

И.А. Комлач

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ
АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ**

Научный руководитель: магистр мед. наук, ассист. В.В. Побойнев

Кафедра общей химии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

I.A. Komlach

**DETERMINATION OF THE STRUCTURAL STABILITY OF THE ACTIVE
CENTER OF CYSTEINE PROTEASES**

Tutor: assistant professor V.V. Poboinev

Department of General Chemistry

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. С помощью алгоритма PentUnFOLD изучена структурная стабильность цистеиновых протеаз и их активных центров, проанализированы возможные структурные переходы. Выявлено, что активный центр всех изученных цистеиновых протеаз сформирован аминокислотными остатками, входящими в элементы вторичной структуры, которые способны подвергаться структурным переходам.

Ключевые слова: цистеиновые протеазы, активный центр, вторичная структура, структурные переходы.

Resume. The structural stability of cysteine proteases and their active centers was studied using the PentUnFOLD algorithm, possible structural transitions were analyzed. It was revealed that the active center of all studied cysteine proteases is formed by amino acid residues included in the elements of the secondary structure, which are capable of undergoing structural transitions.

Keywords: cysteine proteases, active center, secondary structure, structural transitions.

Актуальность. Одной из серьёзных и актуальных проблем в настоящее время в медицине являются внутрибольничные инфекции, возбудители которых обычно имеют повышенную устойчивость к антибиотикам. Бактериальная резистентность является растущей проблемой во всём мире, и, по прогнозам всемирной организации здравоохранения, без разработки новых и более эффективных методов лечения смертность может возрасти до 10 миллионов к 2050 году [3]. Одними из возбудителей внутрибольничных инфекций являются бактерии родов *Klebsiella* и *Staphylococcus*. Бактерии этих родов вызывают различные заболевания, а их резистентность к антибиотикам с каждым годом возрастает. Известно, что при обработке антибиотиками эти бактерии переходят в состояние биоплёнки.

Биоплёнка представляет собой сообщество микроорганизмов, которое прикрепляется к какой-либо поверхности и выделяет специальные внеклеточные полимерные вещества, образующие слизь [1]. Развитие биоплёнки включает в себя три стадии: на первой стадии происходит прикрепление к субстрату, на второй – накопление, во время которого наблюдается активный рост, колонизация, размножение микроорганизмов, на третьей стадии происходит высвобождение биоплёнки. Сам процесс называется биообращением.

В состоянии биоплёнки устойчивость бактерий значительно повышается [2]. Поэтому, поиск способов борьбы с биоплёнками является актуальным на настоящий

момент. Поскольку цистеиновые протеазы демонстрируют антимикробную активность в отношении широкого спектра бактерий, нами проведён детальный анализ стабильности вторичной структуры белков этого семейства с целью дальнейшей разработки новых антибактериальных препаратов.

Цель: определение структурной стабильности цистеиновых протеаз и их активных центров с целью дальнейшей разработки новых антибактериальных препаратов.

Задачи:

1. Сформировать выборку цистеиновых протеаз.
2. Определить вторичную структуру выбранных ферментов.
3. Оценить стабильность цистеиновых протеаз и их активных центров на основании возможности конформационных переходов.

Материалы и методы. Информация об аминокислотной последовательности цистеиновых протеаз была взята из банка данных белков и нуклеиновых кислот Protein Data Bank (PDB). Всего было отобрано 8 структур (PDB ID: 5EF4, 1X9Y, 2P7U, 3BWK, 5EZQ, 3BPF, 3MOR, 1GCB). Определение вторичной структуры исследуемых белков осуществлялось с помощью алгоритма DSSP. Для визуализации и наглядного изучения пространственных структур белков использовалась компьютерная графическая программа RasMol. Определение структурной стабильности активного центра ферментов проводилось с помощью сервера PentUnFOLD [4].

Результаты и их обсуждение. Цистеиновые протеазы представляют собой группу протеолитических ферментов, которые разрушают белковые молекулы посредством гидролиза пептидной связи. В состав их активного центра обязательно входит цистеин и их активность определяется сульфгидрильной или тиоловой группой. Активный центр цистеиновых протеаз сформирован тремя аминокислотными остатками: цистеином, гистидином и аспарагином (рисунок 1).

