

## ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУР МОЛЕКУЛ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ – БРОМЕЛИНА, ФИЦИНА И ПАПАИНА

Ф. А. Сакибаев<sup>1</sup>, М. Г. Холявка<sup>1,2</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 06.07.2020 г.

**Аннотация.** Цистеиновые протеазы (бромелин, фицин, папаин) характеризуются наличием в активном центре их молекул тиоловой группы остатка цистеина. Они являются одним из средств защиты растений от насекомых, нематод и микроорганизмов. В настоящее время цистеиновые протеазы находят широкое применение в промышленности и медицине.

Известно, что функционирование ферментов во многом определяется их структурой. Элементы внутренней структуры биокатализаторов, такие как внутренние полости, туннели и поры, являются неотъемлемыми компонентами нативной конформации белка. Они играют значительную роль в транспорте субстрата, кофакторов и ионов к активному и регуляторным центрам белковой макромолекулы. Кроме того, их конфигурация может влиять на термостабильность ферментов, в связи с чем изучение данных структур является важным для понимания механизмов функционирования биокатализаторов.

В работе исследованы состав, локализация и конфигурация внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах бромелина (PDB ID: 1W0Q) из *Ananas comosus*, фицина (PDB ID: 4YYW) из *Ficus carica* и папаина (PDB ID: 9PAP) из *Carica papaya*. Для расчета параметров обозначенных структур использовалась программа MOLE 2.13.9.6. Показано наличие 10, 2 и 3 туннелей для указанных энзимов соответственно; по 1 внутренней полости в составе бромелина и фицина и 3 полости в составе папаина; 13 пор в составе бромелина и их полное отсутствие для папаина и фицина. Бромелин и фицин имеют сходную локализацию внутренних полостей, однако, их структура различна. Бромелин предположительно имеет наименьшую степень компактизации в связи с наибольшим количеством внутренних структур. Приведены аминокислотный состав и профили туннелей и пор изучаемых протеаз. Установлено, что обозначенные структуры сообщаются друг с другом общими пустотами. Сходных по конфигурации и локализации туннелей в составе исследуемых протеаз обнаружено не было. Выявлено преобладание гидрофобных аминокислотных остатков в составе туннелей и пор.

**Ключевые слова:** бромелин, фицин, папаин, внутренние полости, туннели, поры

Цистеиновые (тиоловые) протеазы характеризуются наличием в активном центре тиоловой группы, присутствующей в остатке цистеина. Цистеиновые протеазы выделены из растений, животных, грибов и бактерий. Среди наиболее ярких примеров – папаин, актинидин, бромелин, фицин, катепсины В и Н, стрептококковые протеиназы, клострипин и кальпаины. Как правило, все они имеют относительно небольшие молекулярные массы, колеблющиеся от 20 до 35 кДа [1, 2].

В естественной среде растения подвергаются атакам различных патогенов и вредителей: бактерий, грибов, нематод и насекомых. В большинстве случаев отсутствие экспрессии цистеиновых протеаз приводит к снижению устойчивости рас-

тений к патогенам, что может указывать на их значительную роль в защите от вредителей [3-5].

В настоящее время цистеиновые протеазы находят широкое применение в биотехнологии. Бромелин (ЕС 3.4.22.32), фицин (ЕС 3.4.22.3), папаин (ЕС 3.4.22.2) из ананаса, инжира и папайи, соответственно, являются наиболее известными растительными протеазами, используемыми в пищевой промышленности, фармацевтике и других технологических процессах. Эти три фермента составляют 5 % мировых продаж протеаз [6]. Данные энзимы проявляют антимикробную, ранозаживляющую, антиоксидантную, антигипертензивную активность [7]. Кроме того, бромелин, фицин и папаин демонстрируют значительные перспективы в пищевой промышленности [8-11].

Доказано, что функционирование фермента во многом определяется его пространственной структурой. Влияние строения на каталитическую активность энзима может быть реализовано как через особенности взаимодействия с субстратом, так и через другие физико-химические свойства. В ряде работ показано, что изменения в составе и структуре внутренних полостей, туннелей и пор посредством направленного мутагенеза приводят к уменьшению или увеличению термостабильности биокатализатора. Кроме того, названные структуры участвуют в транспорте веществ (кофакторов, регуляторов, ионов и т.д.) к активному и вспомогательным центрам белка, что также указывает на их значительную роль в функционировании ферментов [12-17].

