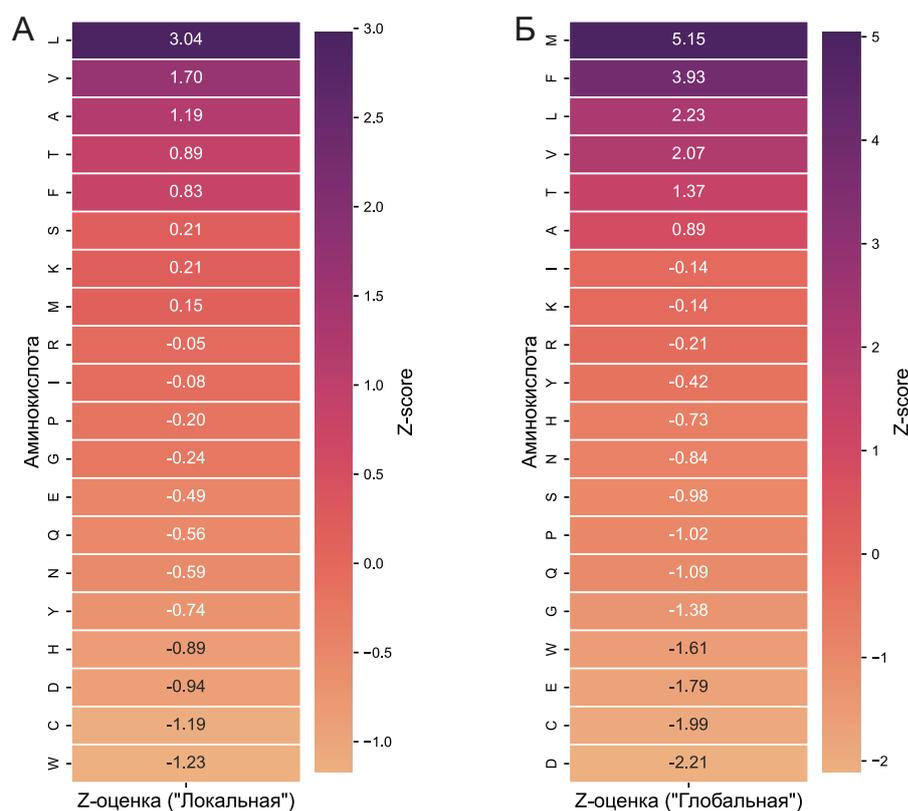


Рисунок 5. Частота встречаемости аминокислот в позиции P₁ при анализе специфичности фермента L5 без учёта (А) и с учётом (Б) аминокислотного состава набора данных. В обоих случаях значения представлены в виде Z-оценок.

Одним из наиболее неожиданных наблюдений при анализе специфичности фермента L5 стала стабильно высокая частота встречаемости пролина в позиции P₂ (Z = 4,22), что предполагает его возможную роль в распознавании субстрата. Однако для оценки таких эффектов требуется дополнительный анализ мотивов окружения сайта гидролиза.

4.5. Статистический анализ мотивов в окрестности сайтов разреза, сравнительный анализ с трипсином.

Для многих сериновых протеаз пролин, известен как неблагоприятный остаток в P₁ и P₁', поскольку его циклическая структура ограничивает гибкость пептидной связи. На этом фоне, высокая частота встречаемости пролина в P₂ у L5 может играть иную роль, не препятствуя, а возможно – способствуя распознаванию и гидролизу. Это наблюдение позволило выдвинуть гипотезу о специфичности фермента не к отдельным аминокислотам, а к коротким мотивам, например дипептидам вида P–M, P–F и т.д.

Большинство программ анализа специфичности оценивают избыточность отдельных остатков в каждой позиции по сравнению с фоновым составом. Даже такие инструменты, как IceLogo, использующие метод «скользящего окна», фактически не учитывают контекст – сочетания аминокислот в смежных позициях. Поэтому важно оценить, связана ли частота пролина в P₂ с какими-либо предпочтениями в соседней позиции P₁.

С этой целью был проведён сравнительный анализ двух выборок: (I) пептиды с пролином в P₂ и (II) пептиды без пролина в P₂. В том случае, если фермент распознает специфический мотив P–X, в группе I следовало бы ожидать суженный спектр остатков в P₁. Однако распределения в обеих группах оказались схожими (рис. 6): аминокислоты L, V, A, S, T встречались с сопоставимой частотой. Это свидетельствует об отсутствии выраженного предпочтения к дипептидным мотивам типа P–X.

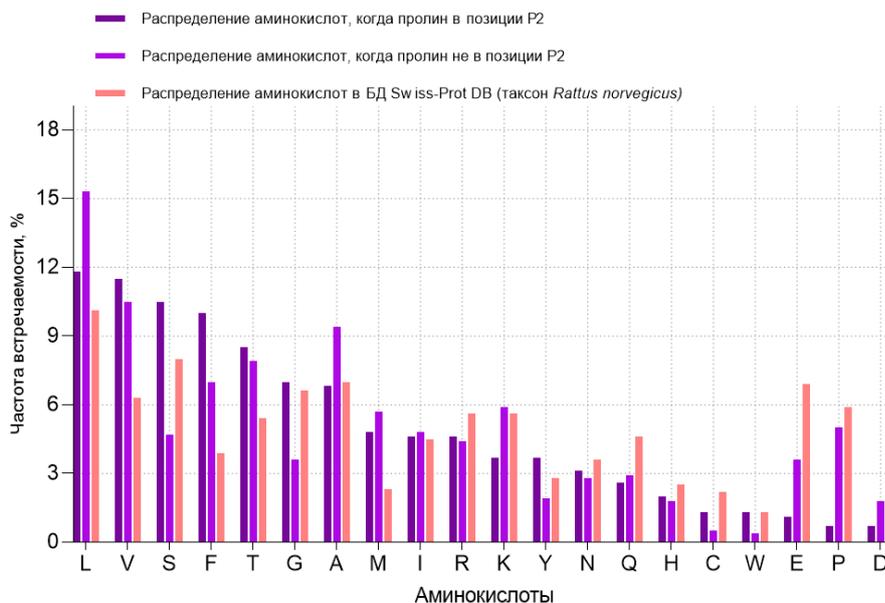


Рисунок 6. Распределение аминокислот в базе данных Swiss-Prot (*Rattus norvegicus*) и в позиции P₁ пептидов, гидролизованных ферментом L5 в двух вариантах: при наличии пролина в позиции P₂ и при его отсутствии. Данные представлены в виде процентной частоты встречаемости аминокислот.

