

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОЛЛАГЕНАЗ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *CLOSTRIDIUM*

А. Н. Дубовицкая<sup>1</sup>, Д. Ю. Богомолов<sup>1</sup>, М. Г. Холявка<sup>1,2</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 09.09.2022 г.

**Аннотация.** Коллагеназа (КФ 3.4.24.7) – протеолитический фермент семейства металлопротеаз, способный гидролизовать тройную спираль молекулы коллагена. Данная эндопептидаза может найти применение в современной фармацевтике за счет высокой специфичности к субстрату. Коллаген является неотъемлемым элементом соединительной ткани и принимает непосредственное участие в формировании фиброматозов при таких заболеваниях, как контрактура Дюпюитрена, болезнях Пейрони и Леддерхозе. Благодаря своей способности гидролизовать коллаген, фермент имеет высокий потенциал использования при лечении вышеупомянутых патологических состояний. Исследованы состав и структура внутренних полостей и туннелей в каталитических доменах коллагеназы, выделенной из бактерий рода *Clostridium*. Ни в одной из изученных моделей поры не были обнаружены. В результате выравнивания пространственных структур каталитических доменов различных коллагеназ бактерий рода *Clostridium* выявлено, что с высокой вероятностью они имеют схожую трехмерную укладку (параметр TMScore равен 0.941). Был изучен состав аминокислот, принимающих участие в формировании внутренних полостей и туннелей молекул клостридиальных коллагеназ. Также были проанализированы данные о молекулярных массах коллагеназы, выделенной из *Clostridium histolyticum*, полученные различными методами. Значения молекулярных масс коллагеназы, определенные методом гель-электрофореза, составили от 70000 до 147200 Да. Значения молекулярных масс коллагеназы, полученные с помощью SDS-электрофореза, составили 68000-125000 Да. Молекулярные массы коллагеназ, измеренные с помощью масс-спектрометрии, имеют диапазон значений от 113000 до 114210 Да. Среднее значение масс энзимов, полученное путем использования ультрацентрифугирования, составило 112000 Да. Знание структурных особенностей молекулы позволит не только сделать вклад в фундаментальную науку, но и научиться модулировать активность фермента, что особенно важно при использовании энзимов в промышленности и фармацевтике. Понимание того, какие аминокислотные остатки принимают участие в образовании элементов нативной конформации белка, позволит целенаправленно подбирать лиганды, способные связываться с группами, расположенными в пределах внутренних полостей и туннелей коллагеназы.

**Ключевые слова:** коллагеназа, полости, туннели, молекулярная масса

Среди протеолитических ферментов особое внимание ученых привлекает коллагеназа – эндопептидаза, расщепляющая тройную спираль молекулы нерастворимого природного белка коллагена. Коллагеназа может найти широкое применение в офтальмологии, косметологии, хирургии для профилактики и лечения рубцовых образований, адгезивного капсулита, келоидных рубцов, гипертрофированных рубцов, послеоперационных спаек, морщин, целлюлита и т.д [1].

Среди микроорганизмов наиболее изученными продуцентами коллагеназы являются анаэроб-

ные бактерии рода *Clostridium*. Бактериальные коллагеназы имеют такие преимущества перед эукариотическими ферментами, как более широкая субстратная специфичность, способность расщеплять нативный и денатурированный коллаген, высокая коллагенолитическая активность, оптимальное значение pH (7-8) для использования в медицинских целях [2-4].

В данный момент все больше разработок направлено на лечение болезней Пейрони и Леддерхозе, а также контрактуры Дюпюитрена, которые связаны с видоизменением соединительной ткани. Коллагеназа, способная расщеплять коллаген, является одним из решений в отношении данных патологических состояний. В клинических иссле-

дованиях используются инъекции препарата коллагеназы [5-7].

Пространственная структура фермента во многом определяет механизм каталитического процесса. Так, туннели, полости и поры в составе молекулы могут влиять на термостабильность энзима и способность связывать определенные лиганды. Изучение данных параметров белковой глобулы может дать представление об особенностях функционирования фермента [8].

