

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ β -ЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ *LYSOBACTER CAPSICI*

М. А. Константинов¹, Д. Д. Жданов¹, И. Ю. Торопыгин^{1,2,*}

¹Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,

119121 Москва, ул. Погодинская, 10

²Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,

152742 пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, e-mail: *toropygin@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.03.2025

С использованием масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF идентифицированы сайты гидролиза белков β -литической металлопротеиназой выделенной из бактерий *Lysobacter capsici*, штамм ВКМ 2533Т и определена молекулярная специфичность этого фермента. Анализ продуктов гидролиза восьми белков (миоглобина, трех цепей казеина, гемоглобина, овальбумина, овомукоида, бычьего сывороточного альбумина и енолазы 2 дрожжи) позволил выявить специфичность β -литической протеазы *Lysobacter capsici* к гидролизу пептидных связей по карбоксильным группам глицина, лизина, аланина, фенилаланина, серина, аспарагиновой кислоты, треонина, валина, глутаминовой кислоты, гистидина, аргинина и цистеина. Наиболее часто гидролизуются аминокислотами оказались глицин и аланин, что может быть связано с их малыми размерами и высокой доступностью для активного центра фермента. При этом наличие дополнительных сайтов гидролиза, таких как треонин, при гидролизе белков в ПААГ, но не в растворе, указывает на влияние конформации белка на доступность определенных участков для фермента. Сравнение результатов гидролиза белков в растворе и в ПААГ показало, что денатурация белков при электрофорезе может влиять на доступность сайтов гидролиза. Например, при гидролизе миоглобина в геле был обнаружен дополнительный сайт гидролиза по треонину, который отсутствовал при гидролизе в растворе. Это подтверждает, что конформационные изменения белков, вызванные денатурацией, могут существенно влиять на специфичность протеолиза.

Ключевые слова: масс-спектрометрии MALDI, бактериальная металлопротеаза, гидролиз белков, электрофорез, аминокислоты.

DOI: 10.47021/0320-3557-2025-76-83

ВВЕДЕНИЕ

Среди разнообразия ферментов, “молекулярных машин”, осуществляющих все биохимические реакции в живых организмах, протеазы нашли наиболее широкое применение в различных областях деятельности человека. Эти ферменты, катализируют гидролиз пептидных связей в белках. Наиболее эффективным представляется использование бактериальных протеаз, если рассматривать процессы их получения выделения и очистки. В бактериях эти белки играют ведущие роли в процессах клеточного метаболизма, патогенезе и межбактериальных взаимодействиях: некоторые протеазы участвуют в расщеплении внеклеточных белков для получения питательных веществ, другие — в модуляции иммунного ответа хозяина или разрушении клеточных структур бактерий-конкурентов. Изучение специфичности ферментов имеет значение как для фундаментальной биохимии, так и для понимания механизмов действия бактериальных ферментов и их возможного применения, в том числе, в биотехнологии и медицине.

Ферментативное расщепление белков является ключевым этапом и в протеомных исследованиях, основанных на идентификации белков по масс-спектрам их отдельных пептидов.

В этой области “золотым стандартом” является трипсин, катализирующий гидролиз пептидных связей при остатках аргинина и лизина [Tsiatsiani, Heck, 2015]. Однако трипсин не всегда обеспечивает необходимое для анализа расщепление белка: (1) он может пропускать сайты гидролиза [Walmsley et al., 2013]; (2) на каталитическую активность фермента влияет микроокружение активного центра — например, присутствие глутамин или аспарагин рядом с сайтом гидролиза способно замедлять реакцию [Šlechtová et al., 2015; Константинов и др., 2024 (Konstantinov et al., 2024)]; (3) несмотря на многочисленные исследования, влияние микроокружения активного центра у трипсина остается недостаточно изученным; (4) существуют белки с незначительным содержанием аргинина и лизина. Кроме того, добиться полного покрытия последовательности белка идентифицированными пептидами, если это требуется, после гидролиза трипсином удается не всегда. В этих случаях используют протеазы с отличной от трипсина специфичностью. Поэтому одной из методических задач протеомики остается поиск новых протеаз и изучение их специфичности [Giansanti et al., 2016].

Среди “дополнительных” активно (хотя существенно меньше, чем трипсин) используется лизил-эндопептидаза С. Этот фермент, как понятно из его названия, гидролизует пептидную связь после лизина. Его в промышленных количествах получают из бактерий *Lysobacter enzymogenes* (ранее известных как *Achromobacter lyticus*). Эти микроорганизмы относятся к роду *Lysobacter*, который известен своей способностью производить различные ферменты с высокой специфичностью.

