

ПОИСК *INSILICO* ВОЗМОЖНЫХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ С НОСИТЕЛЯМИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Панкова С.М.¹, Сакибаев Ф.А.¹, Королева В.А.^{1,2}, Ольшанникова С.С.¹, Холявка М.Г.^{1,3},
Артюхов В.Г.¹

¹ Воронежский государственный университет

пл. Университетская, 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: sazykina.93@mail.ru

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко
ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394036, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

³ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию: 11.07.20

Аннотация. Исследованы состав и расположение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков молекул трипсина из *Bos taurus* и коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. Определено процентное соотношение аминокислот разных типов на поверхности энзимов. Установлено, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности молекул неравномерно, образуя участки локального скопления. Выдвинуто предположение о том, что наиболее перспективными носителями для иммобилизации изученных нами протеаз являются гидрофобные полимерные материалы, которые, вероятно, будут взаимодействовать с одним из участков на поверхности молекул ферментов.

Ключевые слова: трипсин из *Bos taurus*, коллагеназа из *Clostridium histolyticum*, сайты связывания, заряженные аминокислотные остатки, гидрофобные аминокислотные остатки

Несмотря на значительное число работ, посвященных получению биопрепаратов с протеолитической активностью, в клиническую практику из них введены единицы, поэтому разработка новых методов иммобилизации протеаз остается актуальной проблемой биологии и медицины. Известно, что для иммобилизованных ферментов число возможных инактивирующих механизмов существенно меньше, чем в случае растворимых белков. Молекулы энзима могут связываться с носителями, на поверхности которых имеются заряженные, гидрофобные, полярные группы, за счет относительно слабых электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей [1].

Трипсин (КФЗ.4.21.4) – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин синтезируется в поджелудочной железе в виде неактивного предшественника (профермента) трипсиногена. Молекулярная масса трипсина составляет от 23,29 до 24 кДа. Молекула бычьего трипсина состоит из 223 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь, и содержит 6 дисульфидных связей [2-4]. Трипсин используют для изготовления лекарств. Препараты трипсина обладают противовоспалительным и противоотечным действием (при внутривенном и внутримышечном введении); способны избирательно расщеплять ткани, подвергшиеся некрозу. В медицине трипсин применяют для лечения ран, ожогов, тромбозов, часто в сочетании с другими ферментами и антибиотиками [5].

Коллагеназа (К.Ф. 3.4.4.19) – фермент, способный гидролизовать коллаген при физиологических значениях pH и температуры. Молекулярная масса фермента составляет от 50 до 120 кДа. Коллагеназу выделяют все штаммы *Clostridium histolyticum* [6]. Коллагеназа гидролизует нативный и денатурированный коллаген, но не действует на обычные глобулярные белки (казеин, гемоглобин, альбумины) и фибриллярные белки (фибрин, кератин, эластин). Таким образом, коллагеназа проявляет весьма узкую субстратную специфичность при действии на белки. На основании работ с синтетическими пептидами установлено, что коллагеназа гидролизует субстраты, имеющие следующее строение: X – P – R¹ – Гли – P – Y (стрелкой показана гидролизуемая связь), где P – остатки пролина или оксипролина, R, X, Y – остатки других аминокислот. Следовательно, основное требование, предъявляемое коллагеназой к строению субстрата – присутствие остатков пролина или оксипролина в определенном положении относительно чувствительной связи [7-9]. Бактериальная коллагеназа может быть использована в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз, операционных спаек, для профилактики морщин, ускорения рассасывания швов и рубцовых образований. Наиболее перспективным методом в лечении контрактуры Дюпюитрена – заболевания кисти, связанного с рубцовым перерождением и укорачиванием ладонных сухожилий, является использование коллагеназы. Инъекции коллагеназы в зарубцевавшуюся фасцию, покрывающую сухожилие, приводят к ее распаду и, как следствие, к исчезновению рубца [10,11].