Таким образом, высокую актуальность имеет изучение параметров туннелей, полостей и пор в молекуле коллагеназы, учитывая развивающиеся методы компьютерного моделирования [9-12] и из года в год увеличивающееся количество трехмерных моделей пространственной структуры ферментов, для выявления механизмов регулирования структурно-функциональных свойств биокатализаторов.

Целью данной работы является *in silico* анализ особенностей пространственной организации каталитических доменов различных коллагеназ, источником которых являются бактерии рода *Clostridium*, а также анализ молекулярных масс бактериальных коллагеназ.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования были выбраны пространственные структуры каталитических доменов коллагеназы из *Clostridium histolyticum* (ColH) и коллагеназы из *Clostridium tetani* (ColT) [13-14]. Выравнивание пространственных структур производилось при помощи программного обеспечения RaptorX DeepAlign [15].

Вычисление параметров туннелей, пор и внутренних полостей осуществлялось при помощи программы MOLE [11].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4AR1 – модель пространственной структуры пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. Содержит 4 туннеля, их профили не перекрываются. Самый крупный из них имеет длину 15.26 Å. Длина наименьшего туннеля – 7.25 Å. Кроме того, в данном домене присутствуют три полости, имеющие объемы 0.29019 нм<sup>3</sup>, 0.22788 нм<sup>3</sup> и 0.11563 нм<sup>3</sup>. Такие элементы конформации, как поры, отсутствуют в пространственной структуре пептидазного домена (рис. 1).

4AR9 – модель пространственной структуры пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium tetani*. В состав домена входят 6 туннелей. Тунне-

ли 5 и 6 выходят из одной точки, при этом они совпадают в начальных фрагментах своих профилей. Остальные туннели в составе домена не перекрываются. Самый крупный из них имеет длину 12.56 Å, а наименьший – 6.04 Å. В данном домене присутствуют две полости, имеющие объем 0.19128 нм<sup>3</sup> и 0.12985 нм<sup>3</sup>. Поры не входят в состав вышеописанного элемента третичной структуры (рис. 2).

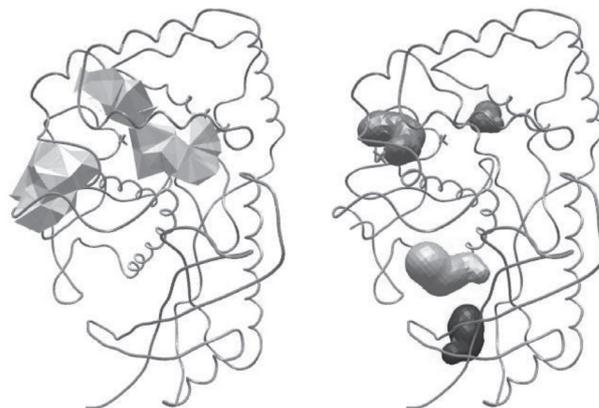


Рис. 1. Расположение внутренних полостей (слева) и туннелей (справа) пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium histolyticum*

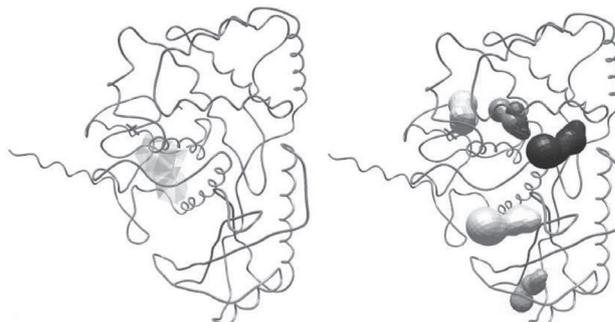


Рис. 2. Расположение внутренних полостей (слева) и туннелей (справа) пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium tetani*

Пространственная структура пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium tetani* содержит 6 туннелей. Туннели 5 и 6 выходят из одной точки, при этом они совпадают в начальных фрагментах своих профилей (рис. 3). Остальные туннели в составе домена не перекрываются. Также показано, что туннели, имеющие сходное расположение в данных пространственных структурах, имеют различающиеся между собой профили.