Дополнительно была построена тепловая карта частот всех пар остатков в позициях P₂–P₁ (рис. 7 А). Несмотря на высокую частоту пролина в P₂, он встречался в сочетании с множеством различных остатков в P₁ – от гидрофобных (L, V, F) до полярных (S, T).

Для оценки статистической значимости пар использована Z-нормализация по фоновому составу идентифицированных белков (рис. 7 Б). Наиболее выраженные значения показали пары I–M (Z = 8,86), V–M (Z = 5,66), P–F (Z = 5,31), P–M (Z = 4,9). При этом пролин по-прежнему встречался в сочетании с широким спектром остатков, что говорит о слабой селективности к конкретным P₂–P₁ мотивам.

Известно, что фермент L5 способен расщеплять связи после фенилаланина в синтетических пептидах (таких как Abz-Ala-Ala-Phe-pNA), а также связи Gly–Gly в пептидогликане *S. aureus*. Однако ранее такие наблюдения ограничивались узким набором субстратов. Полученные нами данные позволяют предположить, что специфичность L5 может быть связана с конформацией субстрата.

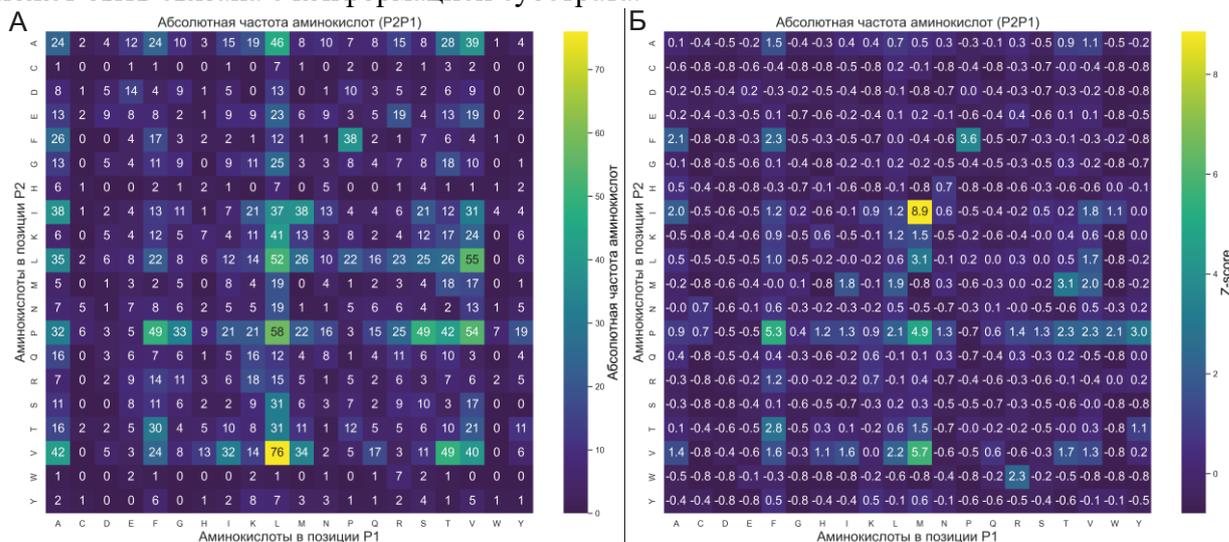


Рисунок 7. А – тепловая карта частоты встречаемости аминокислотных пар P₁–P₂, получаемых в результате гидролиза ферментом L5. Цветовая шкала отражает абсолютное число наблюдений каждой пары остатков в соответствующих позициях. Б –

нормализованная тепловая карта частоты встречаемости аминокислотных пар P₁-P₂. Цветовая шкала отражает число наблюдений каждой пары остатков в соответствующих позициях, выраженное в Z-score. По оси абсцисс указаны аминокислоты в позиции P₁ (аминокислота до сайта разреза), по оси ординат – аминокислоты в позиции P₂ (две аминокислоты до сайта разреза).

Как показали Ванхуф и соавт. (1995), мотивы с пролином часто формируют конформации, устойчивые к протеолизу, что делает расщепление в таких участках редким. Высокая частота пролина в P₂ указывает на способность L5 связывать такие участки, преодолевая их естественную устойчивость к гидролизу. Это согласуется и с тем, что глицин, напротив, крайне редко встречался в местах расщепления. Следовательно, наблюдаемое ранее расщепление Gly–Gly-связей может быть обусловлено не специфичностью к глицину, а его структурной доступностью в пептидогликане.

В пользу этого говорит также частое появление мотивов вида G–X–M/F/L/T/V, обнаруженных 125 раз среди уникальных пептидов, которые, вероятно, соответствуют гибким участкам белковой цепи: глицин повышает доступность связи, а гидрофобные остатки – эффективность связывания. Однако, если бы пролин в P₂ был главным определяющим фактором специфичности, распределение остатков в P₁ при его наличии должно было бы приближаться к фоновому, чего не наблюдается: сравнение с базой Swiss-Prot (*Rattus norvegicus*) выявило различия. Кроме того, число событий гидролиза с пролином в P₂ (489) существенно ниже, чем без него (2955), что также указывает на ограниченную роль этого остатка. Таким образом, специфичность L5, вероятно, формируется не только за счёт аминокислотного состава, но и за счёт конформационных особенностей – изгибов, поворотов и локальной гибкости цепи, которые может стабилизировать пролин.