Одна из наиболее перспективных задач современной медицинской биотехнологии – создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для использования в лечебных и фармацевтических целях. Использование метода адсорбционной иммобилизации в наибольшей степени способствует сохранению нативной структуры молекул и высокого уровня их каталитической активности за счет отсутствия химической модификации энзимов [12].

Целью нашей работы было выявление потенциальных сайтов связывания с заряженными и гидрофобными носителями на поверхности молекул трипсина из *Bos taurus* (PDB ID: 5T3H) и коллагеназы из *Clostridium histolyticum* (PDB ID: 4ARE).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение аминокислотных остатков на поверхности молекул трипсина и коллагеназы с доступностью для растворителя не менее 20 % проводили с использованием программы Swiss-PdbViewer 4.1.0. Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

Расстояние между ближайшими атомами аминокислотных остатков (r) вычисляли на основе их координат по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

Аналогичным способом были рассчитаны расстояния от активного центра трипсина и коллагеназы до заряженных и гидрофобных аминокислот на поверхности ее молекулы.

Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление служила степень их удаленности друг от друга. Остатки были отнесены нами к одному скоплению в случае, если среднее расстояние от каждого из них до трех ближайших аминокислот из определяемого скопления не превышало 10 Å. За начальное положение локального скопления принимали три аминокислотных остатка, среднее расстояние между которыми также не превышало 10 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекулы коллагеназы обнаруживается 254 аминокислотных остатка, трипсина – 85, доступных для растворителя не менее чем на 20 %. Среди них преобладают полярные незаряженные остатки. Количество гидрофобных аминокислот превышает число заряженных аминокислот, расположенных на поверхности энзима. Абсолютное и относительное количество остатков аминокислот представлено в таблицах 1 и 2.

Анализ модели пространственной структуры трипсина показал, что аминокислотные остатки на поверхности молекулы распределены неравномерно. На поверхности глобулы обнаружено двенадцать положительно заряженных аминокислот, при этом некоторые аминокислотные остатки образуют участки скопления положительного заряда. Первый участок образован –Lys87 и Lys109, второй – His57 и Lys60, третий – Lys222 и Lys224. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки располагаются относительно равномерно по поверхности молекулы (рис. 1).

Анализ модели пространственной структуры коллагеназы показал, что остатки заряженных аминокислот на поверхности молекулы распределены неравномерно, образуя девять областей скопления. Первое скопление образовано преимущественно аминокислотными остатками Lys, His, Asp, Glu; второе – Lys, His, Arg, Glu, Asp; третье – Lys, Arg, Asp; четвертое – Lys, Arg, Glu, Asp; пятое-девятое – Lys, Glu, Asp. (рис. 2).

На рисунке 3 представлено расположение гидрофобных аминокислот на поверхности трипсина, где первое скопление образовано Tyr59, Val90, Pro92; второе – Gly62, Gly38, Tyr39, Val75, Val76, Phe82, Gly148, Tyr151; третье – Gly19, Leu185, Gly187. Гидрофобные остатки коллагеназы распределены относительно неравномерно и образуют скопления, что, возможно, увеличит площадь связывания фермента с носителем (рис. 4).

Ширина молекулы трипсина составила 38.11 Å, длина – 50.46 Å, высота – 41.66 Å (рис. 5). Следовательно, минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации фермента в его порах соответствует 51 Å, а максимальный размер пор в матрице полимера для создания на его основе микрокапсул – 37 Å.

