

IN SILICO ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ ПАПАИНА С ИНГИБИТОРАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Сакибаев Ф.А.¹, Холявка М.Г.^{1,2}, Нехаев И.С.¹, Артюхов В.Г.¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

пл. Университетская, 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: farkhatlukum@gmail.com

² ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

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

Поступила в редакцию: 23.07.2021

Аннотация. Цистеиновые протеазы имеют широкое распространение в природе, являются значимым звеном в физиолого-биохимических процессах во всех живых организмах. Точный контроль их протеолитической активности необходим для правильного функционирования целых клеток и организмов. В работе исследуются взаимодействия папаина с ингибиторами различной природы. Аминокислотный состав участков связывания определяли с помощью программы LigPlot. Выявлены аминокислотные остатки, непосредственно контактирующие с анализируемыми соединениями. Показано наличие как гидрофобных взаимодействий, так и водородных связей. Последние формируются в количестве: 4 с метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина с участием 3 аминокислотных остатков; 3 с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом и локсистатиновой кислотой (E64-с) с участием 3 остатков; 2 с хлорметилкетонем с участием одного остатка. В реализации гидрофобных взаимодействий с локсистатиновой кислотой участвуют 10 аминокислотных остатков, по 13 с метиловым эфиром *N*-трет-бутилоксикарбонил-фенил-глицина, хлорметилкетонем и сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом. Установлено, что в случае связывания папаина с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом не происходит перекрытия аминокислот активного центра, что может указывать на ингибирование фермента данным соединением посредством изменения пространственной структуры биокатализатора. Представленные в работе данные могут быть использованы при изучении характера взаимодействия папаин-подобных цистеиновых протеаз с их ингибиторами.

Ключевые слова: папаин, ингибиторы, аминокислотный состав, *in silico* анализ.

Цистеиновые протеазы являются одними из наиболее широко распространенных и актуальных для изучения протеаз. Они присутствуют практически во всех живых организмах и участвуют во множестве биологических процессов [1]. Сообщалось, что дисбаланс активности эндогенных цистеиновых протеаз может приводить к многочисленным патологиям, таким как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, неврологические расстройства, опухоли и остеопороз [2]. Цистеиновые протеазы, продуцируемые бактериями, вирусами и паразитами, также считаются важными факторами в развитии многих заболеваний человека, таких как пародонтоз [3], малярия, болезнь Шагаса, шистосомоз [4, 5]. Особого упоминания заслуживает роль папаин-подобной цистеиновой протеазы из SARS-CoV-2, которая необходима для процессинга вирусных полипротеинов во время вирусного распространения и защиты от врожденного иммунитета хозяина [6]. С более общей точки зрения, ферменты данной группы играют важную роль в росте, дифференцировке клеток, передаче сигналов и инвазии патогенов и часто действуют как фактор вирулентности, нападая на иммунную систему хозяина [6-8]. Таким образом, точный контроль протеолитической активности необходим для правильного функционирования целых клеток и организмов. Фактически, это достигается на многих уровнях, от регуляции экспрессии, секреции и созревания белка (посредством специфического расщепления профермента) до блокирования его активности посредством ингибирования специфическими соединениями [9].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали модели пространственной структуры папаина, связанного с лигандами различной природы (табл. 1). Аминокислотный состав участков связывания определяли с помощью программы LigPlot.

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	локсистатиновая кислота (E64-с)
5PAD	хлорметилкетон

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены сведения о взаимодействиях между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами. Выявлено формирование следующего количества водородных связей: 4-х с метиловым эфиром *N-трет*-бутилоксикарбонил-фенил-глицина с участием 3 аминокислотных остатков; 3-х с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом и локсистатиновой кислотой (E64-с) с участием 3 остатков; 2-х с хлорметилкетонем с участием одного остатка. Расстояния и аминокислоты, участвующие при этом, приведены в таблице 2. В моделях 1KHQ и 1PPP в формировании водородных связей участвует остаток Cys25, входящий в состав активного центра папаина.

В формировании гидрофобных взаимодействий с локсистатиновой кислотой участвуют 10 аминокислотных остатков, по 13 с метиловым эфиром *N-трет*-бутилоксикарбонил-фенил-глицина, хлорметилкетонем и сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом. Остатки Cys25 и His159, входящие в состав активного центра, принимают участие в данном типе взаимодействий в моделях 1KHQ, 1PPP и 5PAD (табл. 3).

Анализ комплекса молекулы папаина с сукцинил-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-нитроанилидом как в случае водородных связей, так и при гидрофобных взаимодействиях не показал вовлеченность в них аминокислот активного центра. Это может указывать на тот факт, что в данном случае ингибирование осуществляется за счет изменения конформации фермента таким образом, что его связывание с субстратом либо реализация акта катализа становятся невозможными.

