

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СТРУКТУРЫ ВНУТРЕННИХ ПОЛОСТЕЙ, ТУННЕЛЕЙ И ПОР В МОЛЕКУЛЕ ПАПАИНА ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С РАЗЛИЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Ф. А. Сакибаев¹, М. Г. Холявка^{1,2}, В. Г. Артюхов¹

1 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2 - ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 1.03.2021 г.

Аннотация. Папаин относится к цистеиновым протеазам с эндолитическим действием. В составе латекса папайи фермент участвует в защите растения от насекомых и фитопатогенов. Папаин находит широкое применение в пищевой промышленности в качестве размягчителя мяса и осветляющего агента. Энзим показывает высокую эффективность при лечении спортивных травм, обладает анальгетической и противовоспалительной активностью в отношении симптомов острого аллергического синусита без побочных эффектов.

Известно, что функционирование ферментов определяется их пространственной структурой. Изменение в составе и структуре внутренних полостей, туннелей и пор может влиять на термостабильность биокатализаторов.

В работе исследованы состав, локализация и структура внутренних полостей, туннелей, пор в молекуле папаина при ее связывании с различными лигандами: метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина, сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом, локсистатиновой кислотой (E64-с) и хлорметилкетонем. Все исследованные нами формы фермента показывают сходную локализацию туннелей и пор. Модели 1KNQ и 1PIP характеризуются меньшим суммарным объемом внутренних полостей, чем фермент без лигандов, тогда как структуры 1PPP и 5PAD – их большим объемом. В составе модели 1PIP туннели отсутствуют. Структура туннелей у всех изученных нами форм папаина отличается от таковой для свободного фермента. Показано полное отсутствие пор у свободного и связанного со всеми представленными в работе лигандами папаина.

Ключевые слова: папаин, внутренние полости, туннели, поры, *in silico* анализ.

Папаин (КФ 3.4.22.2) относится к цистеиновым протеазам с эндолитическим действием и выделяется из латекса папайи (*Carica papaya L.*). Он проявляет протеолитическую активность в отношении белков, короткоцепочечных пептидов, сложных эфиров аминокислот и амидных звеньев и широко применяется в пищевой промышленности и медицине [1]. Фермент предпочтительно расщепляет пептидные связи с участием основных аминокислот, особенно аргинина, лизина и остатков, расположенных после фенилаланина [2, 3]. В составе латекса папайи он выполняет защитную функцию. Папаин оказывает токсическое действие на шелкопряда *Eri silkworm*, *Mamestra brassicae* и *Spodoptera litura*, а также на некоторых жесткокрылых [4]. Кроме того, фермент вы-

ступает в качестве защитного агента против ряда фитопатогенов [5].

Папаин используется для лечения спортивных травм. Было показано, что спортсмены, принимавшие добавки с папаином, смогли сократить время восстановления с 8.4 до 3.9 дней [6, 7]. Установлено, что папаин обладает значительной анальгетической и противовоспалительной активностью в отношении симптомов острого аллергического синусита без побочных эффектов [8].

Папаин используется в составе размягчителей мяса [9]. Фермент также может действовать как осветляющий агент во многих процессах пищевой промышленности. Как переваривающий белок, папаин используется для борьбы с диспепсией и другими расстройствами пищеварения и желудочно-кишечного тракта [10, 11]. Сообщалось, что папаин улучшает плавкость и растяжимость сыра [12]. Эн-

зим обладает противогрибковыми, антибактериальными и противовоспалительными свойствами.

Известно, что функционирование фермента определяется его пространственной структурой. В ряде работ показано, что «заполнение» или «создание» полостей с помощью сайт-направленного мутагенеза может соответственно увеличивать или уменьшать термостабильность белка [13-16].

Целью данной работы является изучение состава, локализации и структуры внутренних полостей, туннелей, пор в молекуле папаина из *Carica papaya* при ее связывании с различными лигандами.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали модели пространственной структуры свободного (9PAP [17]) и связанного с различными лигандами папаина (табл. 1).