Род *Lysobacter* насчитывает несколько десятков видов вездесущих обитателей почвы, воды, ризосферы и внутренних тканей растений и даже кожных покровов животных [Christensen, Cook, 1978].

Кай Ульрик Линнерстрем-Ланг [Linderstrøm-Lang, 1953] сформулировал концепцию “предельных пептидов”, согласно которой белок гидролизруется до тех пор, пока все возможные сайты не окажутся расщеплены. Этот процесс ограничен вторичной и третичной структурой белка, препятствующей доступу фермента к сайтам гидролиза [Šlechtová et al., 2015]. Важную роль также играет расстояние между участками расщепления: чем оно больше, тем более протяженные фрагменты образуются, а идентификация больших пептидов часто затруднена.

Ранее специфичность протеаз изучалась с применением биохимических анализаторов, хроматографии и биоинформатики. Например, карбоксипептидаза Т *Thermoactinomyces vulgaris* исследовалась с использованием биохимического анализатора LC-5001 [Трачук и др., 2002 (Trachuk et al., 2002)], а специфичность цитохромов P450 прогнозировалась компьютерным моделированием [Веселовский и др., 2010 (Veselovsky et al., 2010)]. Однако эти методы либо обладают ограниченной чувствительностью, либо являются предсказательными. Введение масс-спектрометрии значительно расширило возможности анализа специфичности ферментов.

Молекулы, изучаемые в молекулярной биологии, представляют собой полимеры, такие как ДНК, РНК и белки. Их структура и функция обусловлены последовательностью мономеров, что делает секвенирование важнейшей задачей биохимического анализа. В сере-

дине XX века Фредерик Сэнгер усовершенствовал метод секвенирования по Эдману и определил первичную структуру инсулина, за что был удостоен Нобелевской премии [Blombäck et al., 1966; Mann, 2016].

Определение молекулярных масс биомолекул сыграло ключевую роль в их изучении, однако до 1980-х годов масс-спектрометрия оставалась неприменимой для анализа крупных биополимеров [Fenn et al., 1989]. Это было обусловлено высокой энергией ионизации, что приводило к разрушению исследуемых молекул [Herbert et al., 2002].

Прорывом оказалось появление “мягких” методов ионизации. Метод электрораспыления (ESI) [Александров и др., 1984 (Alexandrov et al., 1984); Yamashita, Fenn, 1984] удобен при анализе многокомпонентных смесей и часто совмещается с ВЭЖХ, тогда как ионизация лазерной десорбцией из вспомогательного вещества (MALDI) [Karas et al., 1985] позволяет минимизировать разрушение биомолекул. Хотя ESI обеспечивает высокую чувствительность и широко используется в протеомике, в ряде случаев удобнее использовать MALDI, особенно для анализа пептидов и белков с минимальной пробоподготовкой.

Цель данной работы — с использованием масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF определить сайты преимущественного гидролиза белков β-литической металлопротеиназой, выделенной из бактерий *Lysobacter capsici*, штамм ВКМ 2533Т изучив таким образом молекулярную специфичности этого фермента.

Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью изучения специфичности новых бактериальных протеаз, которые могут обладать протеолитической активностью. В данной работе анализируется специфичность бактериальной протеазы, обладающей способностью гидролизовать белки по остаткам глицина, лизина и аргинина, а также лизировать грамположительные бактерии. С использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии исследуется ее предпочтительная специфичность к аминокислотным остаткам, а также возможная связь между ее протеолитической и функциональными активностями. Полученные данные позволят глубже понять механизмы действия этого фермента и его потенциальное биологическое значение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гидролиз белков с использованием β-литической металлопротеиназой выделенной из бактерий *Lysobacter capsici*, (БлМП) проводился на коммерчески доступных препаратах

белков с хорошо изученной структурой и известными модификациями, такими как сайты фосфорилирования и алкилирования. Однако эти препараты могли содержать примесные

пептиды и белки, что было подтверждено экспериментально. Присутствие примесных белков может исказить результаты эксперимента или затруднить идентификацию продуктов реакции гидролиза исследуемой протеазой. Поэтому состав препаратов, которые впоследствии были использованы для гидролиза БлМП, были гидролизованы трипсином, с целью охарактеризовать их белковый состав.

