

**Н. С. Фицева**

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ ДЕГРАДАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ *in silico* ПРИ АКТИВАЦИИ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ**

**Научный руководитель: ассист. К. Г. Бурдашкина**

*Кафедра биоорганической химии*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** Протеолиз и механизмы его регулирования играют важнейшую роль в метаболических процессах. При нарушении протеазно-ингибиторного баланса, протеолитические ферменты специфически гидролизуют белковые молекулы, что ведет к образованию различных пептидных фрагментов. В данной работе применялась модель ограниченного протеолиза основных мембранных белков крови сериновыми протеазами (трипсином и химотрипсином). Продукты протеолиза оценивались по основным параметрам, которые позволяют судить о патобиологических свойствах данных фрагментов.

**Ключевые слова.** Протеолиз, сериновые протеазы, DAMPs и PAMPs, моделирование протеолиза белков.

**Resume.** Proteolysis and its regulation mechanisms have an important role in metabolic processes. In violation of protease inhibitor balance, proteolytic enzymes specifically hydrolyze protein molecules, which is the reason of the formation of various peptide fragments. The model limited proteolysis of blood membrane proteins based on the serine protein (trypsin and chymotrypsin) activation is shown in this work. Proteolysis products were evaluated by the main parameters that which may indicate the pathobiological properties of these fragments.

**Keywords.** Proteolysis, serine proteases, DAMPs and PAMPs, modeling protein proteolysis.

**Актуальность.** В последние годы в связи с бурным развитием протеомных исследований особенное внимание уделяется изучению протеолиза. Протеолитическая деградация — это гидролиз белков специфическими ферментами протеиназами. Протеолиз белков в организме может быть тотальным (полным), либо лимитированным (ограниченным). Если имеет место тотальный протеолиз, то белки расщепляются полностью до отдельных аминокислот. Это наблюдается при выведении «аномальных» белков из организма в процессе его морфогенетических перестройках. Ограниченный протеолиз происходит вследствие действия протеазы на конкретную мишень в белке, что приводит к изменению структуры молекулы или её пространственной конформации. При лимитированном протеолизе происходит, например, активация ферментов и превращение прогормонов в гормоны [1].

Различают две большие группы протеаз: эндопептидазы, расщепляющие в белках внутренние пептидные связи, и экзопептидазы, которые гидролизуют связи на N- и C-концевых участках пептидной цепи. По строению активного центра фермента и механизму его действия выделяют 4 семейства эндопептидаз: аспартильные, сериновые, цистеиновые и металлопротеазы. К сериновым ферментам принадлежат трипсин, химотрипсин, эластаза, подавляющее большинство протеаз плазмы крови (факторы свертывания крови, фибринолиза, системы комплемента, кининовой системы), многие внутриклеточные и бактериальные протеазы [4]. Сериновые протеиназы являются самыми распространенными и представляют наибольший интерес в исследовательской деятельности.

Протеолитические ферменты широко распространены в природе, они участвуют в важнейших процессах в организме (внутриклеточный распад белков и

регуляция их кругооборота, пищеварение, оплодотворение, морфогенез, защитные реакции) и обладают высокой биологической активностью, что требует сложных механизмов их регуляции. Активность протеиназ регулируется несколькими путями, одним из которых является пространственная разобщенность фермента и субстрата. Это возможно благодаря синтезу большинства протеолитических ферментов в форме неактивных предшественников — зимоенов. К важнейшим физиологическим регуляторам протеолиза относятся специфические белки-ингибиторы, способные образовывать с протеиназами комплексы, в составе которых ферменты полностью или частично утрачивают каталитическую активность [2].

Наибольшую группу ингибиторов протеиназ составляет семейство серпинов, содержащие в активном центре серин и действующие на сериновые протеазы соответственно:  $\alpha$ 1-ингибитор протеиназ ( $\alpha$ 1-ИП),  $\alpha$ 2-макроглобулин ( $\alpha$ 2-М),  $\alpha$ 2-антиплазмин ( $\alpha$ 2-АП),  $\alpha$ 1-антихимотрипсин ( $\alpha$ 1-АХ) и др.  $\alpha$ 1-ИП и  $\alpha$ 2-М являются наиболее часто встречающимися ингибиторами широкого спектра действия.