Таблица 1. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы

Тип остатков	Абсолютное количество	Относительное количество
Гидрофобные	64	25 %
Положительно заряженные	58	23 %
Отрицательно заряженные	53	21 %
Незаряженные	79	31 %

Таблица 2. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина

Тип остатков	Абсолютное количество	Относительное количество
Гидрофобные	26	30,5 %
Положительно заряженные	12	14,0 %
Отрицательно заряженные	4	5,0 %
Незаряженные	43	50,5 %

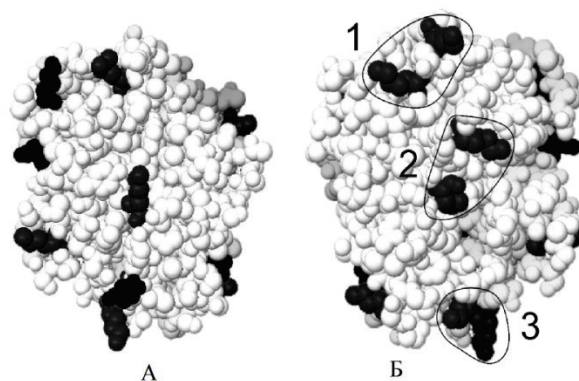


Рисунок 1. Локальные скопления (1-3) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно): Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

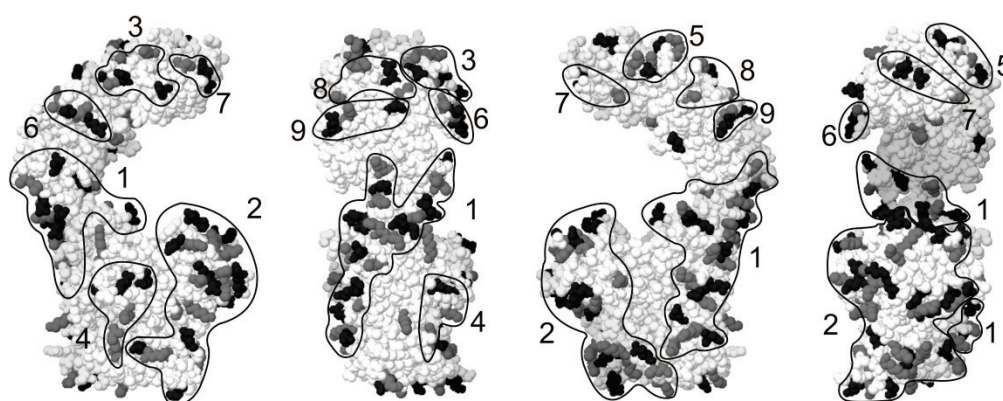


Рисунок 2. Локальные скопления (1-9) заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы (черным цветом выделены остатки, заряженные отрицательно, серым – заряженные положительно). Слева направо представлены развернутые на 90° градусов вокруг вертикальной оси изображения модели фермента

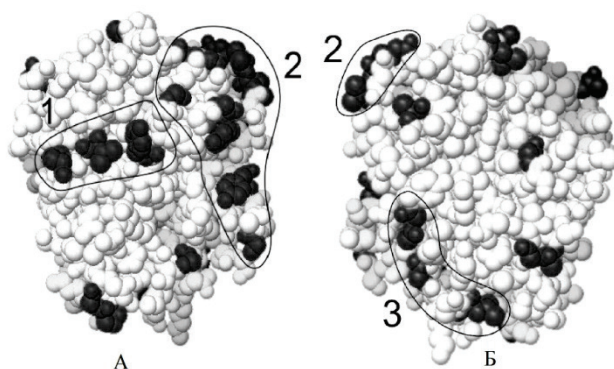


Рисунок 3. Локальные скопления (1-3) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы трипсина: Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

Для молекулы коллагеназы из *Clostridium histolyticum* максимальные значения ширины составили 54.97 \AA , длины – 71.68 \AA , высоты – 109.23 \AA (рис. 6). Из этих данных следует, что минимальный размер пор носителя для адсорбционной иммобилизации энзима в его порах соответствует $\sim 110 \text{ \AA}$, а максимальный размер пор в матрице полимера для создания на его основе микрокапсул $\sim 50 \text{ \AA}$.