Очистка препаратов белков от низкомолекулярных примесей — для этого белковые препараты очищали с использованием фильтров Microcon YM-3 (Merck Millipore, Германия). Эти фильтры позволяют концентрировать белок, удаляя молекулы с массой <3 кДа. К 100 мкл раствора белка (1 мг/мл) добавляли 400 мкл воды, после чего смесь центрифугировали в пробирках с фильтрами при 14000g в течение 100 мин при 25°C. Затем фильтры переворачивали и дополнительно центрифугировали при 1000g в течение 3 мин дважды. Потери белка при этом не превышали 10%. После фильтрации белок разбавляли до исходной концентрации, учитывая потери. Дополнительно очистка белковых препаратов проводилась с использованием полиакриламидного геля (ПААГ), что обеспечивало дополнительную степень очистки перед проведением гидролиза.

Гидролиз белков в растворе — оптимальные условия гидролиза белков под действием БлМП определяли с учетом влияния pH на скорость реакции. Для этого использовали аммоний бикарбонатный буфер (pH 7–8) и буфер Бриттона-Робинсона (pH 7.5–9). В качестве субстратов использовали миоглобин, казеин, овальбумин и гемоглобин. Реакционная смесь включала 8 мкл 50 мМ аммоний бикарбонатного, натрий карбонатного/бикарбонатного буфера или буфера Бриттона-Робинсона, 8 мкл белкового раствора (1 мг/мл) и БлМП (289 мкг/мл) в объеме от 0.5 до 6 мкл с шагом 0.5 мкл. Варьируя концентрацию фермента, определяли оптимальное соотношение субстрата и фермента. Инкубацию реакционной смеси проводили при 21–37°C в течение 5, 15, 30, 60, 120 и 180 мин в термостате BE 400 (MEMMERT, Германия).

Гидролиз белков, разделенных в ПААГ, — в качестве модельных белков для исследования были выбраны бычий сывороточный альбумин (БСА), миоглобин, казеин, овальбумин и енолаза-2. Гидролиз белков в ПААГ включал несколько последовательных этапов. Для проведения электрофореза были приготовлены два типа гелей: 2.5% концентрирующий и 9% разделяющий гель с содержанием 10% додецилсульфата

натрия (SDS, Sigma, США). После полимеризации в лунки геля вносили очищенные растворы белков. Электрофорез выполняли в системах Bio-Rad (США) с использованием маркера молекулярной массы Precision Plus Protein (10–250 кДа, Bio-Rad, США). По завершении электрофореза гель фиксировали в 10% растворе уксусной кислоты и 20% этанола в течение 15 мин, затем окрашивали красителем Coomassie Brilliant Blue G-250 в течение 10 мин. Избыток красителя удаляли последовательным промыванием геля в воде при 80°C (5 раз по 15 мин). После выделения целевых белковых полос из геля, отмывали остатки красителя путем последовательного инкубирования в растворе, содержащем 50% ацетонитрила (ACN) и 100 мМ аммоний бикарбонатный буфер. Каждую промывку проводили добавлением 200 мкл раствора с последующей инкубацией в термостате с шейкером Eppendorf Thermomixer Comfort при 35°C в течение 15 мин. Отмывочные этапы повторяли до полного обесцвечивания геля. После удаления раствора полосы дополнительно обезвоживали в 30 мкл ACN в течение 15 мин, затем удаляли оставшуюся жидкость.

Масс-спектрометрический анализ — продукты гидролиза белков, полученные с использованием БлМП, анализировали методом масс-спектрометрии на приборе MALDI-TOF/TOF Ultraflex II (Bruker, Германия), оснащенном лазером Nd:YAG (355 нм). В качестве матрицы применяли раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мкг/мл) в смеси 50% ацетонитрила и 0.35% трифторуксусной кислоты. Образец (0.5 мкл), содержащий продукты гидролиза белков, смешивали с равным объемом матрицы непосредственно на специализированной мишени масс-спектрометра и высушивали при комнатной температуре. Масс-спектры регистрировали в рефлекторном режиме положительных ионов при частоте импульсов лазера 66.7 Гц, с ускоряющим напряжением 25 кВ и напряжением рефлектора 26.38 кВ. Tandемные масс-спектры регистрировали в TOF/TOF (MS/MS) режиме с использованием tandemного блока LIFT при ускоряющем напряжении 8 кВ, напряжении на рефлектроне 29.50 кВ и напряжении модуля LIFT 19 кВ.

Анализ полученных спектров осуществляли с использованием программного обеспечения FlexAnalysis 3.0. Для калибровки применяли как внешний, так и внутренний методы. Внешнюю калибровку проводили с использованием Peptide Calibration Standard II (Bruker, Германия), содержащего пептиды с известными массами в диапазоне 700–3500 Да. Внутренняя калибровка выполнялась по пептидам,

являющимся продуктами автолиза БлМП, идентифицированными методом tandemной масс-спектрометрии.