4.6. Сравнительный анализ специфичности ферментов Vpr и L5 по длине идентифицированных пептидов

Ранее специфичность Vpr исследовалась на отдельных белках и синтетических субстратах с флуоресцентными или хромогенными метками. Однако такой подход имеет ограниченную информативность: синтетические пептиды не отражают всего разнообразия аминокислотных последовательностей, а короткие субстраты с остатками глицина не подвергались гидролизу, вероятно, из-за способности Vpr избирательно «пропускать» потенциальные сайты.

Анализ пропущенных сайтов гидролиза (missed cleavages) при действии Vpr показал, что среди 629 идентифицированных уникальных пептидов 44% (если учитывать только сайты глицина) или 33,5% (если учитывать сайты глицина и лизина) содержали один или более пропущенных сайтов. В совокупности 45,8% всех пептидов имеют один или более пропущенных сайтов гидролиза. Это свидетельствует о том, что даже при наличии узнаваемых остатков глицина, фермент способен не расщеплять соответствующие пептидные связи.

Для того, чтобы понять предпочтения фермента в отношении размера продукта, был проведен сравнительный анализ длин всех идентифицированных уникальных пептидов Vpr и L5. Средняя длина пептидов, образованных в результате гидролиза Vpr, составила $14,85 \pm 7,26$ аминокислот (медиана – 13, мода – 10), тогда как пептиды, гидролизованные ферментом L5, были значительно короче – в среднем $8,5 \pm 2,4$ аминокислоты (медиана и мода – 8). Для сравнения также была проанализирована длина пептидов, полученных в результате гидролиза той же белковой смеси трипсином. В этом случае средняя длина пептидов составила $13,8 \pm 6,7$ аминокислоты (медиана – 12, мода – 8).

Эти различия могут отражать разную пространственную организацию активных центров и механизмы действия. L5, вероятно, не ограничен по длине субстрата и способен к последовательным расщеплениям, что объясняет образование коротких продуктов. Такая множественная специфичность характерна для ферментов, участвующих в бактериолизе.

Несмотря на широкую специфичность, в растворимой форме L5 проявляет низкую литическую активность, которая резко возрастает при секреции через везикулы внешней мембраны. Это указывает на его вспомогательную роль в бактериальном секретоме. Напротив, Vpr обладает узкой специфичностью (Gly, Lys) и высокой лизирующей активностью, что указывает на его основную роль в разрушении клеточной стенки.

Таким образом, Vpr и L5 дополняют друг друга: первый выполняет функцию основного литического фермента, тогда как второй действует как вспомогательная протеза с более широкой, но менее выраженной специфичностью.

Аналогичный профиль гидролиза, характеризующийся образованием схожих по длине пептидов, был ранее описан для фермента Alp [116]. Интересно, что как WaLP (дикий тип Alp), так и MaLP (мутантный вариант Alp) преимущественно расщепляют пептидные связи после алифатических аминокислот (WaLP – A, V, T и S; MaLP – L, F и V), то есть имеют схожий профиль специфичности с L5. Однако средняя длина пептидов, образуемых WaLP ($11,7 \pm 4,8$ а.о.) и MaLP ($12,0 \pm 4,5$ а.о.), ближе к Vpr, чем к L5. Более короткие фрагменты, образуемые L5, возможно, являются результатом последовательных множественных расщеплений – свойства, характерного для ферментов, участвующих в бактериолизе.

4.7. Определение кинетических параметров с использованием количественной масс-спектрометрии с метками ^{18}O

Для количественного определения продуктов протеолиза использован метод масс-спектрометрии с изотопной меткой ^{18}O , основанный на сравнении интенсивностей пиков немеченого и изотопно-меченого пептида. Метка ^{18}O внедряется в С-концевую карбоксильную группу пептида при инкубации в H_2^{18}O . Изотопный стандарт с известной концентрацией добавлялся в реакционную смесь, и по соотношению площадей пиков рассчитывалась концентрация продукта. На основе полученных значений начальной скорости (V_0) строили кинетические кривые и рассчитывали параметры K_M , K_{cat} и K_{cat}/K_M .

Метод апробирован на трипсине и далее применён для определения кинетических параметров ферментов Vpr и L5. Унифицированная схема анализа позволила корректно сравнить их каталитические параметры.

4.7.1. Получение стандартов пептидов, определение концентрации и подтверждение изотопного обмена

Пептиды для стандарта получены из гидролизатов белков, путем очистки на обращенно-фазовой хроматографии, либо синтезированы (для фермента L5). Для количественного анализа отбирались короткие стабильные пептиды – предпочтительно терминальные, не подверженные дальнейшему расщеплению. Это снижало интерференцию в масс-спектре и упрощало интерпретацию. Дополнительным критерием была минимальная вероятность наложения изотопных кластеров других пептидов в области целевого сигнала.

В случае, если выбранный пептид является промежуточным продуктом и может подвергаться дальнейшему гидролизу, его наблюдаемая концентрация определяется разностью скоростей двух реакций: образования (V_1) и расщепления (V_2). При $V_1 \gg V_2$ на начальных стадиях реакция описывается только V_1 . Однако расчёт кинетических параметров в таком случае отражает лишь первую стадию, а не полное превращение. Предпочтение отдавалось конечным продуктам без сайтов дальнейшего расщепления.