Целью данной работы является изучение состава, локализации и структуры внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах бромелина, фицина и папаина.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были выбраны бромелин (PDB ID: 1W0Q) из *Ananas comosus* [18], фицин (PDB ID: 4YYW) из *Ficus carica* [19] и папаин (PDB ID: 9PAP) из *Carica papaya* [20]. Расчет параметров и визуализацию внутренних полостей, туннелей и пор осуществляли в программе MOLE 2.13.9.6. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщающееся с поверхностью молекулы. Под «порой» – свобод-

ное пространство внутри глобулы, сообщающееся с ее поверхностью только через одно отверстие, т.е. углубление на поверхности или в толще молекулы. Под «туннелем» мы подразумевали сквозное отверстие в белковой глобуле, т.е. свободное пространство внутри молекулы, сообщающееся с ее поверхностью через два и более отверстий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В составе молекул бромелина и фицина обнаружено по 1 внутренней полости, для папаина их число составляет 3. Бромелин и фицин имеют сходную локализацию внутренних полостей, однако, их структура различна (рис. 1). В составе молекулы папаина не обнаружено полостей, имеющих сходную локализацию с таковой для первых двух ферментов.



Рис. 1. Структура и локализация внутренних полостей в составе молекул бромелина (слева), фицина (в центре) и папаина (справа)

Наибольшее число туннелей (10) обнаружено в молекуле бромелина. Молекулы фицина и папаина характеризуются наличием 2 и 3 туннелей соответственно. При анализе обсуждаемых в ра-

Таблица 1

Аминокислотный состав туннелей в молекулах бромелина, фицина и папаина

Фермент	№ туннеля	Аминокислоты
Бромелин	1	Glu118, Met121, Met122, Tyr165, Arg190, Asp191, Ile201, Ala202
	2	Glu118, Met121, Val160, Thr161, Ala162, Ile163, Tyr165, Tyr185, Ile186, Met188, Arg190, Asp191, Ile201, Ala202
	3	Glu118, Met121, Val147, Tyr165, Gln167, Asp168, Arg187, Met188, Ala189, Arg190, Asp191, Ile201, Ala202
	4	Arg9, Glu118, Met121, Ala162, Ile163, Gly164, Tyr165, Gln167, Glu182, Tyr185, Ile186, Arg187, Met188, Arg190, Asp191, Ile201, Ala202
	5	Cys26, Gly65, Gly66, Trp67, Glu68, Ala133, Asn157, Ala159
	6	Gly66, Trp67, Glu68, Ala133, Leu156, Asn157, Ala159, Ile203
	7	Val35, Ile38, Tyr39, Phe72, Ile75, Ser104, Ala105, Tyr106, Ile107, Pro208, Leu210
	8	Lys144, Tyr172, Lys174, Trp176, Lys179, Trp180
	9	Gln53, Ala82, Tyr87, Lys97, Gly100, Val101
	10	Val14, Thr15, Ala33, Glu36, Ser37, Leu46, Ile163
Фицин	1	Asp14, Pro15, Arg17, Phe28, Ser29, Val32, Glu35, Ser47, Glu50, Ala63, Val164, Arg181, Ser183
	2	Ala7, So4100, Asp115, Val116, Pro117, Ala118, Asn120, Leu124, Ala210, Met211, Glu212, Ser213
Папаин	1	Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Val75, Tyr78, Gly79, Cys95, Ser97, Tyr103
	2	Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Tyr78, Gly79, Ile80, Cys95, Ser97, Tyr103
	3	Ala30, Tyr67, Pro68, Trp69, Leu72, Ser131, Val133, Ser205, Phe207

боте ферментов нами не обнаружено сходных по структуре и локализации туннелей в их молекулах (рис. 2, 3). Аминокислотный состав туннелей представлен в таблице 1.

В молекуле бромелина было выявлено 13 пор (рис. 4 и 5). Их аминокислотный состав приведен в таблице 2. Анализ моделей пространственных структур фицина и бромелина показал отсутствие в их составе пор. На основании указанных данных можно предположить, что наименьшая степень компактизации характерна для бромелина.