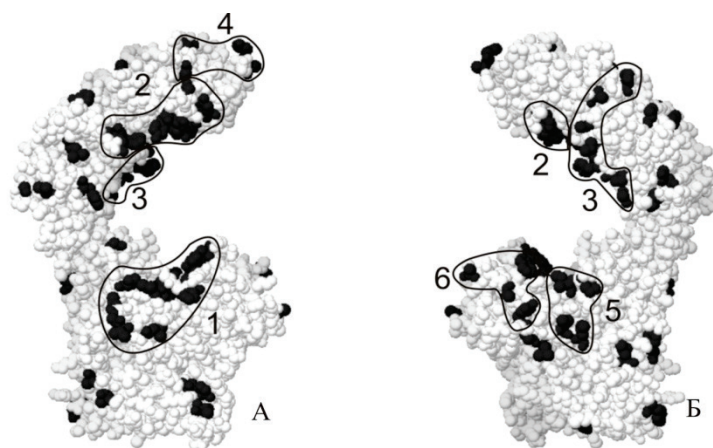


Рисунок 4. Локальные скопления (1-6) гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекулы коллагеназы: Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

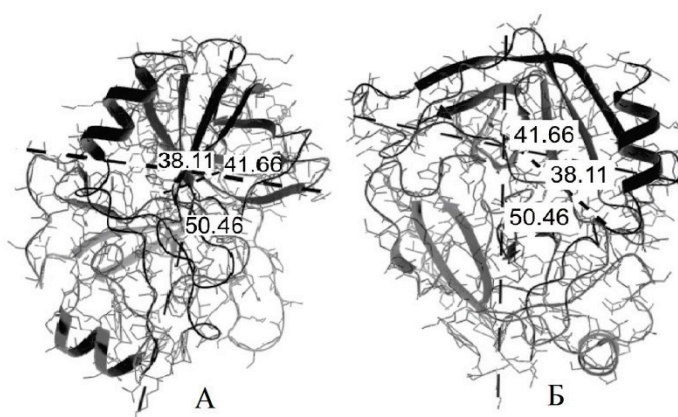


Рисунок 5. Размер молекулы трипсина, где Б – повернутая на 180° вокруг вертикальной оси форма А

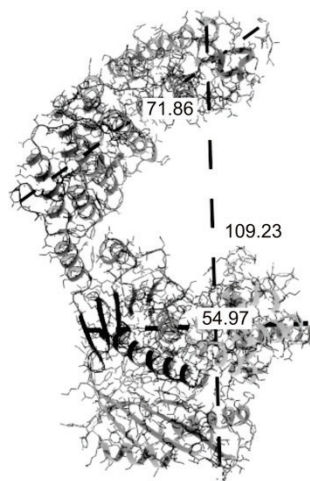


Рисунок 6. Размеры молекулы коллагеназы

На основании приведенных данных можно сделать вывод о том, что наиболее устойчивым будет связывание трипсина и коллагеназы с гидрофобными носителями, поскольку для таковых имеется наибольшее количество сайтов связывания в виде гидрофобных аминокислотных остатков. Среди заряженных носителей, вероятно, наиболее стабильный комплекс с трипсином будут образовывать агенты с отрицательно заряженными матрицами, поскольку в данных случаях среди заряженных остатков преобладают заряженные положительно. Однако при разработке гетерогенных катализаторов на основе представленных в работе ферментов необходимо, помимо стабильности комплекса, также учитывать локализацию аминокислот на поверхности молекул белков, в том числе их положение относительно активного центра фермента.