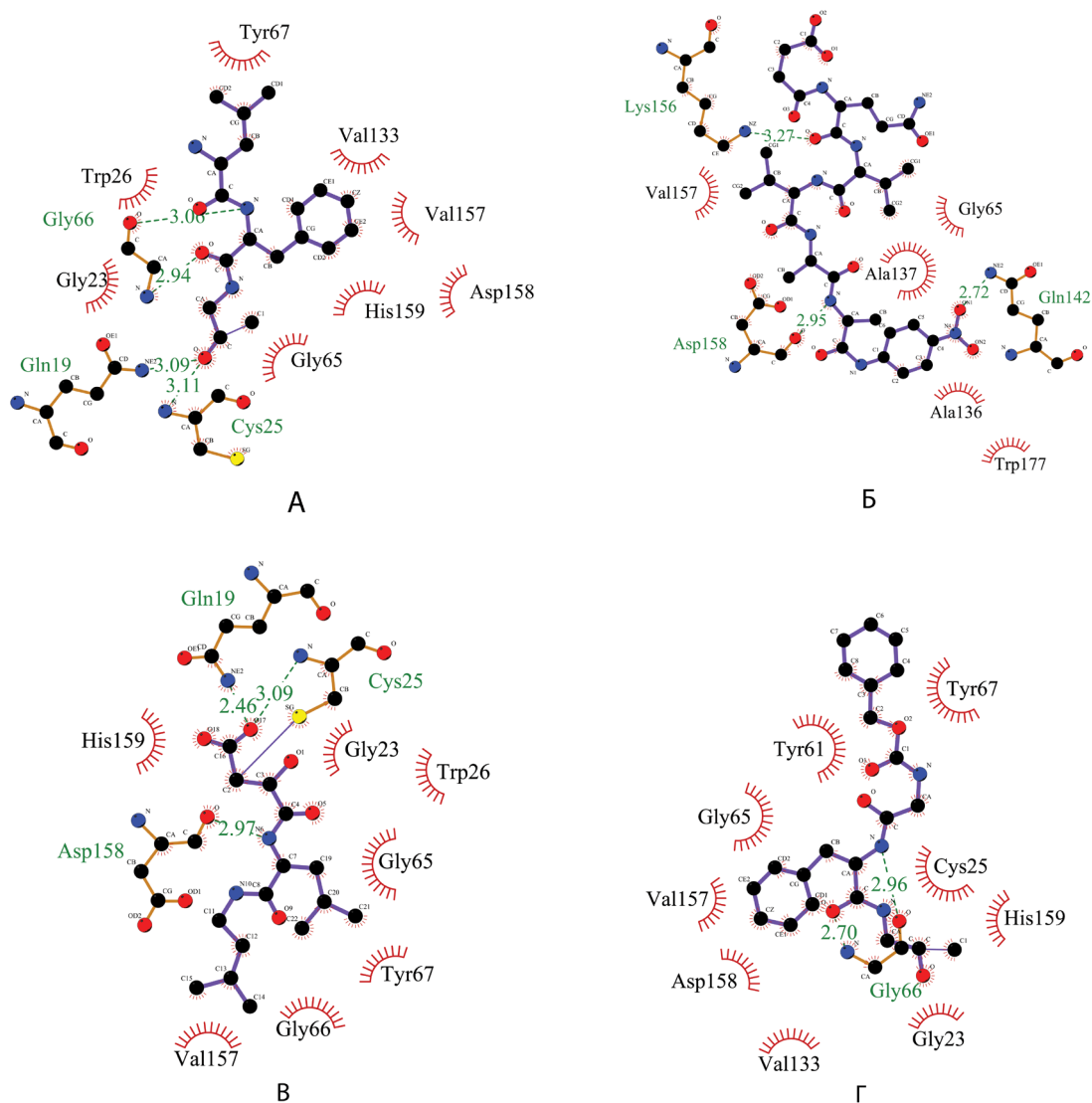


Рисунок 1. Связи (обозначены пунктирными линиями) и взаимодействия между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами в исследуемых моделях: А – 1KHQ, Б – 1PIP, В – 1PPP, Г – 5PAD

Таблица 2. Водородные связи между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами

Номер модели в базе PDB	Длина связи, Å	Аминокислотный остаток, с которым образуется водородная связь
1KHQ	3.09	Gln19
	3.11	Cys25
	3.06, 2.94	Cly66
1PIP	2.72	Gln142
	2.95	Asp158
	3.27	Lys156
1PPP	2.46	Gln19
	3.09	Cys25
	2.97	Asp158
5PAD	2.7, 2.96	Cly66

Таблица 3. Гидрофобные взаимодействия между аминокислотными остатками папаина и его ингибиторами