Рис. 2. Структура и локализация туннелей в составе молекул бромелина (слева), фицина (в центре) и папаина (справа)

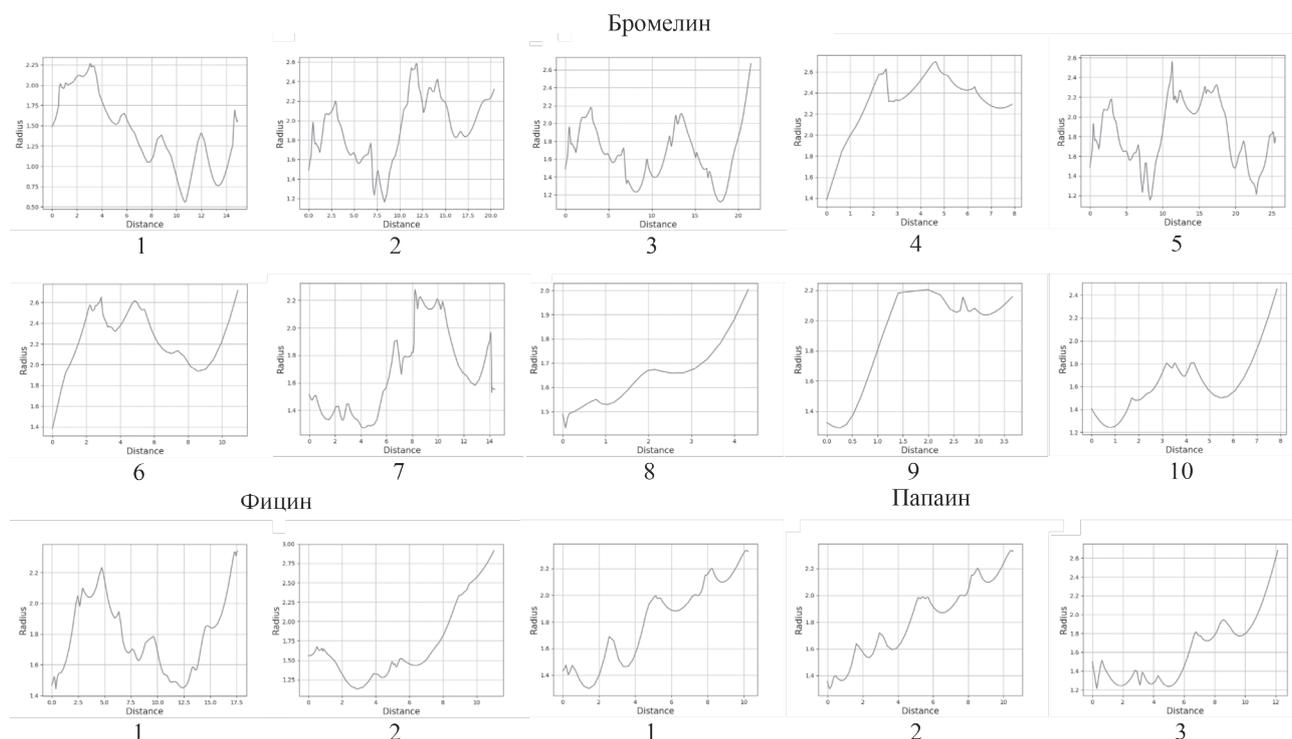


Рис. 3. Профили туннелей (обозначены цифрами), входящих в состав молекул бромелина, фицина и папаина

При анализе туннелей и пор было установлено, что данные структуры сообщаются общими пустотами в составе молекул бромелина и папаина. В составе последнего 2 из 3 туннелей сообщаются общей пустотой. Молекула бромелина характеризуется значительной степенью разветвленности

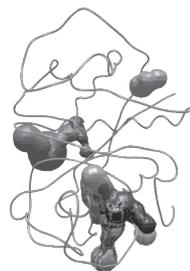


Рис. 4. Структура и локализация пор в составе молекулы бромелина

внутренних структур. Только 2 туннеля из приведенных 10 и одна пора из 13 пор не сообщаются с другими структурами общими пустотами.