Расчет параметров и визуализацию внутренних полостей, туннелей и пор осуществляли в программе MOLE 2.5.17.4.24. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщающееся с поверхностью молекулы. Под «порой» – свободное пространство внутри глобулы, сообщающееся с ее поверхностью только через одно отверстие, т.е. углубление на поверхности или в толще молекулы. Под «туннелем» 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

Нами были обнаружены по 3 внутренних полости в составе моделей пространственных структур папаина 1KHQ и 1PIP, по 4 в составе структур 1PPP, 5PAD, 9PAP. Все представленные в работе

модели показывают сходную локализацию данных структур в молекуле (рис. 1).

В табл. 2 представлены аминокислотный состав и объем внутренних полостей. Свободная молекула папаина характеризуется наличием 47 аминокислотных остатков в составе всех структур данного типа, а также их суммарным объемом, равным 826.1 Å³. В случае моделей 1KHQ и 1PIP наблюдается наименьшее число аминокислотных остатков, входящих в состав внутренних полостей, а также минимальный суммарный объем данных структур, что, вероятно, может указывать на некоторую компактизацию молекулы папаина при связывании с метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина и сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом. Увеличение числа аминокислотных остатков в составе внутренних полостей (53 и 65 соответственно), а также объема данных структур (901.1 Å³ и 1188.6 Å³ соответственно) характерно для форм 1PPP и 5PAD, что может свидетельствовать о декомпактизации молекулы папаина при взаимодействии с локсистиновой кислотой и хлорметилкетон.

Таблица 1

Лиганды, связанные с молекулой папаина

Номер модели в базе PDB	Лиганд
1KHQ	метиловый эфир <i>N</i> -трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина
1PIP	сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala- <i>p</i> -нитроанилид
1PPP	локсистиновая кислота (E64-с)
5PAD	хлорметилкетон

Нами были обнаружены по 2 туннеля в составе моделей 1KHQ и 5PAD и по одному туннелю в составе свободного фермента (9PAP) и структуры 1PPP. Туннели в форме 5PAD на значительной протяженности сообщаются общей пустотой, что

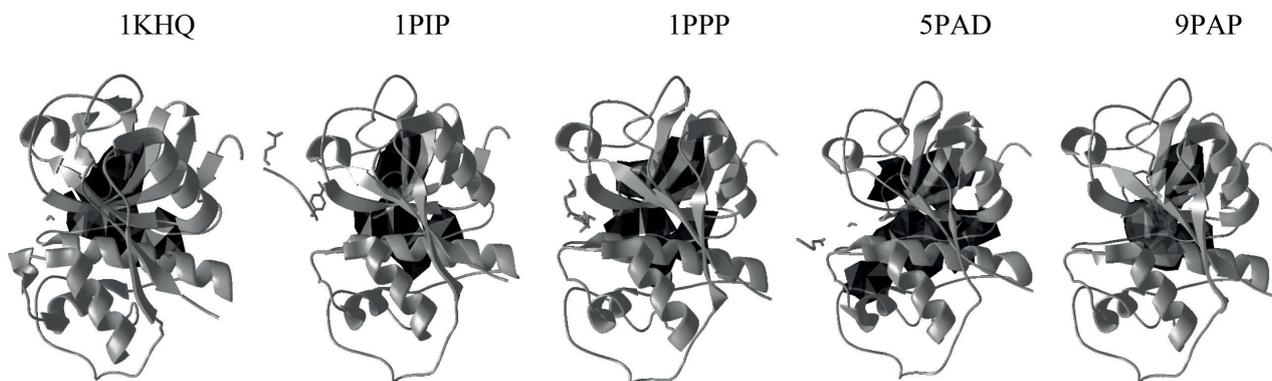


Рис. 1. Внутренние полости в составе молекулы папаина, связанной с различными лигандами

Таблица 2

Аминокислотный состав и объем внутренних полостей в составе молекулы папаина, связанной с различными лигандами