Установлено наличие 3 внутренних полостей для пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. В составе пептидазного домена коллагеназы из *Clostridium tetani* обнаружено 2 внутренних полости. При этом данные структуры не имеют сходного расположения в составе макромолекул.

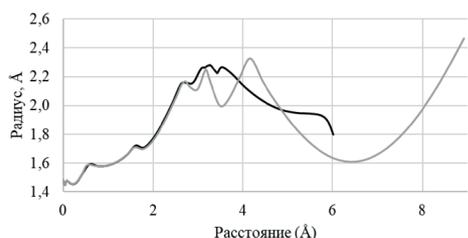


Рис. 3. Профили частично перекрывающихся туннелей в составе каталитического домена коллагеназы из *Clostridium tetani*

Обнаружено, что пептидазный домен коллагеназы из *Clostridium histolyticum* имеет в своем составе 4 туннеля. Профили этих туннелей не перекрываются.

Было проведено сравнение профилей туннелей со сходным расположением в составе пептидазных доменов коллагеназ бактерий рода *Clostridium* (рис. 4).

В результате выравнивания пространственных структур пептидазных доменов различных коллагеназ бактерий рода *Clostridium* (рис. 5) обнаружено, что с высокой вероятностью они имеют схожую трехмерную укладку (параметр TMScore

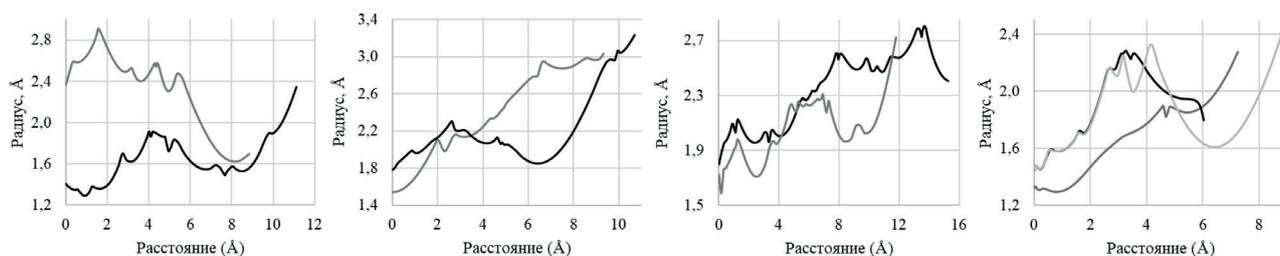


Рис. 4. Профили 4-х туннелей со сходным расположением в составе пептидазных доменов коллагеназ бактерий рода *Clostridium*

равен 0.941). Тем не менее, профили туннелей данных доменов, которые имеют схожее расположение, не перекрываются. Длины этих туннелей также не соотносятся между собой. Кроме того, полости в составе трехмерных структур данных доменов не совпадают по своему расположению.

Аминокислотный состав туннелей и полостей каталитических доменов кластридиальных коллагеназ представлен в табл. 1.



Рис. 5. Результат выравнивания двух пептидазных доменов коллагеназ бактерий рода *Clostridium*