Степень обмена кислорода оценивали масс-спектрометрически, регистрируя образец пептида в течение 3 часов. Через 2 часа интенсивность пика немеченого пептида составляла менее 1% от основного пика с двумя атомами ^{18}O . В среднем, 81% молекул содержали два атома ^{18}O , 18% – один, и только 1% оставались немечеными (рис. 8).

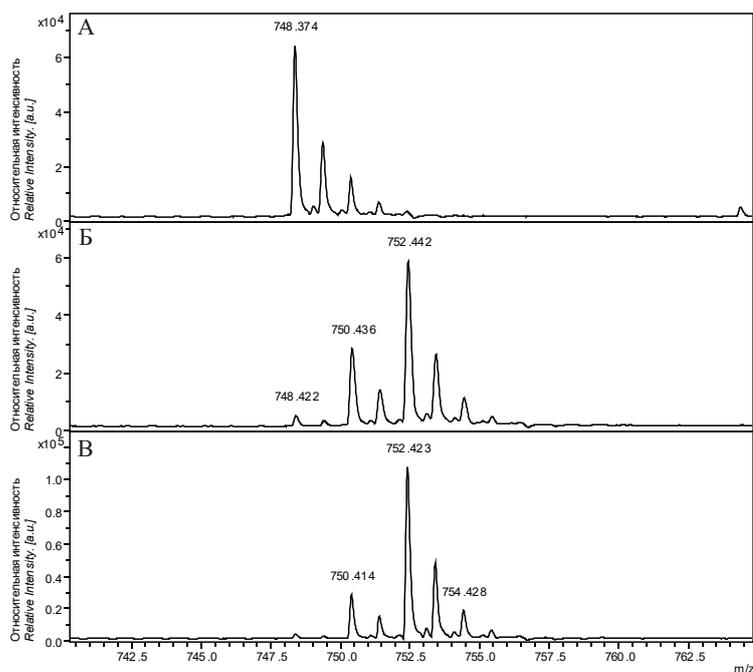


Рисунок 8. Масс-спектры пептида TTMPLW после его перерастворения в 10% растворе трифторуксусной кислоты в H_2^{18}O через 5 мин (А), 60 мин (Б) и 120 мин (В) инкубации.

Анализ фрагментов MS/MS подтвердил, что замещение происходит именно в С-концевой карбоксильной группе, без обмена по боковым группам гидроксильных аминокислот, таких как треонин. Аналогичный изотопный профиль получен для пептидов AWYYVPLG (B1p), RFFVAPF (L5) и RGFPIIV (L5).

4.7.2. Расчёт концентрации продуктов гидролиза по изотопно-меченому стандарту

Поскольку для определения концентрации продукта использовался изотопно-меченый стандарт, была выведена формула, учитывающая наложение его изотопных сигналов на пики природного пептида. Меченый пептид содержал смесь трёх форм: без метки, с одним и двумя атомами ^{18}O , различающимися на +2 и +4 Да. В спектре смеси продукта и стандарта изотопные пики частично перекрывались, что учитывалось при расчёте концентраций.

Для расчёта концентрации пептидов применяли единый подход, основанный на решении системы линейных уравнений, описывающей вклад стандарта и продукта в суммарный масс-спектр. Этот метод позволял учитывать частичное включение ^{18}O и перекрытие сигналов. Такой подход обеспечивал точный расчёт даже при неполном обмене и сложном изотопном распределении, при условии регистрации отдельных спектров эталонного пептида, стандарта и их смеси.

4.7.3. Валидация метода на модельной системе с использованием трипсина

Для оценки точности разработанного метода определения концентрации пептидов была использована модельная система: гидролиз казеина трипсином. Образование пептида-продукта TTMPLW (продукта гидролиза казеина) регистрировали через 15 минут инкубации при трёх начальных концентрациях субстрата (7,75, 3,87 и 3,1 мкМ). Для каждого варианта подбиралось индивидуальное соотношение продукта и изотопно-меченого стандарта, обеспечивающее сопоставимую интенсивность сигналов в масс-спектре.

Концентрация стандарта определялась предварительно по смеси с эталонным пептидом (TTMPLW) и составляла $11 \pm 0,2$ мкМ (при соотношении 1:1) и 3,8 мкМ (при

1:2,5). Далее по спектру смеси продукта и стандарта рассчитывали концентрацию пептида-продукта: при 7,75 мкМ казеина – $5 \pm 0,04$ мкМ, при 3,87 мкМ – $3 \pm 0,29$ мкМ, и при 3,1 мкМ – $2,55 \pm 0,25$ мкМ. Минимально надёжно определяемая концентрация составила $0,5 \pm 0,08$ мкМ.

Построение графика в координатах Лайнвивера–Берка ($1/V_0-1/[S]$) показало линейную зависимость, соответствующую модели Михаэлиса–Ментен. Расчёт дал значение константы Михаэлиса (K_M) $13,65 \pm 0,6$ мкМ. Для сравнения, по данным базы BRENDA при аналогичных условиях (рН, температура) K_M трипсина для казеина составляет 3,33 мкМ. Различие может быть связано с использованием в литературе модифицированного субстрата (FITC-казеина), где ковалентное присоединение метки к лизиновым остаткам может ограничивать доступность сайтов гидролиза.

Таким образом, предложенный метод обеспечивает надёжное и воспроизводимое определение концентрации пептидов в широком диапазоне, включая низкие значения, и может применяться для расчёта кинетических параметров исследуемых в данной работе ферментов.

4.7.4. Определение кинетических параметров *V_{lр}* и *L5*

Для расчёта кинетических параметров были выбраны пептиды-продукты гидролиза, специфичные для каждого фермента: AWYYVPLG – для *V_{lр}*; RGPFPPIV и RFFVAPF – для *L5*. Их концентрации определяли либо по УФ-поглощению (AWYYVPLG), либо аминокислотным анализом (RGPFPPIV, RFFVAPF).