В наибольшем количестве в составе туннелей и пор представлены гидрофобные аминокислотные остатки: их доля составляет 51 %, 50 % и 66 % для бромелина, фицина и папаина соответственно; доля заряженных аминокислот – 25 %, 25 % и 6 % соответственно. Видно, что присутствие заряженных остатков в составе туннелей в молекуле папаина выражено в наименьшей степени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание особенностей функционирования энзимов, а также разработка на их основе катализаторов для биотехнологического использо-

Аминокислотный состав пор в молекуле бромелина

№ поры	Аминокислоты
1	Asp7, Arg9, Gly164, Gln167, Tyr185, Arg187
2	Asp7, Arg9, Thr161, Ile163, Gly164, Gln167, Tyr185, Ile186, Arg187
3	Arg9, Thr161, Ile163, Gly164, Gln167, Glu182, Tyr185, Ile186, Arg187
4	Ser5, Ile6, Asp7, Val147, Gly164, Tyr165, Gln167, Asp168, Arg187, Met188, Ala189, Arg190
5	Arg9, Val147, Gly164, Tyr165, Gln167, Asp168, Glu182, Tyr185, Arg187, Met188, Ala189, Arg190
6	Val147, Val160, Thr161, Ala162, Gly164, Tyr165, Gln167, Asp168, Tyr185, Ile186, Arg187, Met188, Ala189, Arg190, Ile201
7	Gln4, Glu118, Met121, Met122, Val160, Thr161, Ala162, Tyr165, Gly166, Tyr185, Ile186, Met188, Arg190, Ile201
8	Gln4, Glu118, Met121, Met122, Val147, Tyr165, Gly166, Gln167, Asp168, Arg187, Met188, Ala189, Arg190, Ile201
9	Gln4, Arg9, Glu118, Met121, Met122, Ala162, Ile163, Gly164, Tyr165, Gly166, Gln167, Tyr185, Ile186, Arg187, Met188, Arg190, Ile201
10	Gln4, Asp7, Arg9, Glu118, Met121, Met122, Ala162, Ile163, Gly164, Tyr165, Gly166, Gln167, Tyr185, Ile186, Arg187, Met188, Arg190, Ile201
11	Arg112, Val113, Pro114, Arg115, Ngz121, Asp204, Pro205, Leu206
12	Trp67, Phe69, Arg112, Val113, Pro114, Arg115, Ngz121, Leu156, Ile203, Asp204, Pro205, Leu206
13	Val35, Tyr39, Glu47, Leu49, Asn103, Ser104, Ala105