Модель	Аминокислотный состав	Число аминокислот	Объем, Å ³
1KHQ	1. Val16, Lys17, Cys25, Phe28, Ser29, Val31, Val32, Glu35, Glu50, His159, Ala160, Val161, Ala162, Lys174, Asn175, Ser176	16	349.5
	2. Pro68, Trp69, Ser131, Val132, Val133, Ser205, Ser205, Leu251, Phe252	14	199.1
	3. Ala12, Val13, Thr14, Val32, Glu35, Gly36, Leu45, Pro129, Val164, Lys174	10	129.4
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	40	678.0
1PIP	1. Val16, Lys17, Cys25, Phe28, Ser29, Val31, Val32, Glu35, Glu50, Arg83, His159, Ala160, Val161, Ala162, Lys174, Asn175, Ser176	17	350.3
	2. Gln112, Val113, Gln114, Pro115, Tyr116, Asn117, Leu121, Leu202, Tyr203, Ser205, Ser206	11	179
	3. Ala12, Val13, Thr14, Val32, Glu35, Leu45, Pro129, Val164, Lys174	9	111.8
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	37	641.1
1PPP	1. Val16, Lys17, Cys25, Phe28, Ser29, Val31, Val32, Glu35, Gln47, Tyr48, Glu50, Arg83, His159, Ala160, Val161, Ala162, Lys174, Asn175, Ser176	19	406.4
	2. Gln112, Val113, Gln114, Pro115, Tyr116, Asn117, Gln118, Leu121, Leu202, Tyr203, Ser205, Ser206	12	193.3
	3. Val132, Val133, Leu134, Phe141, His159, Val161, Ile173, Asn175, Trp181, Ile187, Leu202	11	166.9
	4. Trp7, Ala12, Val13, Thr14, Val32, Glu35, Gly36, Leu45, Pro129, Val164, Lys174	11	134.5
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	53	901.1
5PAD	1. Trp7, Ala12, Val13, Thr14, Val16, Lys17, Asn18, Gln19, Phe28, Ser29, Val31, Val32, Thr33, Glu35, Gly36, Ile40, Leu45, Asn46, Gln47, Tyr48, Glu50, Arg83, Pro129, Val130, Ser131, Val161, Ala162, Ala163, Val164, Lys174, Asn175, Ser176, Tyr186	33	743.1
	2. Leu121, Leu122, Ile125, Val130, Val132, Val161, Ala162, Ala163, Gly165, Tyr166, Ile171, Ile173, Leu202	13	203.7
	3. Cys22, Ser24, Trp26, Ala27, Phe28, Glu50, Gln51, Leu54, Tyr88, Gly90, Val91	11	137.6
	4. Leu134, Phe141, His159, Val161, Ile173, Asn175, Ile187, Ile189	8	104.3
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	65	1188.6
9PAP	1. Val16, Lys17, Ocs25, Phe28, Ser29, Val31, Val32, Glu35, Glu50, Ala160, Val161, Ala162, Lys174, Asn175, Ser176	15	337.2
	2. Ala30, Thr33, Pro68, Trp69, Leu72, Ser131, Val132, Val133, Ala160, Ser205, Phe207, Moh225	12	188.5
	3. Gln112, Val113, Gln114, Pro115, Asn117, Leu121, Leu202, Tyr203, Thr204, Ser205, Ser206	11	172.9
	4. Ala12, Val13, Thr14, Val32, Glu35, Leu45, Pro129, Val164, Lys174	9	127.5
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	47	826.1

видно из аминокислотного состава (табл. 3). В модели 1PIP туннели не обнаружены. Среди всех выявленных туннелей наблюдается один со сходной для всех моделей локализацией (рис. 2), однако, его структура в их составе в разной степени отлича-

ется (рис. 3), что может указывать на характер конформационных перестроек в молекуле папаина при связывании с различными лигандами.

Поры не обнаружены ни в одной из представленных в работе форм папаина.

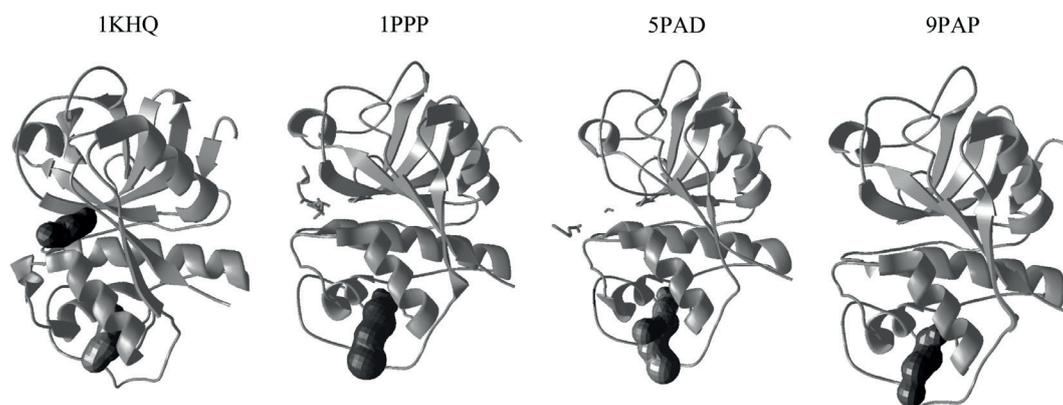


Рис. 2. Локализация туннелей в составе молекулы папаина, связанной с различными лигандами