Механизм действия заключается в том, что ингибитор служит высокоспецифичным субстратом — мишенью для фермента, подвергаясь ограниченному протеолизу. Молекулы серпинов имеют на поверхности специфическую структуру — «петлю связывания», в которой находится расщепляемая пептидная связь, образующая активный центр ингибитора. Структура этой петли комплементарна участку активного центра фермента. В процессе образования комплекса активные центры протеиназы и ингибитора взаимодействуют между собой [2].

При нарушении протеазно-ингибиторного баланса происходит гиперактивация протеолитических ферментов. В результате многие белки, будь то мембранные компоненты, либо составляющие плазмы крови, подвергаются протеолизу с образованием пептидов различной длины и массы, т.н. патоген-ассоциированные (PAMPs) и ассоциированные с повреждениями (DAMPs) молекулярные фрагменты [5]. Традиционно демаркационной точкой для пептидных продуктов при лимитированном протеолизе служит значение молекулярной массы (ММ). Так, известно, что среднемолекулярные пептиды (ММ 500-5000 Да) с повышенным содержанием ароматических аминокислотных остатков обладают выраженными патобиологическими свойствами [3].

**Цель работы:** прогнозирование образования *in silico* среднемолекулярных пептидных фрагментов при расщеплении мембранных белков трипсиноподобными сериновыми протеазами.

**Задачи:**

1. Изучить явление протеолиза, определить его роль в процессах жизнедеятельности.

2. Рассмотреть взаимодействие двух основных участников протеолитической деградации: ферментов-протеиназ и их ингибиторов.

3. Провести моделирование специфического взаимодействия самых распространенных сериновых протеаз крови (трипсина и химотрипсина) на основные мембранные белки плазмы крови.

4. Классифицировать полученные продукты протеолиза по основным, характерным для патобиологических свойств, параметрам: среднемолекулярной массе, гидрофобности, длине пептида.

**Материалы и методы.** В работе использовались аминокислотные последовательности основных мембранных белков (n=51) из открытой базы данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot>). Модель специфического расщепления пептидных связей трипсиноподобными протеазами (трипсин, химотрипсин) осуществлялась с использованием ресурса ([https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)). Оценка основных свойств полученных белковых фрагментов оценивалась при помощи пептидно-аналитического инструментария (<http://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/peptides-proteins/custom-peptide-synthesis-services/peptide-analyzing-tool.html>). Полученные данные аминокислотных последовательностей пептидных фрагментов анализировались с использованием MS Excel и статистических методов анализа.

**Результаты и их обсуждение.** При моделировании протеолиза *in silico* принимался во внимание тот факт, что наиболее распространенными протеазами крови являются сериновые протеазы. Повышение их активности характерно для развития патологических состояний, сопровождающихся значительным образованием пептидов средней молекулярной массы. Учитывая специфичность действия трипсина и химотрипсина, были получены и проанализированы пептидные фрагменты по следующим параметрам: ММ 500-5000 Да, длина пептида, гидрофобность с учетом неполярных ароматических и алифатических радикалов и, отдельно, наличие ароматических аминокислотных остатков фенилаланина (Phe, F), тирозина (Tyr, Y) и триптофана (Trp, W), а также их локализация в пептидном фрагменте. Необходимость анализа содержания ароматических аминокислотных остатков обусловлена возможностью определения содержащих их пептидов *in vivo* методом прямой спектроскопии при сдвиге максимума поглощения с 210 нм (пептидная связь) в 280 нм (ароматические циклы) [6].

Возможность классификации мембранных белков в зависимости от количества потенциальных сайтов гидролиза (таблица 1), позволяет судить о числе молекулярных фрагментов, образующихся при протеолизе.