Номер модели в базе PDB	Аминокислотный остаток, с которым происходят гидрофобные взаимодействия
1KHQ	Gln19, Gly23, Cys25, Trp26, Gly65, Gly66, Tyr67, Val133, Val157, Asp158, His159, Phe252, Gly253
1PIP	Gly65, Ala136, Ala137, Gln142, Lys156, Val157, Asp158, Trp177, Gln400, Val401, Val402, Ala403, Ala404
1PPP	Gln19, Gly23, Cys25, Trp26, Gly65, Gly66, Tyr67, Val157, Asp158, His159
5PAD	Gly2, Phe3, Gly4, Gly23, Cys25, Tyr61, Gly65, Gly66, Tyr67, Val133, Val157, Asp158, His159

Представленные в работе данные позволяют сделать вывод о том, что ингибиторы могут формировать с остатком Cys25 активного центра папаина как водородные связи, так и участвовать в гидрофобных взаимодействиях. При этом инактивирующее действие, вероятно, может быть опосредовано не только физическим экранированием каталитически значимых аминокислот, но и через изменение конформации анализируемого фермента. Результаты нашей работы могут быть использованы при изучении характера взаимодействия папаин-подобных цистеиновых протеаз с их ингибиторами.

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. Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B., Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current pharmaceutical design*, 2007, vol. 13, no. 4, pp. 387-403.
2. Berdowska I., Ski M. The role of cysteine cathepsins and their inhibitors in physiological and neoplastic processes. *Postepy biochemii*, 2000, vol. 46, no. 1, pp. 73-84.
3. Memmert S., Damanaki A., Nogueira A.V., Eick S., Nokhbehsaim M., Papadopoulou A.K., Deschner J. Role of cathepsin S in periodontal inflammation and infection. *Mediators of inflammation*, 2017, vol. 2017, pp. 2017.
4. Ndao M., Nath-Chowdhury M., Sajid M., Marcus V., Mashiyama S.T., Sakanari J., Caffrey C.R. A cysteine protease inhibitor rescues mice from a lethal *Cryptosporidium parvum* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, vol. 57, no. 12, pp. 6063-6073.
5. Rosenthal P.J. Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites. *Cysteine proteases of pathogenic organisms*, 2011, vol. 30, p. 48.
6. Zhang L., Lin D., Sun X., Curth U., Drosten C., Sauerhering L., Hilgenfeld R. Crystal structure of SARS-CoV-main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 2020, vol. 2, pp. 409-412.
7. Sajid M., McKerrow J.H., Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology*, 2002, vol. 120, no. 1, pp. 1-21.

8. Stoch S.A., Wagner J.A., Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2008, vol. 83, no. 1, pp. 172-176.
9. Hellinger R., Gruber C.W., Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug discovery today*, 2019, vol. 24, no. 9, pp. 1877-1889.

IN SILICO STUDY OF AMINO ACID COMPOSITION OF PAPAINE BINDING SITES WITH DIFFERENT NATURAL INHIBITORS

Sakibaev F.A.¹, Holyavka M.G.^{1,2}, Nekhaev I.S.¹, Artyukhov V.G.¹

¹ Voronezh State University

sq. Universitetskaya, 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: farkhatlukum@gmail.com

² Sevastopol State University

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

Abstract. Cysteine proteases are widespread in nature, as well as they are an important link in physiological and biochemical processes in all living organisms. Precise control of their proteolytic activity is essential for the proper functioning of whole cells and organisms. The work investigated the interaction of papain with inhibitors of various natures. The amino acid composition of the binding sites was determined using the LigPlot software. Amino acid residues that are in direct contact with the analyzed compounds have been identified. The presence of both hydrophobic interactions and hydrogen bonds was shown. The latter are formed in the following amounts: 4 with methyl ester of *N-tert*-butyloxycarbonyl-phenyl-glycine with the participation of 3 amino acid residues; 3 with succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide and loxystatinic acid (E64-c) with the participation of 3 residues; 2 with chloromethyl ketone with the participation of one residue. In the implementation of hydrophobic interactions with loxystatinic acid, 10 amino acid residues are involved, 13 amino acid residues each with *N-tert*-butyloxycarbonyl-phenyl-glycine methyl ester, chloromethyl ketone and succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide. It was found that in the case of binding of papain to succinyl-Gln-Val-Val-Ala-Ala-*p*-nitroanilide, no overlapping of the amino acids of the active center occurs, which may indicate inhibition of the enzyme by this compound by changing the spatial structure of the biocatalyst. The data presented in this work can be used to study the nature of the interaction of papain-like cysteine proteases with their inhibitors.

Key words: *papain, inhibitors, amino acid composition, in silico analysis.*