Аминокислотный состав туннелей в составе молекулы папаина, связанной с различными лигандами

Модель	Аминокислотный состав	Число аминокислот
1KHQ	1. Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Tyr78, Gly79, Ile80, Cys95, Ser97, Tyr103	10
	2. Pro68, Trp69, Ser131, Val132, Val133, Ser205, Ser205, Leu251, Phe252	9
1PPP	Ser49, Glu52, Leu53, Cys56, Arg58, Leu74, Tyr78, Gly79, Ile80, Cys95, Ser97, Arg98, Tyr103	13
5PAD	1. Ser49, Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Tyr78, Gly79, Ile80, Ser97, Tyr103	10
	2. Ser49, Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Tyr78, Gly79, Ile80, Ser97, Arg98, Tyr103	11
9PAP	Glu52, Leu53, Cys56, Leu74, Val75, Val75, Tyr78, Gly79, Cys95, Ser97, Arg98, Tyr103	12

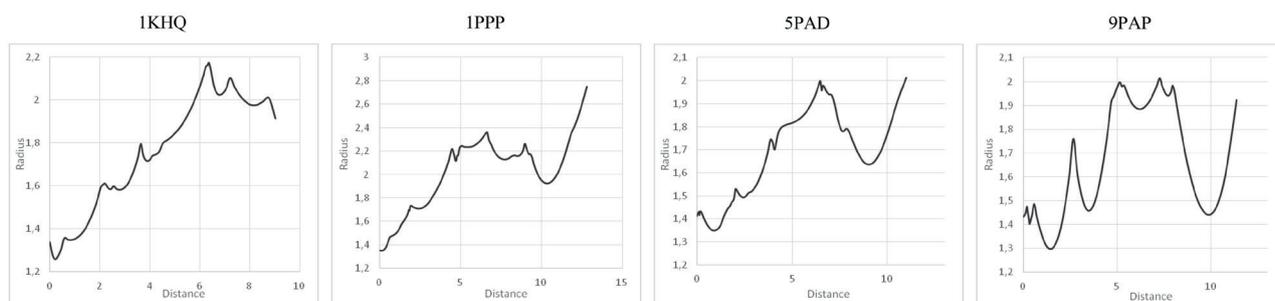


Рис. 3. Профиль общего для представленных в работе моделей туннеля в составе папаина

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Папаин играет важную роль в защите растения от насекомых и фитопатогенов. Знание динамики изменения пространственной структуры фермента при его связывании с различными лигандами может сыграть значительную роль в понимании механизма его функционирования. Представленные в работе данные об изменении состава, структуры и локализации внутренних полостей и туннелей в молекуле папаина при связывании с различными соединениями важны для выявления конформационных перестроек энзима в ходе его функционирования. Кроме того, они могут быть использованы для исследования каталитических свойств фермента, таких как термостабильность, при его взаимодействии с соединениями различной природы как в составе растительного организма, так и при разработке промышленных катализаторов.