**Таблица 1.** Классификация мембранных белков плазмы крови по количеству сайтов гидролиза.

| Белок (n=51) | Количество сайтов гидролиза (с ММ 500-5000 Да) |
|--------------|--|
| PGBM_HUMAN   | 226  |
| SPRC_HUMAN   | 16   |
| COHA1_HUMAN  | 76   |
| CO4A3_HUMAN  | 97   |
| CO4A1_HUMAN  | 83   |
| CO4A4_HUMAN  | 93   |
| CO7A1_HUMAN  | 192  |
| CO8A2_HUMAN  | 31   |
| CO4A2_HUMAN  | 93   |

|             |     |
|-------------|-----|
| LAMC3_HUMAN | 87  |
| FREM1_HUMAN | 133 |
| NID2_HUMAN  | 66  |
| LAMA5_HUMAN | 217 |
| LAMB2_HUMAN | 119 |
| LAMC2_HUMAN | 81  |
| LAMA2_HUMAN | 216 |
| LAMA3_HUMAN | 228 |
| LAMB1_HUMAN | 112 |
| CO8A1_HUMAN | 31  |
| LOXL2_HUMAN | 49  |
| SMOC1_HUMAN | 25  |

|                  |     |
|------------------|-----|
| A0A024RDW8_HUMAN | 100 |
| A0A087WZY5_HUMAN | 85  |
| F5H3Q5_HUMAN     | 83  |
| F5H851_HUMAN     | 85  |
| A7MBN3_HUMAN     | 71  |
| B2RTX6_HUMAN     | 83  |
| B7ZMM7_HUMAN     | 85  |
| A8MXH5_HUMAN     | 88  |
| Q9UEH6_HUMAN     | 80  |
| A0A0A0U994_HUMAN | 77  |
| E9PDI4_HUMAN     | 51  |
| J3KNM7_HUMAN     | 95  |
| A8VPY0_HUMAN     | 13  |
| B4DZ39_HUMAN     | 16  |
| Q59F15_HUMAN     | 50  |

|             |     |
|-------------|-----|
| LAMA4_HUMAN | 126 |
| LAMC1_HUMAN | 103 |
| HMCN1_HUMAN | 341 |
| CO4A6_HUMAN | 86  |
| CO4A5_HUMAN | 77  |
| LAMB3_HUMAN | 90  |
| COIA1_HUMAN | 83  |
| NET4_HUMAN  | 38  |
| EGFL6_HUMAN | 43  |
| LAMB4_HUMAN | 100 |
| COSA1_HUMAN | 85  |
| VWA1_HUMAN  | 24  |
| LAD1_HUMAN  | 52  |
| SMOC2_HUMAN | 28  |
| AXA2L_HUMAN | 31  |
| VWC2_HUMAN  | 20  |

РЕПОЗИТОРИЙ БГУИР

**Выводы.** Таким образом, применяя модель протеолитической активности *in silico*, основанную на алгоритмах специфического гидролиза пептидных связей, можно анализировать:

- свойства продуктов протеолиза (молекулярную массу, длину пептида),
- показатели гидрофобности молекулярных фрагментов,
- природу и чередование полярных и неполярных радикалов в образованных пептидах, что позволит судить об их поверхностно-активных свойствах, а значит, о возможной модификации мембранной структуры.

Оценка свойств продуктов гидролиза в дальнейшем позволит минимизировать их патобиологическое действие на ткани и органы путем совершенствования методов гемосорбции продуктов эндотоксемии, а также ингибировать данные среднемoleкулярные фрагменты при специфическом их связывании с белковыми молекулами.

*N. S. Fitseva*

**PROTEOLYTIC DEGRADATION OF MEMBRANE PROTEINS *in silico*  
BASED ON THE SERINE PROTEASES ACTIVATION**

*Tutors: assist. K.G. Burdashkina*

*Department of Bioorganic chemistry*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Литература**

1. Goulet B. (2004). «Complete and limited proteolysis in cell cycle progression» / B. Goulet and A. Nerveu Cell Cycle 3: 986—989. PMID 15254406.
2. Веремеенко, К. Н. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике / К. Н. Веремеенко— К.: Здоров'я, 1971.
3. Карякина, Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // Клиническая лабораторная диагностика. — 2004. — № 3. — С. 4–8.
4. Медицинская энциклопедия — [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://znai.ru/art/400244900.php> (дата обращения: 02.05.2018).
5. Потапнев, М. П. Иммуные механизмы стерильного воспаления // Иммунология. 2015. №5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunnye-mehanizmy-sterilnogo-vospaleniya> (дата обращения: 04.05.2018).
6. Способ определения «средних молекул» / В.В. Николайчик [и др.]// Лаб. дело. — 1991. — №10. — С. 13—18.