Таблица 1

Аминокислотный состав туннелей и полостей молекул кластридиальных коллагеназ

Продуцент	№ туннеля/ полости	Аминокислотные остатки
Туннели		
<i>Clostridium histolyticum</i>	1	Tyr418, Gly419, Tyr420, Asp421, Tyr428, Ile429, Glu430, His459, Gly463, Trp471, Tyr477, Glu486
	2	Lys375, Asn378, Phe382, Tyr465, Lys641, Thr650, Arg652, Thr693, Tyr695, His714
	3	Lys368, Tyr611, Leu612, Val613, Arg614, Tyr645, Phe646, Tyr716
	4	Asn424, Tyr447, Glu491, Ile508, Asn511, Phe535, Tyr538, Asn539
<i>Clostridium tetani</i>	1	Ile394, Ile395, Gly396, Tyr559, Lys563, Phe566, Ser567, Lys574, Glu673, Trp677
	2	Ile437, Tyr438, Glu440, His469, Gly473, Ile477, Phe481, Tyr487, Glu498
	3	Lys388, Ser389, Asn660, Lys662, Thr703, Ala704, Tyr705, Val722, His724
	4	Gln624, Tyr625, Asn627, Trp696, Gly698, Leu726, Leu727, Ser728, His729
	5	Tyr457, Glu461, Leu462, His465, Glu503, Arg516
	6	Gly435, Tyr457, Glu461, Leu462, His465, Glu503, Arg516
Полости		
<i>Clostridium histolyticum</i>	1	Pro390, Leu391, Glu392, Gly394, Asn395, Pro396, Asp397, Asp398, Glu430, Gly463, Arg464, Ala466, Val467, Pro468, Gly469, Gln470
	2	Phe381, Val384, Tyr385, Gln462, Tyr485, Gly489, Leu492, Phe493, Ile502, Met545, Met548, Tyr549, Leu556, Asn560
	3	Leu476, Leu482, Tyr485, Leu559, Leu562, Ala563, Asn566, Asp567, Val568, Tyr571
<i>Clostridium tetani</i>	1	Ile366, Val372, Lys376, Ile377, Leu380, Ile412, Ile414, Phe445, Thr447, Glu449, Leu459, Leu462, Phe463
	2	Leu410, Ile412, Tyr438, Phe445, Phe463, Glu466, Phe467, Tyr470

Одним из важнейших параметров структурных характеристик молекулы считается молекулярная масса. Основными, наиболее широко распространенными способами ее определения являются гель-хроматография, SDS-PAGE-электрофорез и масс-спектрометрия. Результат анализа молекулярных масс коллагеназ, выделенных из *Clostridium histolyticum*, представлен в табл. 2.

Значения молекулярных масс коллагеназы, определенных методом гель-электрофореза, составили от 70000 до 147200 Да.

Согласно одним авторам, кажущаяся молекулярная масса коллагеназы, выделенной из *Clostridium histolyticum*, составляет 68000-70000 Да [16]. Осно-

вываясь же на объемах элюирования из длинных колонок (0.9 x 150 см) с сефадексом G-100 и G-200, было установлено, что коллагеназа имеет молекулярную массу порядка 100000 Да [17].

В работе, посвященной изучению влияния  $Ca^{2+}$  на полноразмерную коллагеназу, выделенную из *Clostridium histolyticum*, кажущуюся молекулярную массу белка определяли с помощью эксклюзионной хроматографии в присутствии различных концентраций ЭГТА. Результаты эксклюзионной хроматографии полноразмерной молекулы показали, что кажущаяся молекулярная масса коллагеназы (82000 Да) была на 30% меньше расчетного значения (114000 Да). В при-

Таблица 2

Молекулярные массы коллагеназ, выделенных из *Clostridium histolyticum*

Молекулярная масса, Да	Особенности фермента	Источник литературы
<b>Определена методом гель-хроматографии</b>		
11920	CBD; дикий тип в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	[19]
11470	CBD; мутантный фермент S906Fв присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
11750	CBD; мутантный фермент S906A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
11810	CBD; мутантный фермент Q972A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
11910	CBD; мутантный фермент V973A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
13720	CBD; мутантный фермент E901A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
13750	CBD; мутантный фермент D904A В присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
14390	CBD; мутантный фермент E899A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
15370	CBD; мутантный фермент D930A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
15790	CBD; мутантный фермент D927A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
15730	CBD; мутантный фермент N903A в присутствии 1 мМ $Ca^{2+}$	
16430	CBD; дикий тип в присутствии 1 мМ ЭГТА	
15420	CBD; мутантный фермент D930A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
15890	CBD; мутантный фермент E899A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16160	CBD; мутантный фермент D904A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16190	CBD; мутантный фермент D927A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16410	CBD; мутантный фермент S906A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16470	CBD; мутантный фермент Q972A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16510	CBD; мутантный фермент V973A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16530	CBD; мутантный фермент N903A в присутствии 1 мМ ЭГТА	
16650	CBD; мутантный фермент S906F в присутствии 1 мМ ЭГТА	
70000		[16]
82000		[18]
119000	в присутствии ЭГТА	[18]
100000		[17]
<b>Определена методом SDS-PAGE-электрофореза</b>		
72000	ШЬ	[20]
81000	I, II, IIIa	
76000	C3	
92000	C2	[21]
96000	C1	
<b>Определена методом масс-спектрометрии</b>		
113000		[22]
113866		[23]
114180	Мутантный фермент E414Q, метод MALDI-TOF MC	[24]
114210	Дикий тип, метод MALDI-TOF MC	
<b>Определена другим методом</b>		
112000	ультрацентрифугирование	[25]
114000	теоретический расчет	[18]