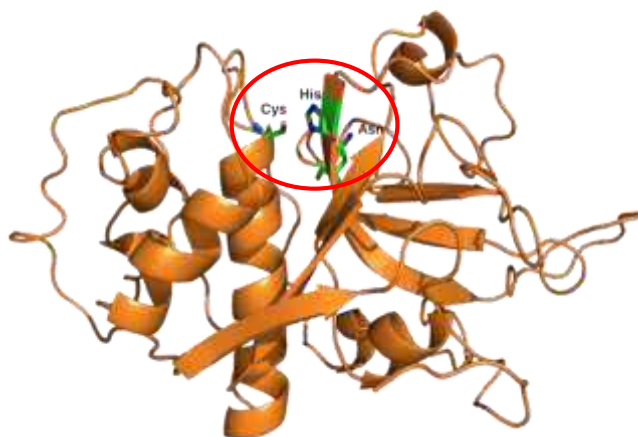


Рис. 1 – Активный центр цистеиновых протеаз

В основе механизма действия цистеиновых протеаз лежит способность атома серы, входящего в состав цистеина активного центра, проявлять нуклеофильные свойства. При этом сам по себе цистеин не достаточно сильный нуклеофил и для усиления его нуклеофильных свойств используется соседний гистидин. Процесс гидролиза пептидной связи состоит из четырёх этапов (рисунок 2).

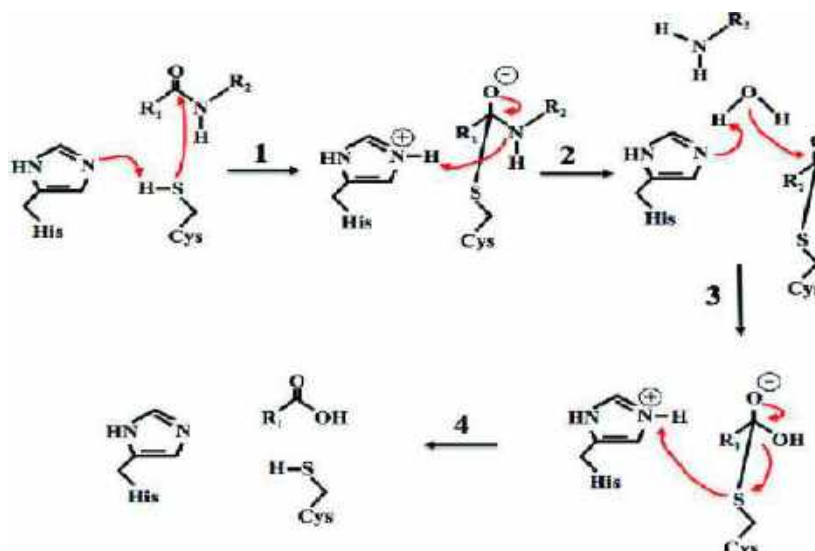


Рис. 2 – Механизм действия цистеиновых протеаз

Первым этапом является депротонирование тиола в активном центре фермента с помощью соседнего гистидина. На втором этапе происходит нуклеофильная атака анионной серы депротонированного цистеина. На этом этапе высвобождается фрагмент субстрата с аминовым концом, остаток гистидина восстанавливается до своей депротонированной формы и образуется промежуточное соединение тиоэфира, связывающее новый карбокси-конец субстрата с тиолом цистеина. Затем тиоэфирная связь гидролизуется с образованием фрагмента карбоновой кислоты при регенерации свободного фермента.

С помощью алгоритма PentUnFOLD 3D установлено, что изученные цистеиновые протеазы характеризуются нестабильной вторичной структурой: от 61 до 77% аминокислотных остатков способны к структурным переходам (таблица 1).

Табл. 1. Оценка стабильности элементов вторичной структуры цистеиновых протеаз согласно 3D версии PentUnFOLD

PDB ID	Процентное содержание нестабильных элементов вторичной структуры	Процентное содержание стабильных элементов вторичной структуры
5EF4	77,44	22,56
1X9Y	73,41	26,59
3MOR	72,59	27,41
2P7U	70,09	29,91
3BWK	68,46	31,54
5EZQ	66,56	33,44
3BPF	64,41	35,59
1GCB	60,84	39,16

Цистеин у всех белков данного семейства расположен на N-конце α -спирали. Гистидин характеризуется различной степенью устойчивости: он может располагаться на N-конце β -тяжа, который способен переходить в петлю или в полностью неструктурированное состояние; может входить состав койла, который

также способен переходить в полностью неструктурированное состояние. Кроме этого гистидин может находиться на стабильном N-конце β -тяжа. У двух ферментов гистидин принадлежит упорядоченному β -тяжу согласно 3D версии PentUnFOLD. Аспарагин активного центра у изученных ферментов входит в состав петли, которая определяется как нестабильная 3D версией алгоритма PentUnFOLD, и только у одного фермента входит в состав стабильной петли.