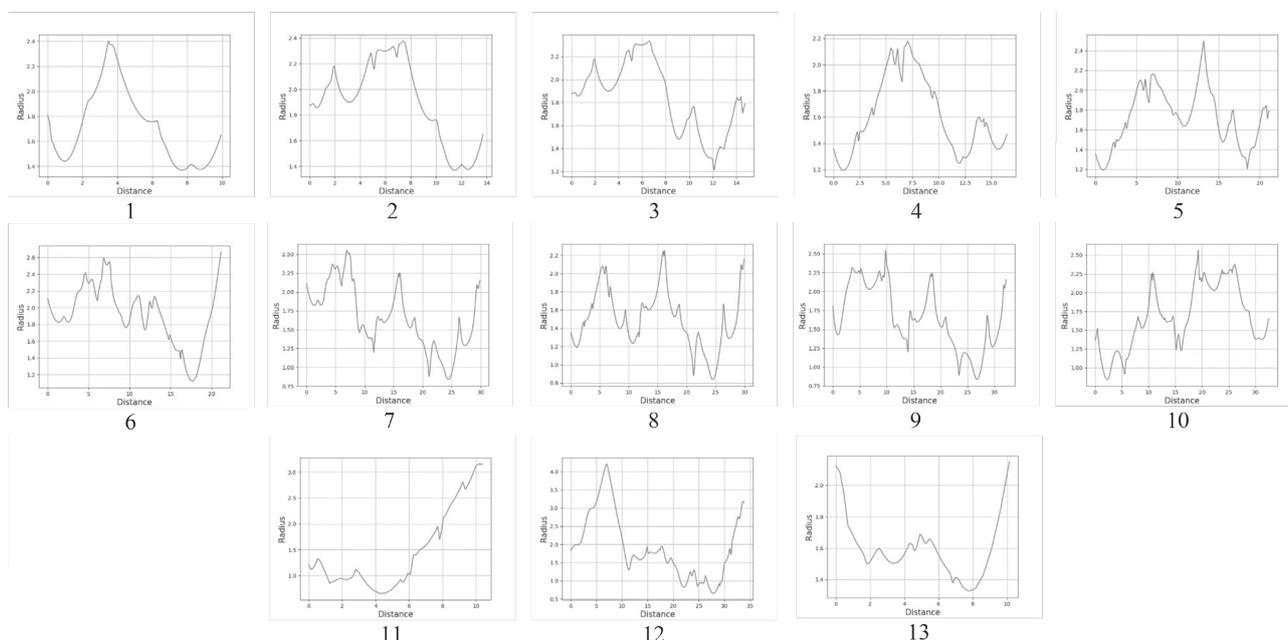


Рис. 5. Профили пор (обозначены цифрами), входящих в состав молекулы бромелина

вания невозможны без детального изучения их пространственной структуры. В настоящей работе выявлено наличие 1 внутренней полости для бромелина и фицина и 3 структур данного типа в составе папаина. Показано наличие 10 туннелей и 13 пор в молекуле бромелина, 2 и 3 туннелей в молекулах фицина и папаина. Установлено, что гидрофобные аминокислоты преобладают в туннелях и порах для исследуемых ферментов. Выявлено, что данные структуры сообщаются друг с другом общими полостями.

Приведенные особенности строения молекул бромелина, фицина и папаина могут играть существенную роль в их внутриклеточном функцио-

нировании, что необходимо учитывать при разработке на их основе промышленных катализаторов и медицинских препаратов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shindo T., Van Der Hoorn R.A.L. Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders // *Molecular plant pathology*. 2008. Vol. 9(1). P. 119-125.

2. Wilkesman J. Cysteine protease zymography: brief review. *Zymography*. – Humana Press, New York, NY, 2017. P. 25-31.
3. Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex // *The Plant Journal*. 2004. Vol. 37(3). P. 370-378.
4. Misas-Villamil J.C., van der Hoorn R.A.L., Doehlemann G. Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity // *New Phytologist*. 2016. Vol. 212(4). P. 902-907. DOI: 10.1111/nph.14117
5. Pechan T., Cohen A., Williams W.P., Luthe D.S. Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. Vol. 99(20). P. 13319-13323.
6. Illanes A. Enzyme biocatalysis. Principles and Applications. Editorial Springer-Verlag New York Inc., United States. 2008. P. 1-56.
7. Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suarez J.C., Yada R.Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review // *Critical reviews in food science and nutrition*. 2018. Vol. 58(13). P. 2147-2163.
8. Arshad M.S., Kwon J.H., Imran M., Sohaib M., Aslam A., Nawaz I., Amjad Z., Khan U., Javed M. Plant and bacterial proteases: A key towards improving meat tenderization, a mini review // *Cogent Food & Agriculture*. 2016. Vol. 2(1). P. 1261780. DOI: 10.1080/23311932.2016.1261780
9. Fernández-Lucas J., Castañeda D., Hormigo D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry // *Trends in Food Science & Technology*. 2017. Vol. 68. P. 91-101. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.08.017
10. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O.L., Berenguer-Murcia Á., Fernández-Lafuente R. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis // *International journal of biological macromolecules*. 2020. Vol. 162. P. 394-404. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144
11. Meshram A., Singhal G., Bhagyawant S. S., Srivastava N. *Plant-Derived Enzymes: A Treasure for Food Biotechnology*. Enzymes in Food Biotechnology. – Academic Press, 2019. P. 483-502.
12. Buša Jr.J., Buša J., Hayryan S., Hu C.K., Wu M.C. CAVE-CL: An OpenCL version of the package for detection and quantitative analysis of internal cavities in a system of overlapping balls: Application to proteins // *Computer Physics Communications*. 2015. Vol. 190. P. 224-227.
13. Voss N.R., Gerstein M. 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor // *Nucleic acids research*. 2010. Vol. 38(2). P. W555-W562. DOI: 10.1093/nar/gkq395
14. Coleman R.G., Sharp K.A. Protein pockets: inventory, shape, and comparison // *Journal of chemical information and modeling*. 2010. Vol. 50(4). P. 589-603. DOI: 10.1021/ci900397t
15. Koudelakova T., Chaloupkova R., Brezovsky J., Prokop Z., Sebestova E., Hesseler M., Khabiri M., Plevaka M., Kulik D., Smatanova I.K., Rezacova P., Ettrich R., Bornscheuer U.T., Damborsky J., Rezacova P. Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel // *Angewandte Chemie*. 2013. Vol. 125(7). P. 2013-2017.
16. Kokkonen P., Bednar D., Pinto G., Prokop Z., Damborsky, J. Engineering enzyme access tunnels // *Biotechnology advances*. 2019. Vol. 37(6). P. 107386.
17. Woycechowsky K.J., Seebeck F.P., Hilvert D. Tunnel plasticity and quaternary structural integrity of a pentameric protein ring // *Protein science*. 2006. Vol. 15(5). P. 1106-1114.
18. Banerjee N., Banerjee A. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1W0Q> (дата обращения: 20.08.2020)
19. Azarkan M., Baeyens-Volant D., Loris R. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4YYW> (дата обращения: 20.08.2020)
20. Kamphuis I.G., Drenth J. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/9PAP> (дата обращения: 20.08.2020)