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. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение*. Издательский дом ВГУ: Воронеж, 2017, 261 с. [Kholyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilized biological systems: biophysical aspects and practical application*. Voronezh State University Publishing House: Voronezh, 2017, 261 p. (In Russ.)]
2. Мосолов В.В. *Протеолитические ферменты*. М.: Наука, 1971, 404 с. [Mosolov V.V. *Proteolytic enzymes*. М.: Nauka, 1971, 404 p. (In Russ.)]
3. Wu P., Weisell J., Pakkala M., Peräkylä M., Zhu L., Koistinen R., Koivunen E., Stenman U., Närvänen A., Koistinen H. Identification of Novel Peptide Inhibitors for Human Trypsins. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, vol. 391, no. 2-3. DOI: 10.1515/bc.2010.030.
4. Torbica A.M. Advantages of the Lab-on-a-Chip Method in the Determination of the Kunitz Trypsin Inhibitor in Soybean Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, no. 13. DOI: 10.1021/jf100830m.
5. Jesus-de la Cruz K., Alvarez-Gonzalez C.A., Pena E., Morales-Contreras J.A., Avila-Fernandez A. *Fish trypsins: potential applications in biomedicine and prospects for production*. *Journal of Biotech*, 2018, vol. 8. DOI: 10.1007/s13205-018-1208-0.
6. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Journal of Nature Structural and Molecular Biology*, 2011, vol. 18, no. 10. DOI: 10.1038/nsmb.2127.
7. Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбурова М.Ю., Уварова А.В., Козлова Ю.О., Григорьева М.В., Москвичев Б.В. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения. *Медицина экстремальных ситуаций*, 2016, № 2 (56). [Konon A.D., Petrovsky S.V., Shamburova M.Yu., Uvarova A.V., Kozlova Yu.O., Grigoryeva M.V., Moskvichev B.V. Features of biotechnology of clostridial collagenases – promising enzymes for medical purposes. *Emergency medicine*, 2016, no. 2 (56). (In Russ.)]
8. Hu Y., Webb E., Singh I., Morgan B.A., Gainor J.A., Gordon T.D., Siahaan T.J. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277. DOI: 10.1074/jbc.M111042200.
9. Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Структурно-функциональные особенности и свойства метцинкинов. *Биохимия*, 2012, т. 77, № 2. [Balaban N.P., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Structural and functional features and properties of metzinkins. *Biochemistry*, 2012, vol. 77, no. 2. (In Russ.)]
10. Eckhard U., Nu D., Ducka P., Scho E., Brandstetter H. Crystallization and preliminary X-ray characterization of the catalytic domain of collagenase G from *Clostridium histolyticum*. *Journal of Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2008, vol. 64, no. 5. DOI: 10.1107/S1744309108010476.
11. Bauer R., Jeffrey J., Philominathan S.T.L., Davis D., Matsushita O., Sakona J. Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from *Clostridium histolyticum*. *Journal of bacteriology*, 2013, vol. 195, no. 2. DOI: 10.1128/JB.00010-12.
12. Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Сазыкина С.М. Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина. *Радиационная биология. Радиоэкология*, 2017, т. 57, № 1. [Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M. Investigation of the processes of UV modification of free and immobilized trypsin. *Radiation biology. Radioecology*, 2017, vol. 57, no. 1. (In Russ.)]

SEARCH IN SILICO OF POSSIBLE LINK SITES WITH CARRIER AT IMMOBILIZATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES

Pankova S.M.¹, Sakibaev F.A.¹, Koroleva V.A.^{1,2}, Olshannikova S.S.¹, Holyavka M.G.^{1,3}, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: sazykina.93@mail.ru

² N.N. Burdenko Voronezh State Medical University

st. Student, 10, Voronezh, 394036, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

³ Sevastopol State University

st. Universitetskaya, 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

Abstract. The composition and location of charged and hydrophobic amino acid residues of trypsin from *Bos taurus* and collagenase from *Clostridium histolyticum* were studied. The percentage ratio of different types of amino acids on the surface of enzymes was determined. It was established that charged and hydrophobic amino acid residues are distributed unevenly on the surface of the molecules, forming sections of a local cluster. It has been suggested that the most promising carriers for the immobilization of the proteases we studied are hydrophobic polymeric materials, which are likely to interact with one of the sites on the surface of enzyme molecules.

Key words: trypsin from *Bostaurus*, collagenase from *Clostridium histolyticum*, binding sites, charged amino acid residues, hydrophobic amino acid residues.