Идентификация продуктов гидролиза белков БлМП — идентификация белков проводилась с использованием программного обеспечения BioTools 3.0 и поисковой системы Mascot. Поиск осуществлялся в базе данных аннотированных белков UniProt (SwissProt) с отсечением по ошибке масс более 70 млн^{-1} (ppm). Массы пептидов, полученных в результате гидролиза, сопоставлялись с теоретическими массами фрагментов исходного белка с помощью программы GPMW.

Для определения специфичности БлМП были применены два подхода. Первый подход заключался в поиске сайтов специфичности для белков, гидролизованных в растворе, содержащем белок, фермент и буфер. При этом в процессе гидролиза фермент, используемый для расщепления, не указывался. После поиска все кандидатные пептиды, соответствующие исходному белку, были подтверждены методом

тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Затем спектры МС и МС/МС были объединены для комбинированного поиска. На основе полученных данных о пептидах, соответствующих продуктам гидролиза БлМП, были определены сайты гидролиза, специфичные для данного фермента. Аналогичная методика использовалась для анализа белков, разделенных методом диск-электрофореза в ПААГ. Необходимость применения этого подхода обусловлена тем, что электрофорез приводит к денатурации белков, изменяя их конформацию, что может влиять на доступность сайтов гидролиза.

Второй подход заключался в поиске белков в ПААГ с использованием установленных ранее сайтов гидролиза для оценки достоверности идентификации. В поисковой системе Mascot были заданы параметры, включающие фермент БлМП с указанием найденных сайтов гидролиза. Также в параметрах поиска было установлено допустимое число пропущенных сайтов гидролиза (недорезов) — не более трех.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение оптимальных условий работы фермента. Эффективность ферментативной активности БлМП исследовалась в зависимости от параметров среды, таких как pH, температура и наличие кофакторов. Поскольку БлМП является металлопротеазой с цинком в активном центре, было изучено влияние ионов Zn^{2+} на активность фермента. Даже при тысячекратном молярном избытке цинка по отношению к ферменту значительного влияния на продукты гидролиза не наблюдалось. Это позволяет предположить, что цинк прочно координируется в активном центре до секреции фермента, поэтому в дальнейших экспериментах соли цинка не добавлялись.

Температурный оптимум активности БлМП исследовался в диапазоне от 18 до 45°C . Изменение температуры не привело к значительным изменениям в наборе продуктов гидролиза. Для последующих экспериментов была выбрана температура 36°C , что соответствует стандартным протоколам протеомного анализа с использованием трипсина.

Оптимальный pH для работы фермента определяли с использованием универсального буфера Бриттона-Робинсона (100 мМ). Наибольшее количество сигналов в масс-спектрах наблюдалось в диапазоне pH 8.8–9.2, что соответствует рабочему диапазону аммонийного бикарбонатного буфера. Этот буфер, являясь летучим, подходит для масс-спектрометрического анализа и поэтому широко используется в протеомных исследованиях.

Отметим, что оптимизация условий по количеству сигналов в спектре является косвенным методом оценки активности фермента. Более точные результаты могли бы быть получены при количественном измерении концентраций продуктов гидролиза.

Анализ данных гидролиза белков в растворе. Гидролиз миоглобина БлМП позволил получить масс-спектр (рис. 1), который был проанализирован с использованием программы GPMW для идентификации пептидных фрагментов. Для исключения ложных совпадений масс были зарегистрированы спектры фрагментации всех обнаруженных пептидов. Дополнительно был проведен поиск в базе данных SwissProt с использованием поисковой системы Mascot. Исходный белок (миоглобин) был идентифицирован с показателем Mowse Score 152, что подтверждает высокую достоверность идентификации.

Комбинированный анализ МС и МС/МС спектров выявил сайты гидролиза БлМП по карбоксильным группам аминокислот глицина, фенилаланина, лизина, аланина, серина и аспарагиновой кислоты (рис. 2). Для статистической достоверности аналогичные эксперименты были проведены с казеином, гемоглобином и овальбумином. В образце овальбумина также был обнаружен овомукоид, а в казеине идентифицирован только α -S1-казеин, несмотря на наличие α -S2-казеина.