Пептиды RGPFPPIV и RFFVAPF, образующиеся при расщеплении β - и α 1-казеина соответственно, использовали в одном эксперименте, что позволило параллельно определить скорости их накопления (рис. 9). Пептид RGPFPPIV являлся конечным продуктом одностадийного гидролиза, тогда как RFFVAPF не являлся конечным продуктом и подвергался дальнейшему расщеплению. Это необходимо учитывать при интерпретации кинетических параметров.

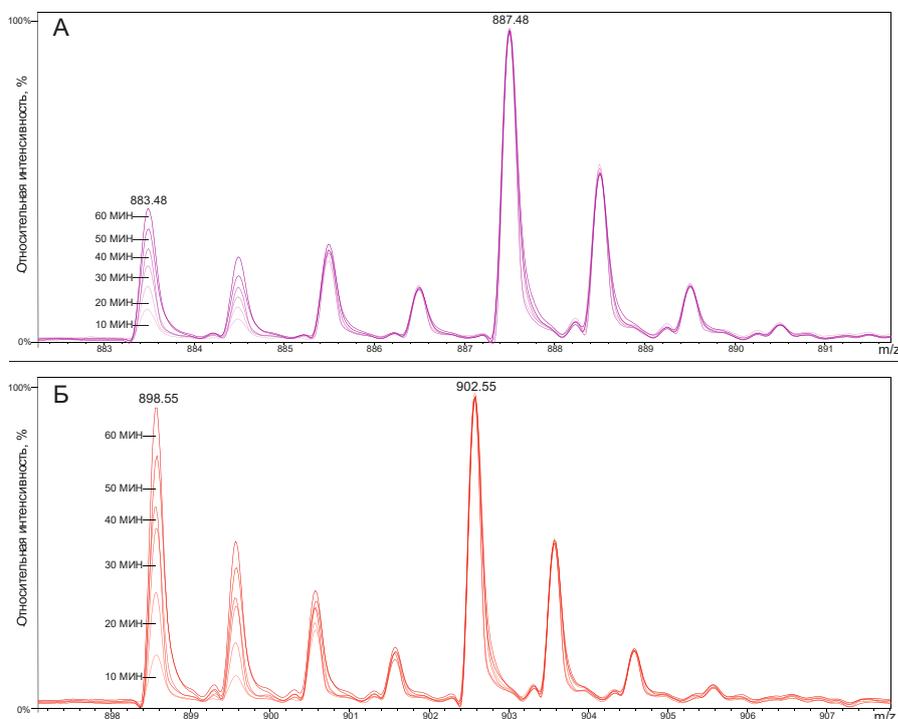


Рисунок 9. Масс-спектры, отражающие накопление пептидов RGPFPPIV (сверху) и RFFVAPF (снизу) под действием протеазы *L5*. Показаны спектры, полученные на разных этапах инкубации (градиент интенсивности от светлого к тёмному). С нарастанием

времени наблюдается рост интенсивностей пиков, соответствующих продуктам гидролиза.

Скорости накопления продуктов определяли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии при разных концентрациях казеина. Начальные скорости рассчитывали по линейным участкам кривых зависимости концентрации пептида от времени (рис. 10 А).

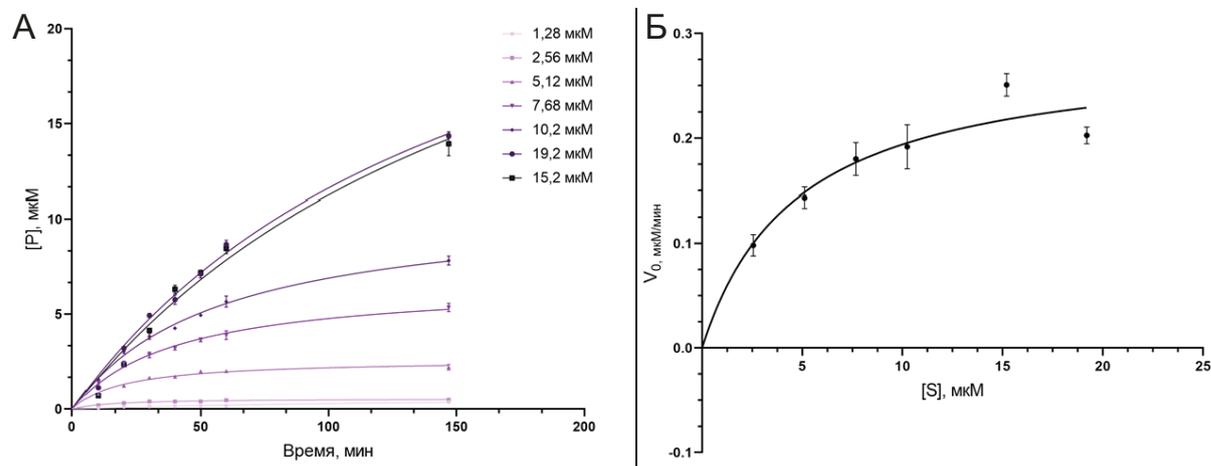


Рисунок 10. А – зависимость накопления продукта (RGPFPIV) гидролиза от времени при различных начальных концентрациях субстрата (казеина, 1,28–19,2 мкМ). Б – зависимость начальной скорости гидролиза казеина ферментом L5 (V_0 , мкМ/мин) от начальной концентрации субстрата ($[S]$, мкМ). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для обоих графиков.

Полученная кривая зависимости начальной скорости ферментативной реакции (V_0) от концентрации субстрата была описана гиперболическим уравнением Михаэлиса–Ментен (рис. 10 Б). Кинетические параметры для фермента L5 по продукту гидролиза RGPFPIV были рассчитаны на основе аппроксимации экспериментальных данных по уравнению Михаэлиса-Ментен: максимальная скорость реакции (V_{max}) составила $0,315 \pm 0,02$ мкМ/мин, а $K_M = 6,55 \pm 0,58$ мкМ.