*Воронежский государственный университет*  
*Сакибаев Ф. А., аспирант кафедры биофизики*  
*и биотехнологии*  
*E-mail: farkhatlukum@gmail.com*

*\*Холявка М. Г., доктор биологических наук,*  
*доцент кафедры биофизики и биотехнологии,*  
*профессор кафедры "Физика", Севастопольский*  
*государственный университет*  
*E-mail: holyavka@rambler.ru*

*Voronezh State University*  
*Sakibaev F. A., post-graduate student, Biophysics*  
*and Biotechnology Department*  
*E-mail: farkhatlukum@gmail.com*

*\*Holyavka M. G., PhD., DSci., Biophysics and*  
*Biotechnology Department, professor of Physics*  
*Department, Sevastopol State University*  
*E-mail: holyavka@rambler.ru*

Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

Артюхов В. Г., профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, head of biophysics and biotechnology department

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

## FEATURES OF SPATIAL STRUCTURES OF PLANT PROTEASES MOLECULES – BROMELAIN, FICIN AND PAPAIN

F. A. Sakibaev<sup>1</sup>, M. G. Holyavka<sup>1,2</sup>, V. G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State University

<sup>2</sup> Sevastopol State University

**Abstract.** Cysteine proteases (bromelain, ficin, papain) are characterized by the presence of a thiol group of the cysteine residue in the active center of their molecules. They are one of the plant protection agents for insects, nematodes and microorganisms. Currently, cysteine proteases are widely used in industry and medicine.

It is known that the functioning of enzymes is largely determined by their structure. Elements of the internal structure of biocatalysts, such as internal cavities, tunnels and pores, are integral components of the native conformation of protein. They play a significant role in the transport of the substrate, cofactors, and ions to the active and regulatory centers of protein macromolecules. In addition, their configuration can affect the thermal stability of enzymes, and therefore the study of these structures is important for understanding the mechanisms of biocatalyst functioning.

In this work, we investigated the composition, localization and configuration of internal cavities, tunnels and pores in molecules of bromelain (PDB ID: 1W0Q) from *Ananas comosus*, ficin (PDB ID: 4YYW) from *Ficus carica*, and papain (PDB ID: 9PAP) from *Carica papaya*. MOLE 2.13.9.6 program was used to calculate the parameters of the indicated structures. It is shown the presence of 10, 2 and 3 tunnels for the indicated enzymes respectively, the presence of 1 internal cavity in the bromelain and ficin molecules and 3 cavities in the composition of papain and the presence of 13 pores in bromelain and their complete absence for papain and ficin. Bromelain and ficin have a similar localization of the internal cavities, but their structure is different. Bromelain probably has the least degree of compaction due to the highest number of internal structures. The amino acid composition and profiles of tunnels and pores for the studied enzymes are given. It was found that the indicated structures communicate with each other by common voids. No tunnels similar in configuration and localization were found in the composition of the investigated proteases. The predominance of hydrophobic amino acid residues in the tunnels and pores was revealed.

**Keywords:** bromelain, ficin, papain, internal cavities, tunnels, pores