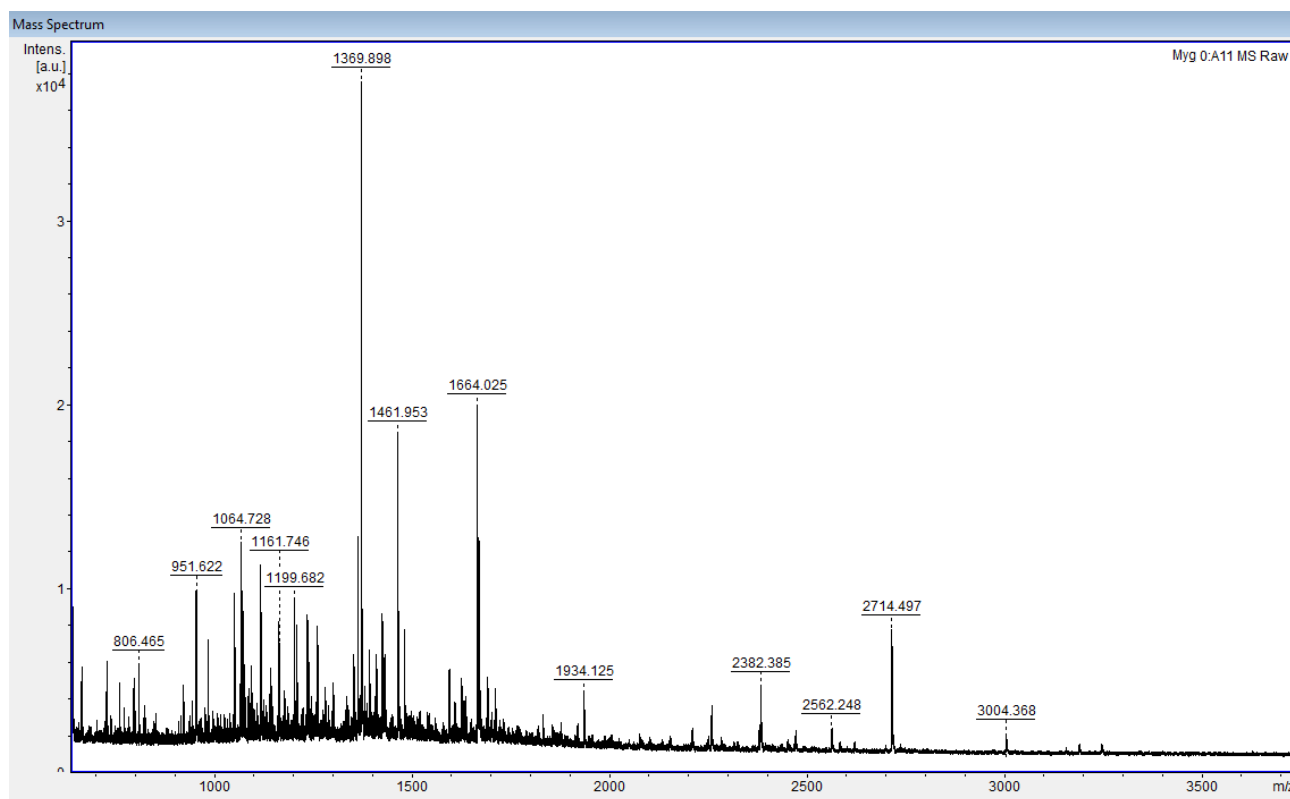


Рис. 1. МС спектр гидролиза Миоглобина.

Fig. 1. MS spectrum of Myoglobin hydrolysis.

1	MGLSDGEWQQ VLNWVGKVEA DIAGHGQEV LIRLFTGHPET LEKFDKFKHL
51	KTEAEKASE DLKKHGTVVL TALGGILKKK GHNEAEELKPL AQSHATKHKI
101	PIKYLEFISD AIHVLNHSKH PGDFGADAQG AMTKALELFR NDIAAKYKEL
151	GFQG

Рис. 2. Последовательность миоглобина. Красным выделены идентифицированные сайты гидролиза.

Fig. 2. Myoglobin sequence. Identified hydrolysis sites are highlighted in red.

Анализ данных гидролиза белков в ПААГ. Для исключения влияния примесей в коммерческих препаратах эксперименты по гидролизу были повторены с белками, предварительно разделенными методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Были исследованы миоглобин, БСА, овальбумин, ово-мукоид, α -S1-казеин и енолаза 2 (рис. 3). Белки овальбумин и α -S1-казеин были идентифицированы с показателями Score 235 и 289 соответственно, причем сайты гидролиза совпали с результатами, полученными при гидролизе в растворе. Гидролиз миоглобина в геле выявил дополнительный сайт гидролиза по треонину, который отсутствовал в растворе. Однако для ово-

мукоида и α -S2-казеина достоверной идентификации достичь не удалось. Результаты анализа сайтов гидролиза белков в растворе и ПААГ представлены в таблице 1.