сутствии ЭГТА (>1 мМ) кажущаяся молекулярная масса составила 119000 Да, что сопоставимо с расчетным значением. В этом исследовании изучалось влияние междоменной гибкости на расположение отдельных доменов полноразмерной молекулы коллагеназы как многодоменной структуры. Было показано, что междоменная гибкость преимущественно и обратимо поддерживается ионами  $Ca^{2+}$  [18].

В отдельном исследовании, посвященном изучению влияния кальция на структуру дикого типа и мутантных форм коллаген-связывающего домена (CBD), молекулярные массы, полученные с помощью метода эксклюзионной хроматографии, составляют 11470-16650 Да. Определялись кажущиеся молекулярные массы дикого типа и мутантных форм фермента в присутствии ЭГТА и ионов кальция. После диализа в физиологическом растворе с буфером HEPES (HBS), содержащем 1 мМ ЭГТА, кажущаяся молекулярная масса CBD дикого типа увеличилась на ~38%. Когда этот обедненный кальцием CBD подвергался обратному диализу против HBS, содержащего 1 мМ  $Ca^{2+}$ , кажущаяся масса снижалась до того же значения, что и без обработки ЭГТА ( $11950 \pm 10$  Да) [19].

Значения молекулярных масс коллагеназы, полученные с помощью SDS-электрофореза, составляют 68000-125000 Да.

Исследование, включающее изучение коллагеназ, выделенных из *Clostridium histolyticum*, показало, что для трех типов коллагеназ молекулярная масса в 10% акриламиде составляет 81000 Да, тогда как молекулярная масса для четвертой формы коллагеназы несколько ниже – 72000 Да. Это указывает на то, что отдельные коллагеназы фактически представляют собой одиночные полипептидные цепи и не состоят из отдельных субъединиц. Для выявления структурных соотношений между отдельными коллагеназами необходим подробный анализ их состава, молекулярных масс, каталитической активности и иммунологических характеристик. Выдвинуто предположение, что коллагеназы могут быть представлены в виде изоферментов. Существует возможность того, что одна из форм коллагеназ является родительской молекулой, а остальные ферменты формируются из нее в результате удаления олигосахаридных остатков и/или небольших пептидных сегментов [20].

В исследовании, где фракции образцов из аффинной колонки подвергали электрофорезу на SDS-полиакриламидном пластинчатом геле, молекулярные массы трех фракций коллагеназы составили 96000, 92000 и 76000 Да. Было установлено, что коллагеназа с массой 96000 Да является родительским белком, протеолиз которого мог происходить *in vivo* с образованием двух других ферментов с более низкой молекулярной массой [21].

Молекулярные массы коллагеназ, измеренные с помощью масс-спектрометрии, имеют диапазон значений от 113000 до 114210 Да.

В работе, посвященной изучению рекомбинантного белка – продукта гена кластридиальной коллагеназы, встроенного в *B. subtilis*, – молекулярную массу коллагеназы определяли с помощью квадрупольного масс-спектрометра с ионным распылением. Молекулярная масса рекомбинантного фермента составила 112999 Да [22].

Имеются также данные о том, что *Clostridium histolyticum* экспрессирует два класса коллагеназ. Однако расщепление этих ферментов протеазами во время процесса ферментации или очистки может привести к многочисленным молекулярным формам. По мнению исследователей, существует три формы коллагеназы, активные по отношению к коллагену: интактная с одним коллаген-связывающим доменом (CBD), 113866 Да; интактная с двумя CBD, 101033 Да; усеченная с одним CBD, 111933 Да [23].

