

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

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

1 - ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

2 - ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

**Аннотация.** Цистеиновые протеазы участвуют во многих аспектах физиологии и развития растений, включая старение, формирование цветков, реакцию на различные типы экологического стресса, контроль запрограммированной гибели клеток. С другой стороны, фармакологическое действие цистеиновых протеаз растений давно признано.

Бромелин – это собирательное название родственных протеолитических ферментов, обнаруженных в тканях видов, принадлежащих к семейству *Bromeliaceae*, из которых наиболее известен ананас (*Ananas comosus*). Различают два различных типа ананасового бромелина: стебельный (КФ 3.4.22.32) и фруктовый (КФ 3.4.22.33). Как и папаин, бромелин является широко используемой в терапии протеазой.

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 бромелина при ее связывании с различными лигандами: L-винная кислота, сульфат-ион, глицерол, N-[(1S)-5-амино-1-(хлорацетил)пентил]-4-метилбензолсульфонамид (лизин-подобный ингибитор), 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопираноза, N-[N-[1-гидроксикарбокситэтилкарбонил]лейциламино-бутил] гуанидин, цитрат.

Нами обнаружено по 2 внутренние полости в моделях 6YCB, 6YCD и 6YCE и одна внутренняя полость в составе структуры 6YCF. Наибольший суммарный объем внутренних полостей выявлен для 6YCE, наименьший – для 6YCB. В составе не связанной с лигандами молекулы бромелина внутренние полости не обнаружены.

Выявлено наличие 1 туннеля в составе моделей 6YCB, 6YCD и 6YCE. Структура и локализация данных туннелей отличается во всех перечисленных формах бромелина. В составе модели 6YCF и фермента, не связанного ни с одним лигандом, туннели не обнаружены. Также нами не было выявлено наличие пор ни в одной из исследуемых форм бромелина.

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

Цистеиновые протеазы, как известно, участвуют во многих аспектах физиологии растений, включая старение, формирование цветков и реакцию на различные типы экологического стресса [1, 2]. Продемонстрировано участие цистеиновых протеаз в контроле запрограммированной гибели клеток у разных видов растений [3, 4]. С другой стороны, фармакологическое действие цистеиновых протеаз давно признано. Папаин – первая цистеиновая протеаза, выделенная из латекса папайи (*Carica papaya*), используется в фармакологиче-

ских исследованиях как потенциальное лекарство от бактериальных и грибковых заболеваний [5].

Бромелин – это собирательное название родственных протеолитических ферментов, обнаруженных в тканях видов, принадлежащих к семейству *Bromeliaceae*, из которых наиболее известен ананас (*Ananas comosus*). Различают два различных типа ананасового бромелина: стебельный (КФ 3.4.22.32) и фруктовый (КФ 3.4.22.33) [6]. Как и папаин, бромелин – широко используемая в терапии протеаза [7]. Показано, что бромелин является безопасной и эффективной пищевой добавкой [8]. В других исследованиях было установлено, что трансгенная экспрессия гена

бромелина ВАА1 плодов ананаса обеспечивает повышенную устойчивость китайской капусты к бактериальной мягкой гнили [9].

Бромелин используется как народное лекарственное средство во многих коренных культурах на Филиппинах и Гавайях. Ряд исследований показал благотворное влияние бромелина при различных состояниях, связанных со здоровьем, его использовали для устранения отеков, воспалений, синяков и боли, связанных с травмами и операциями. Бромелин не только эффективен, но и имеет меньше побочных эффектов по сравнению с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) [10-15].

Известно, что функционирование фермента определяется его пространственной структурой. Выявлено, что «заполнение» или «создание» полостей с помощью сайт-направленного мутагенеза может соответственно увеличивать или уменьшать термостабильность белка [16-19].

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

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали модели пространственной структуры свободного

(6OKJ [20]) и связанного с различными лигандами бромелина [21] (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 обнаружено по 2 внутренние полости в моделях 6YCB, 6YCD и 6YCE и одна внутренняя полость в составе 6YCF (рис. 1). Анализ моделей 6YCE и 6YCF показывает наличие для них сходной по локализации, объему и аминокислотному составу полости, что может указывать на характер влияния 2-ацетидамо-2-дезоксид-бета-D-глюкопиранозы на конформацию бромелина. Однако модель 6YCE имеет в своем составе дополнительную полость, в связи с чем суммарный объем данных структур выше, чем у 6YCF. Вероятно, это может объясняться тем, что при связывании