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

- Uhlig H. (ed.). Industrial enzymes and their applications. – John Wiley & Sons, 1998.
- Menard R., Carriere J., Laflamme P., Plouffe C., Khouri H. E., Vernet T., Storer A. C., Biochemistry, 1991, Vol. 30(37), pp. 8924-8928.
- Mamboya, E. A. F., American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2012, Vol. 8(2), pp. 99-104.
- Pechan T., Cohen A., Williams W. P., Luthe D. S., Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, Vol. 99(20), pp. 13319-13323.
- Ramos M. V., Demarco D., da Costa Souza I. C., de Freitas C. D. T., Trends in plant science, 2019, Vol. 24(6), pp. 553-567.
- Trickett P., Applied therapeutics, 1964, Vol. 6, pp. 647-652.
- Deitrick R. E., Pennsylvania medicine, 1965, Vol. 68(10), pp. 35-37.
- Mansfield L. E., Vaughan T. R., Waller S. F., Haverly R. W., Ting S., Annals of allergy, 1985, Vol. 55(2), pp. 126-129.
- Khanna N., Panda P. C., Indian Journal of Animal Research, 2007, Vol. 41(1), pp. 55-58.
- Huet J., Wyckmans J., Wintjens R., Boussard P., Raussens V., Vandenbussche G., Looze Y., Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2006, Vol. 63(24), pp. 3042-3054.
- Fernández-Lucas J., Castañeda D., Hormigo D., Trends in Food Science & Technology, 2017, Vol. 68, pp. 91-101.
- Abu-Alruz K., Mazahreh A. S., Al-Shawabkeh A. F., Al-Omari A., Quasem J. M., American Journal of Applied Sciences, 2009, Vol. 6(8), pp. 1553-1559.
- Kellis J. T., Nyberg K., Fersht A. R., Nature, 1988, Vol. 333(6175), pp. 784-786.
- Eriksson A. E., Baase W. A., Matthews B. W., Journal of molecular biology, 1993, Vol. 229(3), pp. 747-769.
- Karpusas M., Baase W. A., Matsumura M., Matthews B. W., Proceedings of the National

Academy of Sciences, 1989, Vol. 86(21), pp. 8237-8241.

16. Kellis Jr J. T., Nyberg K., Fersht A. R., Biochemistry, 1989, Vol. 28(11), pp. 4914-4922.

17. Kamphuis I.G., Kalk K.H., Swarte M.B., Drenth J., Journal of molecular biology, 1984, Vol. 179, pp.233-56

18. Janowski R., Kozak M., Jankowska E., Grzonka Z., Jaskólski M., The Journal of peptide research, 2004, Vol. 64(4), pp. 141-150.

19. Yamamoto A., Tomoo K., Doi M., Ohishi H., Inoue M., Ishida T., Okada, Y., Biochemistry, 1992, 31(46), pp. 11305-11309.

20. Kim M. J., Yamamoto D., Matsumoto K., Inoue M., Ishida T., Mizuno H., Kitamura K., Biochemical Journal, 1992, Vol. 287(3), pp. 797-803.

21. Drenth J., Kalk K. H., Swen H. M., Biochemistry, 1976, Vol. 15(17), pp. 3731-3738.

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

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

**Холявка М. Г., доктор биологических наук,*
доцент кафедры биофизики и биотехнологии
профессор кафедры «Физика» Севастополь-
ского государственного университета
E-mail: holyavka@rambler.ru

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

Артюхов В. Г., профессор, доктор биологических
наук, зав. 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

IN SILICO STUDY OF THE COMPOSITION AND STRUCTURE OF INTERNAL CAVITIES, TUNNELS AND PORES OF THE PAPAINE MOLECULE AT BINDING WITH DIFFERENT LIGANDS

F. A. Sakibaev¹, M. G. Holyavka^{1,2}, V. G. Artyukhov¹

¹*Voronezh State University*

²*Sevastopol State University*

Abstract. Papain is a cysteine protease which have the endolytic action. As part of papaya latex, the enzyme is involved in defence of the plant from insects and phytopathogens. Papain is widely used in the food industry as a meat tenderizer and clarifying agent. The enzyme is highly effective in the treatment of sports injuries, has analgesic and anti-inflammatory activity against the symptoms of acute allergic sinusitis without side effects.

It is known that the functioning of enzymes is determined by their spatial structure. Thus, a change in the composition and structure of internal cavities, tunnels and pores can affect the thermal stability of biocatalysts.

The composition, localization and structure of internal cavities, tunnels, pores in the papain molecule when it binds to various ligands: methyl ester of *N*-tert-butylloxycarbonyl-phenyl-glycine, succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide, loxystatinic acid (E64-c) and chloromethyl ketone were investigated in this work. All the studied forms of the enzyme show similar localization of tunnels and pores. Models 1KHQ and 1PIP are characterized by a smaller total volume of internal cavities than the enzyme without ligands, whereas the structures 1PPP and 5PAD have a larger volume. There are no tunnels in the 1PIP model. The structure of the tunnels in all the forms of papain studied by us differs from that for the free enzyme. The complete absence of pores was shown in free papain and associated with all ligands presented in the work.

Keywords: papain, internal cavities, tunnels, pores, in silico analysis.