Молекулярные массы коллагеназы, измеренные с помощью MALDI-TOF MS, составляли 114208 и 114181 Да для дикого типа и мутантного фермента, соответственно. Наблюдаемые экспериментальные значения хорошо совпадали с расчетными данными – 114120.8 и 114119.8 Да [24].

Кроме того, проводилось исследование молекулярной массы коллагеназы с помощью ультрацентрифугирования. Авторы предположили наличие более чем одного коллагенолитического фермента в неочищенном препарате коллагеназы из *Cl. histolyticum*. Тем не менее, между полученными градиентным элюированием из колонки DEAE-Sephadex A50 фракцией I и фракцией II не было замечено значительной разницы в молекулярных массах, которые оценивались с помощью ультрацентрифугирования, и среднее значение составило 112000 Да. Авторы предположили, что различие коллагеназ заключается в заряде, влияющем на величины тестируемых характеристик [25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленные в данной работе особенности строения коллагеназ бактерий рода *Clostridium* могут играть важную роль в прогнозировании эффективности связывания фермента с носителем.

лем, что необходимо учитывать при разработке промышленных биокатализаторов и медицинских препаратов на их основе. Структурное состояние молекулы оказывает значительное влияние на ее функционирование. Знание того, какие полости, туннели и поры присутствуют в ферменте, а также какие аминокислотные остатки выстилают их, позволит управлять активностью фермента, подбирая лиганды, способные связаться с молекулой в пределах вышеупомянутых структур. Знание пространственной структуры белка позволит модулировать функционирование фермента, что особенно важно при использовании энзимов в промышленности и фармацевтике.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбурова М.Ю., Уварова А.В., Козлова Ю.О., Григорьева М.В., Москвичев Б.В. // Медицина экстремальных ситуаций. 2016. №2 (56). С. 45-57.
2. Майорова А.В., Сысуев Б.Б., Иванкова Ю.О., Ханалиева И.А. // Фармация и фармакология. 2019. Т. 7. №5. С. 260-270.
3. Руденская Г.Н., Можина Н.В. // Биомедицинская химия. 2004. №6. С. 539-553.
4. Sheldon R. A., van Pelt S. // Chemical Society Reviews. 2013. Vol. 42. No. 15, pp. 6223-6235.
5. Hoy S. M. // Clinical drug investigation. 2020. Vol. 40. No. 1, pp. 83-92.
6. Eckerdal D., Lauritzson A., Nordenskjöld J., Åkesson A., Atroshi I. // The Journal of Hand Surgery. 2022. Vol. 47. No. 9, pp. 834-842.
7. Lehrman J.D., Miceli A.L., Tabchi S.G., Kaplan M.A. // The Journal of Foot and Ankle Surgery. 2019. Vol. 58. No. 6, pp. 1281-1284.
8. Iyer P. V., Ananthanarayan L. // Process biochemistry. 2008. Vol. 43. No. 10, pp. 1019-1032.
9. Brezovsky J., Kozlikova B., Damborsky J. // Protein Engineering. 2018, pp. 25-42.
10. Dias S.E.D., Martins A.M., Nguyen Q.T., Gomes A.J. // BMC bioinformatics. 2017. Vol. 18. No. 1, pp. 1-10.
11. Petřek M., Košinová P., Koča J., Otyepka M. // Structure. 2007. Vol. 15. No. 11, pp. 1357-1363.
12. Stank A., Kokh D B., Horn M., Sizikova E., Neil R., Panecka J., Richter S., Wade R.C. // Nucleic acids research. 2017. Vol. 45. No. W1, pp. W325-W330.
13. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H. // Journal of Biological Chemistry. 2013. Vol. 288. No. 28, pp. 20184-20194. Режим доступа: <https://www.rcsb.org/structure/4AR1>
14. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H. // Journal of Biological Chemistry. 2013. Vol. 288. No. 28, pp. 20184-20194. Режим доступа: <https://www.rcsb.org/structure/4AR9>
15. Wang, S., Ma, J., Peng, J., Xu J. // Scientific reports. 2013. Vol. 3. No. 1, pp. 1-7.
16. Emöd I., Tong N. T., Keil B. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. 1981. Vol. 659. No. 2, pp. 283-291.
17. Kono T. // Biochemistry. 1968. Vol. 7. No. 3, pp. 1106-1114.
18. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. // Applied and environmental microbiology. 2012. Vol. 78. No. 16, pp. 5839-5844.
19. Wilson J.J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. // The EMBO Journal. 2003. Vol. 22. No. 8, pp. 1743-1752.
20. Lwebuga-Mukasa J. S., Harper E., Taylor P. // Biochemistry. 1976. Vol. 15. No. 21, pp. 4736-4741.
21. Sugawara R., Harper E. // Biochemistry. 1984. Vol. 23. No. 22, pp. 5175-5181.
22. Jung C.M., Matsushita O., Katayama S., Minami J., Ohhira L., Okabe A. // Microbiology and immunology. 1996. Vol. 40. No. 12, pp. 923-929.
23. Breite A. G., McCarthy R. C., Dwulet F. E. // Transplantation proceedings. Elsevier, 2011. Vol. 43. No. 9, pp. 3171-3175.
24. Matsushita O., Koide T., Kobayashi R., Nagata K., Okabe A. // Journal of Biological Chemistry. 2001. Vol. 276. No. 12, pp. 8761-8770.
25. Mandl I., Keller S., Manahan J. // Biochemistry. 1964. Vol. 3. No. 11, pp. 1737-1741.