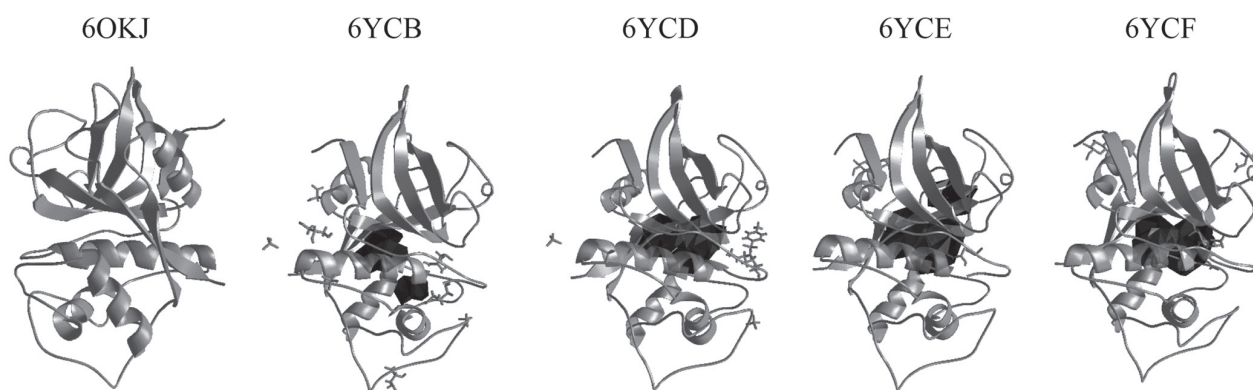


Рис. 1. Внутренние полости в составе молекулы бромелина, связанной с различными лигандами

Таблица 1

Лиганды, связанные с молекулой папаина

Номер модели в базе PDB	Лиганды
6YCB	L-винная кислота, сульфат-ион, глицерол
6YCD	N-[(1S)-5-амино-1-(хлорацетил)пентил]-4-метилбензолсульфонамид (лизин-подобный ингибитор), сульфат-ион
6YCE	2-ацетидамо-2-дезоксид-бета-D-глюкопираноза
6YCF	2-ацетидамо-2-дезоксид-бета-D-глюкопираноза, N-[N-[1-гидроксикарбоксиэтилкарбонил] лейциламино-бутил] гуанидин, цитрат

вании с N-[N-[1-гидроксикарбоксиэтилкарбонил] лейциламино-бутил] гуанидином и цитратом (вместе или по отдельности) происходит частичная компактизация бромелина, поскольку данные лиганды присутствуют в модели 6YCF, но отсутствуют в структуре 6YCE. Последняя характеризуется максимальным суммарным объемом внутренних полостей, что может указывать на наибольшее декомпактизирующее действие 2-ацетида-2-деокси-бета-D-глюкопиранозы на молекулу бромелина. Минимальный суммарный объем данных структур имеет модель 6YCB, что, вероятно, может указывать на наименьшую степень декомпактизации энзима при связывании с L-винной кислотой, сульфат-ионом и глицеролом вместе или по отдельности, либо на компенсацию декомпактизации одним из лигандов. В составе молекулы бромелина, не связанной ни с одним лигандом, внутренние полости отсутствуют. Аминокислотный состав и объем внутренних полостей в составе молекул бромелина, связанных с различными лигандами, представлен в табл. 2.

Нами обнаружено по 1 туннелю в составе моделей 6YCB, 6YCD и 6YCE. Структура и локализация данных туннелей отличается во всех перечисленных формах бромелина (рис. 2). Это может указывать на различия в характере конформационных перестроек молекулы бромелина при связывании с представленными в работе лигандами. Аминокислотный состав туннелей в составе молекул бромелина, связанных с различными лигандами, представлен в табл. 3. В составе модели 6YCF и фермента, не связанного ни с одним лигандом, туннели не обнаружены. Также нами не было выявлено наличие пор ни в одной из исследуемых форм бромелина.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цистеиновые протеазы играют важную роль в физиологии и защите растений. При этом их функционирование определяется пространственной структурой. Изучение процессов изменения конформации фермента при его связывании с различными лигандами позволяет глубже понять пути его функционирования в составе тако-