С учётом концентрации фермента в реакции ($0,147$ мкМ), каталитическая константа (k_{cat}) была рассчитана как $2,14$ мин $^{-1}$, что отражает число оборотов молекулы фермента в минуту. Каталитическая эффективность, выраженная как отношение k_{cat}/K_M , составила $0,327$ мкМ $^{-1}$ мин $^{-1}$, что свидетельствует о достаточно эффективном катализе в условиях проведённого эксперимента.

Аналогичным образом были рассчитаны кинетические параметры фермента L5 по пептиду RFFVAPF (рис. 11 А, Б). Аппроксимация зависимости V_0 от $[S]$ по уравнению Михаэлиса–Ментен дала следующие значения: $K_M = 6,58 \pm 1,72$ мкМ, $V_{max} = 0,07 \pm 0,02$ мкМ/мин. С учётом концентрации фермента ($0,147$ мкМ), рассчитаны: $k_{cat} = 0,476$ мин $^{-1}$, $k_{cat}/K_M = 0,072$ мкМ $^{-1}$ мин $^{-1}$.

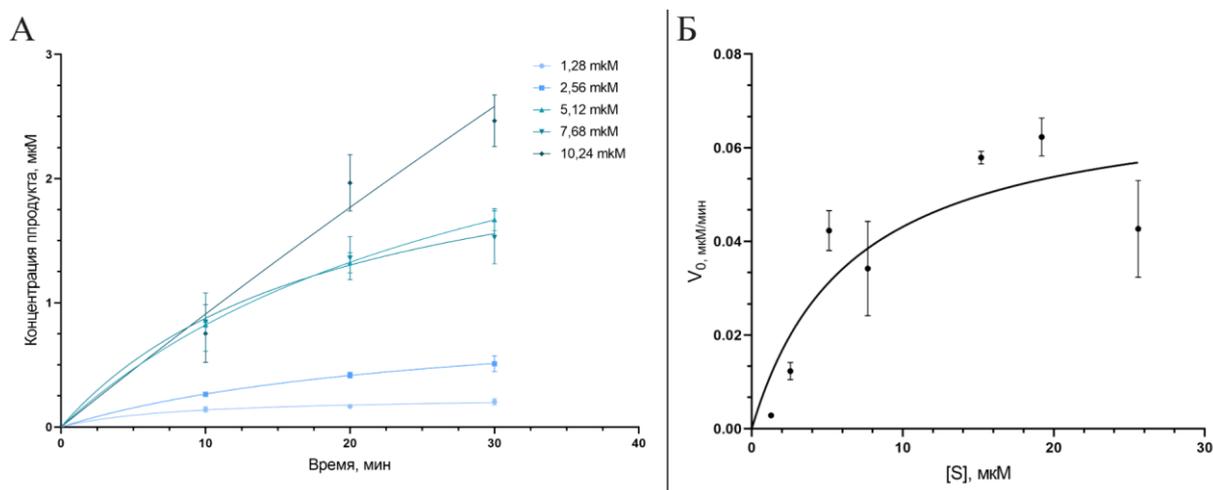


Рисунок 11. А – зависимость накопления продукта (RFFVAPF) гидролиза от времени при различных начальных концентрациях субстрата (казеина, 1,28–10,24 мкМ). Б – зависимость начальной скорости гидролиза казеина ферментом L5 (V_0 , мкМ/мин) от начальной концентрации субстрата ($[S]$, мкМ). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для обоих графиков.

Снижение каталитической эффективности RFFVAPF объясняется его нестабильностью как промежуточного продукта: при низких концентрациях субстрата наблюдалось его постепенное убывание, указывающее на последующий гидролиз.

Для фермента V1p, кинетические параметры которого определяли по образованию пептида AWYYVPLG (рис. 12 А, Б), который является конечным стабильным продуктом, K_M составила $6,15 \pm 0,48$ мкМ, максимальная скорость реакции (V_{max}) $10,32 \pm 2,6$ мкМ/мин. С учётом концентрации фермента в реакции (1,69 мкМ), каталитическая константа (k_{cat}) была рассчитана как $6,11$ мин⁻¹. Каталитическая эффективность, выраженная как отношение k_{cat}/K_M , составила $0,993$ мкМ⁻¹мин⁻¹.

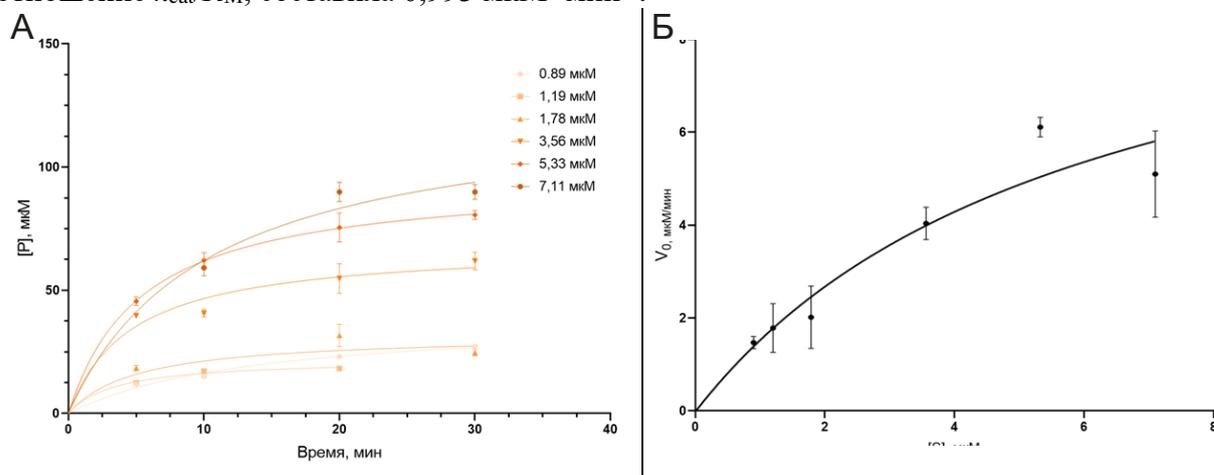


Рисунок 12. А – зависимость накопления продукта (AWYYVPLG) гидролиза от времени при различных начальных концентрациях субстрата (казеина, 0,89–7,11 мкМ). Б – зависимость начальной скорости гидролиза казеина ферментом V1p (V_0 , мкМ/мин) от начальной концентрации субстрата ($[S]$, мкМ). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для обоих графиков.