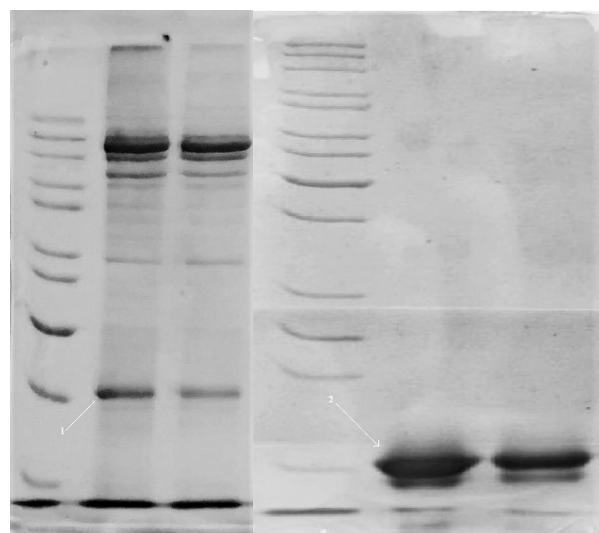


Рис. 3. Разделение белков в диск-электрофорезе: 1 — енолаза 2; 2 — миоглобин.

Fig. 3. Separation of proteins in disk electrophoresis: 1 — enolase 2; 2 — myoglobin.

Таблица 1. Обнаруженные сайты специфического гидролиза в белках, разделенных в растворе и ПААГ**Table 1.** Detected sites of specific hydrolysis in proteins separated in solution and PAAG

Белок Protein	Идентифицированные сайты гидролиза в растворе Identified hydrolysis sites in-solution digestion	Идентифицированные сайты гидролиза в ПААГ Identified hydrolysis sites in-gel digestion
Казеин	Глицин, лизин, аланин	Глицин, лизин, аланин
Миоглобин	Глицин, лизин, аланин, фенилаланин, серин, аспарагиновая кислота	Глицин, лизин, аланин, фенилаланин, серин, аспарагиновая кислота, треонин
Цепь А гемоглобина	Глицин, гистидин	—
Цепь Б гемоглобина	Глицин	—
Овальбумин	Глицин, аланин	Глицин, лизин, аланин, треонин
Овомукоид	Глицин, лизин, аланин, валин, глутаминовая кислота	Глицин, лизин, аланин, валин, глутаминовая кислота
Енолаза 2	—	Глицин, аланин
БСА	—	Глицин, аланин, лизин, треонин, валин, аргинин, цистеин и серин

Примечание. “—” — нет данных.

Note. “—” — not date.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование позволило определить оптимальные условия работы бактериальной металлопротеазы БлМП и выявить ее субстратную специфичность. Установлено, что активность фермента не зависит от дополнительного внесения ионов цинка, что свидетельствует о стабильной координации цинка в активном центре фермента. Оптимальный pH для работы БлМП находится в слабощелочной области (8.8–9.2), что согласуется с данными для многих внеклеточных протеаз, функционирующих в условиях, близких к нейтральным или слабощелочным. Температурный оптимум фермента (36°C) был выбран исходя из совместимости со стандартными протоколами протеомного анализа, что делает БлМП потенциально применимым в биохимических и биотехнологических исследованиях.

Анализ продуктов гидролиза различных белков (миоглобина, казеина, гемоглобина, овальбумина, овомукоида, БСА и енолазы 2) позволил выявить специфичность БлМП к гидролизу пептидных связей по карбоксильным группам глицина, лизина, аланина, фенилаланина, серина, аспарагиновой кислоты, треонина, валина, глутаминовой кислоты, гистидина, аргинина и цистеина. Наиболее часто гидролизуются аминокислотами оказались глицин и аланин, что может быть связано с их малыми размерами и высокой доступностью для активного центра фермента. При этом наличие дополнительных сайтов гидролиза, таких как треонин, при гидролизе белков в ПААГ, но не в растворе, указывает на влияние конформации белка на доступность определенных участков для фермента.

Сравнение результатов гидролиза белков в растворе и в ПААГ показало, что денатурация белков при электрофорезе может влиять на доступность сайтов гидролиза. Например, при гидролизе миоглобина в геле был обнаружен дополнительный сайт гидролиза по треонину, который отсутствовал при гидролизе в растворе. Это подтверждает, что конформационные изменения белков, вызванные денатурацией, могут существенно влиять на специфичность протеолиза.

Особый интерес представляет способность БлМП гидролизовать белки с высокой эффективностью, что делает ее потенциально полезной для протеомных исследований. В отличие от трипсина, который часто “пропускает” сайты гидролиза, БлМП демонстрирует высокую активность даже в условиях, где трипсин может быть менее эффективен. Это открывает перспективы для использования БлМП в качестве альтернативного фермента для анализа белков, особенно в случаях, когда требуется более полное расщепление.