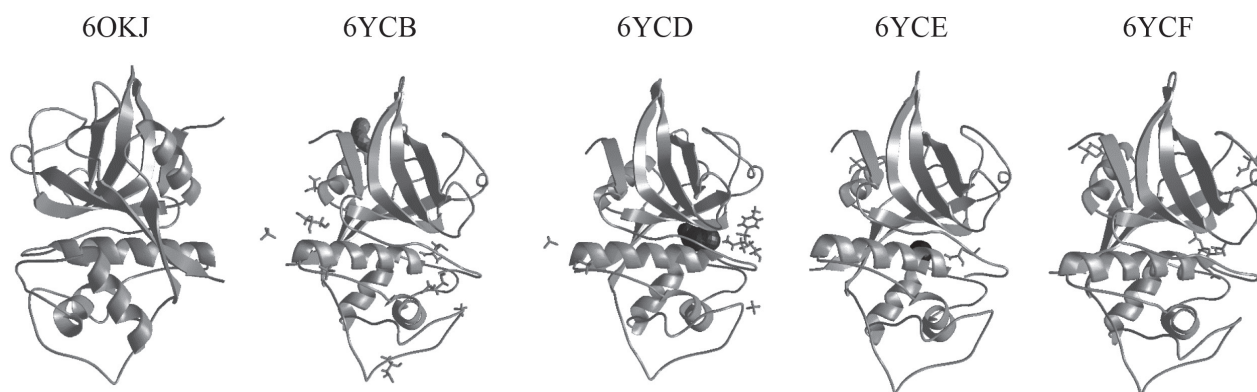


Рис. 2. Туннели в составе молекулы бромелина, связанной с различными лигандами

Таблица 2

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

Модель	Аминокислотный состав	Число аминокислот	Объем, Å <sup>3</sup>
6YCB	1. Val13, Thr14, Ala32, Thr33, Glu35, Ser36, Leu45, Pro128, Val160, Ile162, Arg177	11	142.2
	2. Trp26, Ala57, Val58, Ser59, Gly65, Trp66, Lys69, Ala70	8	44.6
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	19	186.8
6YCD	1. Val16, Lys17, Cys25, Phe28, Ala29, Ile31, Ala32, Glu35, Glu50, His157, Ala158, Ile159, Val160, Arg177, Asn178, Ser179	16	288.5
	2. Val13, Thr14, Ala32, Thr33, Glu35, Ser36, Leu45, Pro128, Val160, Ile162, Arg177	11	136
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	27	424.5
6YCE	1. Ala13, Val14, Thr15, Val17, Lys18, Sch26, Phe29, Ala30, Ile32, Ala33, Glu36, Ser37, Leu46, Glu51, Pro129, Ala159, Val160, Thr161, Ile163, Lys178, Asn179, Ser180	22	447.3
	2. Val132, Val134, Phe140, Val160, Val177, Asn179, Trp185, Gly189, Ile191, Met193, Ile206	11	144.3
	Суммарные значения количества аминокислот и объема полостей	33	591.6
6YCF	Ala13, Val14, Thr15, Val17, Lys18, Cys26, Phe29, Ala30, Ala33, Glu36, Ser37, Leu46, Glu51, Pro129, Ala159, Val160, Thr161, Ile163, Lys178, Asn179, Ser180	21	446.4

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

Модель	Аминокислотный состав	Число аминокислот
6YCB	Glu117, Glu117, Arg118, Met121, Arg194, Asp195	6
6YCD	Gly65, Trp66, Ile67, Ile67, Ala132, Leu155, Leu155, Asp208	8
6YCE	Glu68, Glu68, Phe69, Phe69, Arg112, Asp209, Leu211	7

го комплекса. Представленные в работе данные о составе, структуре и локализации внутренних полостей в молекуле бромелина важны для понимания механизма действия различных лигандов на пространственную структуру энзима. Кроме того, они могут быть использованы для исследования каталитических свойств фермента, таких как термостабильность, при его взаимодействии с соединениями различной природы как в составе организма растения, 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