Таким образом, при сходных значениях K_M ($\approx 6,5$ мкМ), фермент V1p характеризуется значительно большей каталитической активностью по сравнению с L5, что отражается в более высоких значениях k_{cat} и k_{cat}/K_M .

Предложенная методика, основанная на использовании изотопно-меченых стандартов и MALDI-TOF MS, позволила количественно оценить кинетические параметры ферментов, включая те, для которых ранее не удавалось подобрать подходящие субстраты

(например, Vlp). Метод показал применимость для анализа ферментов с узкой или широкой специфичностью, а также для оценки стабильных и нестабильных пептидов-продуктов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеолитические ферменты бактерий рода *Lysobacter* представляют значительный интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Их способность разрушать клеточные стенки других микроорганизмов делает эти ферменты потенциальными инструментами для биотехнологии, биоконтроля и антимикробных разработок. Однако практическое применение таких ферментов ограничено недостаточной изученностью их молекулярной специфичности и каталитических свойств, а также отсутствием универсальных методов для их количественного анализа.

В данной работе выполнено комплексное исследование двух внеклеточных протеаз – Vlp и L5, продуцируемых бактериями *Lysobacter capsici* ВКМ В-2533^T и культуры *Lysobacter capsici* XL1, соответственно. На первом этапе были выделены и идентифицированы активные формы ферментов, установлена их гомология с литическими протеазами других представителей рода *Lysobacter*. Для анализа специфичности был применён подход, основанный на неселективном протеолизе широкого набора белков с последующей идентификацией пептидов методом LC-MS/MS. С целью обработки и визуализации полученных данных разработан специализированный программный инструмент CleaveScope, позволяющий анализировать частоту встречаемости аминокислот, используя различные методы нормировки, а также визуализировать результаты в виде тепловых карт и логотипов последовательностей.

Проведённый анализ позволил впервые охарактеризовать аминокислотные предпочтения ферментов Vlp и L5. Установлено, что Vlp обладает выраженной селективностью к остаткам глицина и лизина в позиции P₁, в то время как фермент L5 проявляет более широкую специфичность и способен расщеплять пептидные связи аминокислот метионина, фенилаланина, лейцина и валина. Различия в предпочтениях подтверждают существование различных механизмов взаимодействия ферментов с субстратом. Помимо этого, было показано, что фермент L5 имеет высокую частоту встречаемости пролина в позиции P₂. Эти наблюдения позволяют предположить, что специфичность L5 может зависеть не только от взаимодействия с отдельными аминокислотными остатками, но и от позиционных или конформационных особенностей активного центра фермента.

Для количественной оценки каталитических свойств была разработана методика определения кинетических параметров с использованием изотопно-меченых (¹⁸O) пептидных стандартов и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Впервые получены значения K_M , k_{cat} и k_{cat}/K_M для фермента Vlp, активность которого не удавалось оценить стандартными методами. Также определены кинетические параметры L5 на двух различных пептидных субстратах, что позволило охарактеризовать его каталитическую эффективность в зависимости от субстрата.

Анализ полученных кинетических параметров показал, что различия в специфичности ферментов Vlp и L5 коррелируют с их функциональными особенностями. Vlp, обладающий узкой селективностью к остаткам глицина и лизина, имеет высокую каталитическую активность и эффективность, что отражает его роль как основного лизирующего фермента, способного быстро расщеплять белковые субстраты. Напротив, L5 характеризуется более широкой аминокислотной специфичностью и меньшей скоростью гидролиза промежуточных пептидов, что указывает на его адаптивную, вспомогательную роль в бактериальном секрете. Полученные данные позволяют объяснить их взаимодополняющую функциональную роль.

Таким образом, настоящая работа вносит вклад в изучение природных бактериальных протеаз с литической активностью и предлагает универсальные инструменты и подходы для анализа их специфичности и активности. Полученные

результаты расширяют представления о биохимических свойствах ферментов *Lysobacter* и создают основу для их дальнейшего применения в биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Из *Lysobacter capsici* XL1 были выделены и идентифицированы протеолитические ферменты V1p и L5, соответственно, обладающие литической активностью. Проведённый BLAST-анализ аминокислотных последовательностей показал их высокую степень гомологии с известными внеклеточными протеазами бактерий рода *Lysobacter*, включая протеазу LasA. Полученные данные указывают на принадлежность V1p к классу металлопротеаз M23, а L5 – к классу сериновых эндопептидаз.

2. Для обработки большого объёма масс-спектрометрических данных и визуализации аминокислотной специфичности ферментов была разработана специализированная программа CleaveScore. Данный программный инструмент позволил автоматически извлекать сайты гидролиза, строить матрицы частот остатков в позициях P₁₂-P₁₂', формировать тепловые карты и логотипы последовательностей. Программа была предварительно протестирована с использованием трипсина в качестве модельного фермента с известной специфичностью.