*Воронежский государственный университет  
Дубовицкая А. Н., магистрант 2 года обучения  
кафедры биофизики и биотехнологии  
E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

*Voronezh State University  
Dubovitskaya A. N., student of the Department of  
Biophysics and Biotechnology  
E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru*

Богомолов Д. Ю., магистрант 2 года обучения  
кафедры биофизики и биотехнологии  
E-mail: danyabogomoloff@yandex.ru

Bogomolov D. Yu., student of the Department of  
Biophysics and Biotechnology  
E-mail: danyabogomoloff@yandex.ru

Холявка М. Г., д.б.н., профессор кафедры био-  
физики и биотехнологии; профессор кафедры  
«Физика», Севастопольский государственный  
университет  
E-mail: holyavka@rambler.ru

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

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафе-  
дрой 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

## STRUCTURAL FEATURES OF COLLAGENASES ISOLATED FROM BACTERIA OF THE GENUS *CLOSTRIDIUM*

A. N. Dubovitskaya<sup>1</sup>, D. Yu. Bogomolov<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.** Collagenase (EC 3.4.24.7) is a proteolytic enzyme belonging to the family of metalloproteases and capable to hydrolyze the triple helix of the collagen molecule. This endopeptidase can be used in modern pharmaceuticals due to its high substrate specificity. Collagen is an integral element of connective tissue and is directly involved in the formation of fibromatosis in such diseases as Dupuytren contracture, Peyronie and Ledderhose diseases. Due to its ability to hydrolyze collagen, the enzyme has a high potential for use in the treatment of the above-mentioned pathological conditions. The composition and structure of internal cavities and tunnels in the catalytic domains of collagenase isolated from bacteria of the genus *Clostridium* have been studied. No pores were found in any of the studied models. As a result of the alignment of the spatial structures of the catalytic domains of various clostridial collagenases, it was found that, with a high probability, they have a similar three-dimensional packing (the TMScore parameter is 0.941). The composition of amino acids involved in the formation of internal cavities and tunnels of clostridial collagenase molecules was also studied. Data on the molecular weight of collagenase isolated from *Clostridium histolyticum* obtained by various methods were also reviewed. The molecular weight of collagenase determined by gel electrophoresis ranged from 70000 to 147200 Da. The values of the molecular weights of collagenase, obtained by using SDS-electrophoresis method, are 68000-125000 Da. The molecular weight of collagenases measured by mass spectrometry had range from 113000 to 114210 Da. The molecular weight of the enzyme obtained by using ultracentrifugation was 112000 Da. Knowledge of the molecule structural features will allow not only to contribute to fundamental science, but also to learn how to modulate the activity of the enzyme, which is especially important for industrial and pharmaceutical application. Understanding which amino acid residues are involved in the formation of the protein native conformation elements will make it possible to selectively choose ligands that can be bonded to groups forming the internal cavities and tunnels of collagenase.