1. Grudkowska M., Zagdańska B. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, Vol. 51(3), pp. 609-624.
2. Grudkowska M., Zagdanska B. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2004, Vol. 26 (3 suppl.).
3. Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. *The Plant Cell*, 1999, Vol. 11(3), 431-443.
4. McLellan H., Gilroy E.M., Yun B.W., Birch P.R., Loake G.J., *New Phytologist*, 2009, Vol. 183(2), pp. 408-418.
5. Seenivasan R., Roopa L., Geetha S., *Journal of Pharmacy Research*, 2010, Vol. 3(5), pp. 1092-1095.
6. Maurer H.R., *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2001, Vol. 58(9), pp. 1234-1245.
7. Baez R., Lopes M.T., Salas C.E., Hernandez M., *Ananas comosus Planta medica*, 2007, Vol. 73(13), pp. 1377-1383.
8. Benucci I., Liburdi K., Garzillo A.M., Esti M., *Food Chemistry*, 2011, Vol. 124(4), pp. 1349-1353.
9. Jung Y.J., Choi C.S., Park J.H., Kang H.W., Choi J.E., Nou I.S., Kang K.K., *BAA Brassica rapa Electronic Journal of Biotechnology*, 2008, Vol. 11(1), pp. 71-79.
10. Mestre M., Grolleau S., Montastruc J.L., *Fundamental*, 2013, Vol. 2002, pp. 223-230.
11. María, C., Yáñez-Vico, R. M., Batista-Cruzado, A., Heurtebise-Saavedra, J. M., Castillo-de Oyagüe, R., Torres-Lagares, D., *Medicina oral*, 2014, Vol. 19(2), pp. e157
12. Ho D., Jagdeo J., Waldorf H.A., *A systematic review of the literature*, 2016, Vol. 42(4), pp. 445-463.
13. Sahbaz A., Aynioglu O., Isik H., Ozmen U., Cengil O., Gun B.D., Gungorduk K., *International journal of surgery*, 2015, Vol. 14, pp. 7-11.
14. Shetty V., Mohan A., *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2013, Vol. 71(7), pp. 1261-1267.
15. Klein G., Kullich W., *Clinical Drug Investigation*, 2000, Vol. 19(1), pp. 15-23.
16. Kellis J. T., Nyberg K., Fersht A. R., *Nature*, 1988, Vol. 333(6175), pp. 784-786.
17. Eriksson A. E., Baase W. A., Matthews B. W., *Journal of molecular biology*, 1993, Vol. 229(3), pp. 747-769.
18. Karpusas M., Baase W. A., Matsumura M., Matthews B. W., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, Vol. 86(21), pp. 8237-8241.
19. Kellis Jr J. T., Nyberg K., Fersht A. R., *Biochemistry*, 1989, Vol. 28(11), pp. 4914-4922.
20. Yongqing T., Wilmann P.G., Pan J., West M.L., Brown T.J., Mynott T., Wijeyewickrema L.C., *Biochimie*, 2019, Vol. 166, pp. 194-202.
21. Azarkan M., Maquoi E., Delbrassine F., Herman R., Rabet N., Esposito R.C., Kerff F., *Scientific reports*, 2020, Vol. 10(1), pp. 1-18.

*Воронежский государственный университет  
Сакибаев Ф. А., аспирант кафедры биофизики  
и биотехнологии*

*Voronezh State University  
Sakibaev F. A., post-graduate student, Biophysics  
and Biotechnology Department*

*Холявка М. Г., д.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Фи-*

*Holyavka M. G., PhD., DSci. Associate Professor  
Biophysics and Biotechnology Department, Full*

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

зика», Севастопольский государственный университет

E-mail: holyavka@rambler.ru

Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V.G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

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

**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 are involved in many aspects of plant physiology, including aging, flower development, response to various types of environmental stress, and control of programmed cell death. On the other hand, the pharmacological action of plant cysteine proteases has long been recognized.

Bromelain is the collective name for related proteolytic enzymes found in the tissues of species belonging to the *Bromeliaceae* family, of which the pineapple (*Ananas comosus*) is best known. There are two different types of pineapple bromelain: stem bromelain (EC 3.4.22.32) and fruit bromelain (EC 3.4.22.33). Like papain, bromelain is the widely used protease in therapy.

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

The work investigated the composition, localization and structure of internal cavities, tunnels, pores in the bromelain molecule when it binds to various ligands: L-tartaric acid, sulfate ion, glycerol, N-[(1S)-5-amino-1-(chloroacetyl)pentyl]-4-methylbenzenesulfonamide (lysine-like inhibitor), 2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranose, N-[N-[1-hydroxycarboxyethylcarbonyl]leucylamino-butyl] guanidine, citrate.

We found 2 internal cavities in models 6YCB, 6YCD and 6YCE and one internal cavity in 6YCF structure. The largest total volume of internal cavities was found for 6YCE, and the smallest for 6YCB. In the composition of the bromelain molecule not bound to ligands, no internal cavities were found.

The presence of 1 tunnel was revealed in the models 6YCB, 6YCD and 6YCE. The structure and localization of these tunnels differs in all of the listed forms of bromelain. No tunnels were found in the 6YCF model and the enzyme not bound to any ligand. Also, we did not reveal the presence of pores in any of the studied forms of bromelain.

**Keywords:** bromelain, internal cavities, tunnels, pores, *in silico* analysis.