Однако стоит отметить, что оптимизация условий работы фермента по количеству сигналов в масс-спектрах является косвенным методом оценки активности. Для более точного определения кинетических параметров и специфичности БлМП необходимы дополнительные исследования, включая количественный анализ продуктов гидролиза и изучение влияния вторичной и третичной структуры белков на доступность сайтов гидролиза.

Полученные данные также могут быть ключом к пониманию возможной функции БлМП клетках бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют, что исследуемый фермент обладает выраженной специфичностью протеолитической активности, гидролизует пептидные связи по остаткам глицина, лизина и аргинина. Учитывая это,

можно предложить использование БлМП в роли альтернативного фермента при протеомных работах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за предоставленную протеазу сотрудникам Лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) Леонтьевской Наталье Валерьевне, Кудряковой Ирине Валерьевне и Афошину Алексею Сергеевичу.

ФИИНАНСИРОВАНИЕ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров М.Л., Галь Л.Н., Краснов Н.В. и др. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении — метод масс-спектрометрического анализа биоорганических веществ // ДАН СССР. 1984. Вып. 277. № 2. С. 379–383.
- Веселовский А.В., Соболев Б.Н., Жаркова М.С., Арчаков А.И. Компьютерные методы предсказания субстратной специфичности цитохромов р450 // Биомедицинская химия. 2010. Вып. 56. № 1. С. 90–100.
- 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. Вып. 24(1). С. 46–60. DOI: 10.30895/2221-996X-2024-24-1-46-60.
- Трачук Л.А., Бушуева А.М., Шевелев А.Б. и др. Изучение $\text{S1}^{\ast}$ -кармана первичной специфичности карбоксипептидазы *Thermoactinomyces vulgaris* методом направленного мутагенеза // Биомедицинская химия. 2002. Вып. 48. № 6. С. 577–585.
- Blombäck B., Blombäck M., Edman P., Hessel B. Human fibrinopeptides isolation, characterization and structure // Biochim. Biophys. Acta. 1966. Vol. 115. № 2. P. 371–396. DOI: 10.1016/0304-4165(66)90437-5.
- Christensen P., Cook F. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1978. Vol. 28. P. 367–393.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // Science. 1989. Vol. 246. № 4926. P. 64–71. DOI: 10.1126/science.2675315.
- Giansanti P., Tsiatsiani L., Low T.Y., Heck A.J.R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin // Nat. Protoc. 2016. Vol. 11. № 5. P. 993–1006. DOI: 10.1038/nprot.2016.057.
- Herbert C.G., Johnstone R.A.W. Mass Spectrometry Basics. Boca Raton: CRC PRESS, 2002. 474 p.
- Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules // Anal. Chem. 1985. Vol. 57. № 14. P. 2935–2939.
- Linderström-Lang K. Lane Medical Lectures: Proteins and Enzymes. Stanford University Press: Stanford, 1953.
- Mann M. The Rise of Mass Spectrometry and the Fall of Edman Degradation // Clin. Chem. 2016. Vol. 62. № 1. P. 293–294. DOI: 10.1373/clinchem.2014.237271.
- Šlechtová T., Gilar M., Kalíková K., Tesařová E. Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences // Anal. Chem. 2015. Vol. 87. № 15. P. 7636–7643. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00866.
- Tsiatsiani L., Heck A.J.R. Proteomics beyond trypsin // FEBS J. 2015. Vol. 282(14). P. 2612–2626. DOI: 10.1111/febs.13287.
- Walmsley S.J., Rudnick P.A., Liang Y. et al. Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics // J. Proteome Res. 2013. Vol. 12. P. 5666–5680. DOI: 10.1021/pr400611h.
- Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme // J. Phys. Chem. 1984. Vol. 88. № 20. P. 4451–4459. DOI: 10.1021/j150664a002.

REFERENCES

- Alexandrov M.L., Gal L.N., Krasnov N.V. et al. Ekstraktsiya ionov iz rastvorov pri atmosfernom davlenii — metod mass-spektrometricheskogo analiza bioorganicheskikh veshchestv [Ion extraction from solutions at atmospheric pressure is a method of mass spectrometric analysis of bioorganic substances]. *DAN SSSR*, 1984, vol. 277, no. 2, pp. 379–383. (In Russia)
- Blombäck B., Blombäck M., Edman P., Hessel B. Human fibrinopeptides isolation, characterization and structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, vol. 115, no. 2, pp. 371–396. doi: 10.1016/0304-4165(66)90437-5.
- Christensen P., Cook F. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1978, vol. 28, pp. 367–393.

- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71. doi: 10.1126/science.2675315.
- Giansanti P., Tsiatsiani L., Low T.Y., Heck A.J.R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nat. Protoc.*, 2016, vol. 11, no. 5, pp. 993–1006. doi: 10.1038/nprot.2016.057.
- Herbert C.G., Johnstone R.A.W. *Mass Spectrometry Basics*. Boca Raton, CRC PRESS, 2002. 474 p.
- Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.*, 1985, vol. 57, no. 14, pp. 2935–2939.
- Konstantinov M.A., Zhdanov D.D., Toropygin I.Yu. Quantitative mass spectrometry with ^{18}O labelling as an alternative approach for determining protease activity: an example of trypsin. *Biological products. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2024, vol. 24(1), pp. 46–60. doi: 10.30895/2221-996X-2024-24-1-46-60. (In Russia)
- Linderström-Lang K. *Lane Medical Lectures: Proteins and Enzymes*. Stanford University Press, Stanford, 1953.
- Mann M. The Rise of Mass Spectrometry and the Fall of Edman Degradation. *Clin. Chem.*, 2016, vol. 62, no. 1, pp. 293–294. doi: 10.1373/clinchem.2014.237271.
- Šlechtová T., Gilar M., Kalíková K., Tesařová E. Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences. *Anal. Chem.*, 2015, vol. 87, no. 15, pp. 7636–7643. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00866.
- Trachuk L.A., Bushueva A.M., Shevelev A.B. et al. Izuchenie S1'-karmana pervichnoi spetsifichnosti karboksipeptidazi T *Thermoactinomyces vulgaris* metodom napravlennoho mutageneza [Investigation of the S1' pocket of primary specificity of carboxypeptidase T of *Thermoactinomyces vulgaris* by targeted mutagenesis]. *Biomed. Chem.*, 2002, vol. 48, no. 6, pp. 577–585. (In Russia)
- Tsiatsiani L., Heck A.J.R. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.*, 2015, vol. 282(14), pp. 2612–2626. doi: 10.1111/febs.13287.
- Veselovsky A.V., Sobolev B.N., Zharkova M.S., Archakov A.I. Kompyuternie metodi predskazaniya substratnoi spetsifichnosti tsitokhromov r450 [Computer methods for predicting the substrate specificity of cytochromes p450]. *Bio-med. Chem.*, 2010, vol. 56, no. 1, pp. 90–100. (In Russia)
- Walmsley S.J., Rudnick P.A., Liang Y. et al. Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant source of variability in proteomics. *J. Proteome Res.*, 2013, vol. 12, pp. 5666–5680. doi: 10.1021/pr400611h.
- Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, 1984, vol. 88, no. 20, pp. 4451–4459. doi: 10.1021/j150664a002.

MOLECULAR SPECIFICITY OF β -LYTIC PROTEASE OF *LYSOBACTER CAPSICI*

M. A. Konstantinov¹, D. D. Zhdanov¹, I. Yu. Toropygin^{1,2,*}

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, st. Pogodinskaya, 10, Russia

²Papanin Institute of Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences,
152742 Borok, Russia; e-mail: *toropygin@rambler.ru

Revised 13.03.2025

Using MALDI TOF/TOF mass spectrometry, the sites hydrolysis of proteins by β -lytic metalloproteinase from *Lysobacter capsici*, strain VKM 2533T bacteria were identified and the molecular specificity of this enzyme was determined. Analysis of the hydrolysis products of eight proteins (myoglobin, three chains of casein, hemoglobin, ovalbumin, ovomucoid, bovine serum albumin, and *Drosophila* enolase 2) revealed the specificity of *Lysobacter capsici* β -lytic protease to hydrolyze peptide bonds at the carboxyl groups of glycine, lysine, alanine, phenylalanine, serine, asparagic acid, threonine, valine, glutamic acid, histidine, arginine, and cysteine. The most frequently hydrolyzed amino acids were glycine and alanine, which may be due to their small size and high accessibility to the active center of the enzyme. At the same time, the presence of additional hydrolysis sites, such as threonine, in the hydrolysis of proteins in PAAG, but not in solution, indicates the influence of protein conformation on the availability of certain sites for the enzyme. Comparison of the results of protein hydrolysis in solution and in PAAG showed that protein denaturation during electrophoresis can affect the accessibility of hydrolysis sites. For example, hydrolysis of myoglobin in gel revealed an additional threonine hydrolysis site, which was absent when hydrolyzed in solution. This confirms that protein conformational changes caused by denaturation can significantly affect the specificity of proteolysis.

Keywords: MALDI mass spectrometry, bacterial metalloprotease, protein hydrolysis, electrophoresis, amino acids