**Keywords:** collagenase, cavities, tunnels, molecular weight

### REFERENCES

1. Konon A.D., Petrovskii S.V., Shamburova M.Yu., Uvarova A.V., Kozlova Yu.O., Grigor'eva M.V., Moskvichev B.V., *Extreme medicine*, 2016, No. 2 (56), pp. 45-57.
2. Maiorova A.V., Sysuev B.B., Ivankova Yu.O., Khanaliev I.A., *Pharmacy & Pharmacology*, 2019, Vol. 7, No. 5, pp. 260-270.
3. Rudenskaya G.N., Mozhina N.V., *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B:*

- Biomedical Chemistry, 2004, No. 6, pp. 539-553.
4. Sheldon R. A., van Pelt S., Chemical Society Reviews, 2013, Vol. 42, No. 15, pp. 6223-6235.
  5. Hoy S. M., Clinical drug investigation, 2020, Vol. 40, No. 1, pp. 83-92.
  6. Eckerdal D., Lauritzson A., Nordenskjöld J., Åkesson A., Atroschi I., The Journal of Hand Surgery, 2022, Vol. 47, No. 9, pp. 834-842.
  7. Lehrman J.D., Miceli A.L., Tabchi S.G., Kaplan M.A., The Journal of Foot and Ankle Surgery, 2019, Vol. 58, No. 6, pp. 1281-1284.
  8. Iyer P. V., Ananthanarayan L., Process biochemistry, 2008, Vol. 43, No. 10, pp. 1019-1032.
  9. Brezovsky J., Kozlikova B., Damborsky J., Protein Engineering, 2018, pp. 25-42.
  10. Dias S.E.D., Martins A.M., Nguyen Q.T., Gomes A.J., BMC bioinformatics, 2017, Vol. 18, No. 1, pp. 1-10.
  11. Petřek M., Košinová P., Koča J., Otyepka M., Structure, 2007, Vol. 15, No. 11, pp. 1357-1363.
  12. Stank A., Kokh D B., Horn M., Sizikova E., Neil R., Panecka J., Richter S., Wade R.C., Nucleic acids research, 2017, Vol. 45, No. W1, pp. W325-W330.
  13. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H., Journal of Biological Chemistry, 2013, Vol. 288, No. 28, pp. 20184-20194. Available at: <https://www.rcsb.org/structure/4AR1>
  14. Eckhard U., Schönauer E., Brandstetter H., Journal of Biological Chemistry, 2013, Vol. 288, No. 28, pp. 20184-20194. Available at: <https://www.rcsb.org/structure/4AR9>
  15. Wang, S., Ma, J., Peng, J., Xu J., Scientific reports, 2013, Vol. 3, No. 1, pp. 1-7.
  16. Emöd I., Tong N. T., Keil B., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1981, Vol. 659, No. 2, pp. 283-291.
  17. Kono T., Biochemistry, 1968, Vol. 7, No. 3, pp. 1106-1114.
  18. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K., Applied and environmental microbiology, 2012, Vol. 78, No. 16, pp. 5839-5844.
  19. Wilson J.J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J., The EMBO Journal, 2003, Vol. 22, No. 8, pp. 1743-1752.
  20. Lwebuga-Mukasa J. S., Harper E., Taylor P., Biochemistry, 1976, Vol. 15, No. 21, pp. 4736-4741.
  21. Sugawara R., Harper E., Biochemistry, 1984, Vol. 23, No. 22, pp. 5175-5181.
  22. Jung C.M., Matsushita O., Katayama S., Minami J., Ohhira L., Okabe A., Microbiology and immunology, 1996, Vol. 40, No. 12, pp. 923-929.
  23. Breite A. G., McCarthy R. C., Dwulet F. E., Transplantation proceedings, Elsevier, 2011, Vol. 43, No. 9, pp. 3171-3175.
  24. Matsushita O., Koide T., Kobayashi R., Nagata K., Okabe A., Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, No. 12, pp. 8761-8770.
  25. Mandl I., Keller S., Manahan J., Biochemistry, 1964, Vol. 3, No. 11, pp. 1737-1741.