3. На основе данных масс-спектрометрического анализа (LC-MS/MS) была определена аминокислотная специфичность двух внеклеточных протеаз – V1p и L5. Фермент V1p имеет предпочтение к гидролизу пептидных связей после остатков глицина и лизина, тогда как фермент L5 обладает более широкой специфичностью, гидролизуя связи после метионина, фенилаланина, лейцина и валина, при этом обладает склонностью к образованию более коротких фрагментов. Построенные матрицы частот и логотипы последовательностей позволили выявить аминокислотные предпочтения фермента, а также определить наиболее характерные мотивы. Полученные данные указывают на различия в механизме действия ферментов, предполагая, что V1p обладает более выраженной селективностью, тогда как L5 имеет более широкую субстратную специфичность.

4. Разработана и реализована модельная система для определения кинетических параметров ферментативных реакций с использованием изотопно-меченых пептидных стандартов (¹⁸O) и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Предложенный подход позволяет оценить кинетические параметры фермента без использования искусственных субстратов и обеспечивает высокую чувствительность, специфичность и универсальность при анализе ферментов.

5. Впервые были определены кинетические параметры протеаз V1p и L5. Для фермента V1p были получены значения $K_M = 6,15 \pm 0,48$ мкМ, $k_{cat} = 6,11$ мин⁻¹, $k_{cat}/K_M = 0,993$ мкМ⁻¹мин⁻¹. Для фермента L5 кинетические параметры рассчитывались по двум различным субстратам. Для пептида RGPFP_{IV} значения составили $K_M = 6,55 \pm 0,58$ мкМ, $k_{cat} = 2,14$ мин⁻¹, $k_{cat}/K_M = 0,327$ мкМ⁻¹мин⁻¹; для пептида RFFVAPF – $K_M = 6,58 \pm 1,72$ мкМ, $k_{cat} = 0,476$ мин⁻¹, $k_{cat}/K_M = 0,0723$ мкМ⁻¹мин⁻¹. Эти данные отражают различия в каталитической активности ферментов и субстратную зависимость их кинетических характеристик, а также демонстрируют практическую применимость разработанного подхода к анализу ферментов с низкой и высокой скоростью реакции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных журналах

1. Afoshin AS, Konstantinov MA, Toropygin IY, Kudryakova IV, Vasilyeva NV. β -Lytic Protease of *Lysobacter capsici* VKM B-2533^T // Antibiotics. – 2020 – V. 9(11) – P. 744.
2. Konstantinov M, Kaluzhskiy L, Yablokov E, Zhdanov D, Ivanov A, Toropygin I., Substrate Specificity and Peptide Motif Preferences of β -Lytic and L5 Proteases from *Lysobacter* spp.

Revealed by LC–MS/MS Analysis // International Journal of Molecular Sciences. – 2025 – V. 26(17) – P. 8603.

3. Константинов М.А., Жданов Д.Д., Торопыгин И.Ю., Количественная масс-спектрометрия с меткой ^{18}O как альтернативный подход к определению активности протеаз на примере трипсина // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2024 – Т. 24(1) – С. 46-60.

4. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2025683380. Российская Федерация. «CleaveScore», № 2025680150 заявлено 06.08.2025, опубликовано 03.09.2025. Бюл. №9 / Константинов М.А., Торопыгин И.Ю.; правообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (RU). – Зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ.

Материалы научных конференций

5. Konstantinov M., Afoshin A., Kudryakova U., Vasileva N., Toropygin I., Proteolytic activity of enzyme beta lytic metalloendopeptidase as a potential antibacterial agent // ASMS 2020, Proceedings book, 2020, p. 16.

6. Konstantinov M., Afoshin A., Kudryakova I., Vasilyeva N., Toropygin I., Expanding Proteome Coverage through the Use of *Lysobacter Capsici* beta-lytic Metalloendopeptidase // ASMS 2020, Proceedings book, 2020, p. 41.

7. Константинов М.А., Афошин А.А., Кудрякова И.В., Васильева Н.В., Торопыгин И.Ю., Молекулярная специфичность бета-литической протеазы *Lysobacter capsici* // III Объединенный научный форум VII съезд физиологов СНГ VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сборник научных трудов. г. Сочи. 3 – 8 октября 2022 – С. 124.

8. Константинов М.А., Афошин А.С., Кудрякова И.В., Васильева Н.В., Торопыгин И.Ю., β -литическая протеаза *Lysobacter capsici*: возможность использования в протеомных исследованиях // III Объединенный научный форум VII съезд физиологов СНГ VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сборник научных трудов. г. Сочи. 3 – 8 октября 2022 – С. 152.

9. Константинов М.А., Афошин А.С., Кудрякова И.В., Васильева Н.В., Торопыгин И.Ю., Свойства и специфичность бета-литической металлоэндопептидазы *Lysobacter capsici* // XIX Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Материалы конференции. г. Владивосток. 12-14 сентября 2022 – С. 22.

10. Константинов М.А., Афошин А.С., Кудрякова И.В., Васильева Н.В., Торопыгин И.Ю., Определение специфичности и кинетических параметров протеолитических ферментов с использованием изотопно-меченых стандартов и масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF // VI Международная конференция Постгеном 2024, Конференционный сборник. г. Одинцово, 29 октября – 2 ноября 2024 – С. 349.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

V_{ip} – β-литическая протеаза

FC (Fold Change) FC (Fold change) – кратное изменение: отношение частоты аминокислоты в исследуемом множестве к её частоте в фоновом, характеризующее степень обогащения или подавления

LC-MS/MS – жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией

MALDI-TOF – (matrix assisted laser desorption/ionization) – лазерная десорбция/ионизация из объема матрицы; TOF (time of flight) – времяпролетный масс-анализатор

MS – масс-спектрометрия

PD (Percentage difference) – процентная разница: показатель, отражающий разницу в частоте встречаемости аминокислоты между исследуемым и фоновым множеством, выраженную в процентах

а.о. – аминокислотный остаток

БД – база данных