На примере белка родезаина (PDB ID: 2P7U) с помощью 2D и 3D версии PentUnFOLD показаны структурные переходы элементов вторичной структуры, содержащие цистеин активного центра (рисунок 3). Стабильные элементы обозначены синим цветом, нестабильные – красным, жёлтым цветом выделен цистеин активного центра фермента. Цистеин активного центра принадлежит к нестабильному N-концу α -спирали. При этом N-конец α -спирали определяется как нестабильный двумя версиями алгоритма PentUnFOLD. Только у одной цистеиновой протеазы 1GCB (блеомицин) цистеин расположен на стабильном N-конце α -спирали.

А		Б								
25	24	C	H	C	E	HS	25	C	H	D
26	25	W	H	E	E	HS	26	W	H	D
27	26	A	H	E	E	HS	27	A	H	D
28	27	F	H	E	E	HS	28	F	H	D
29	28	S	H	E	H	HS	29	S	H	D
30	29	T	H	E	H	HS	30	T	H	D
31	30	I	H	C	H	HS	31	I	H	D
32	31	G	H	E	H	HS	32	G	H	D
33	32	N	H	C	E	HS	33	N	H	D
34	33	I	H	C	E	HS	34	I	H	D
35	34	E	H	C	E	HS	35	E	H	D
36	35	G	H	H	E	HS	36	G	H	D
37	36	Q	H	H	E	HS	37	Q	H	D
38	37	W	H	E	E	HS	38	W	H	D
39	38	Q	H	H	E	HS	39	Q	H	D
40	39	V	H	H	E	HS	40	V	H	D

Рис. 3 – Стабильность элемента вторичной структуры, содержащего цистеин активного центра цистеиновой протеазы 2P7U. А – стабильность вторичной структуры по 2D версии алгоритма PentUnFOLD, Б – по 3D версии алгоритма PentUnFOLD

Гистидин активного центра цистеиновых протеаз характеризуется различной степенью стабильности. У большинства ферментов он расположен на нестабильном N-конце β -тяжа. У двух белков – фальципаин 3 (PDB ID: 3BWK) и фальципаин 2 (PDB ID: 3BPF) гистидин находится на стабильном N-конце β -тяжа (рисунок 4).

А		Б								
183	176	H	E	C	H	ES	183	H	E	O
184	177	A	E	E	H	ES	184	A	E	O
185	178	V	E	E	E	ES	185	V	E	O
186	179	I	E	E	E	ES	186	I	E	O
187	180	L	E	E	E	ES	187	L	E	O
188	181	V	E	E	E	ES	188	V	E	O
189	182	G	E	E	E	ES	189	G	E	O
190	183	Y	E	C	E	ES	190	Y	E	O
191	184	G	E	C	E	ES	191	G	E	O
192	185	M	E	C	E	ES	192	M	E	O
193	186	K	E	C	H	ES	193	K	E	D
194	187	D	E	E	H	ES	194	D	E	D
195	188	I	E	C	H	ES	195	I	E	D
196	189	Y	E	C	H	ES	196	Y	E	D

Рис. 4 – Стабильность элемента вторичной структуры, содержащего гистидин активного центра цистеиновой протеазы 3BWK. . А – стабильность вторичной структуры по 2D версии алгоритма PentUnFOLD, Б – по 3D версии алгоритма PentUnFOLD

Аспарагин активного центра у изученных ферментов входит в состав петли, которая определяется как нестабильная 3D версией алгоритма PentUnFOLD (рисунок 5А), и только у одного фермента 1X9Y (простафопоин) аспарагин входит в состав стабильной петли (рисунок 5Б).

А				
201	I	E	O	
202	I	E	O	
203	K	E	D	
204	N		D	
205	S	S	D	
206	W	B	D	
207	G		D	
208	Q	T	D	
209	Q	T	D	
210	W	S	D	
211	G	T	D	
212	E	B	D	

Б			
353	Q	E	D
354	E	E	D
355	K	E	O
356	L	E	O
357	I	E	O
358	Y	E	O
359	W	E	O
360	N		O
361	P	T	O
362	W	T	O
363	D		O
364	T	S	D
365	E	S	D

Рис. 5 – Стабильность элемента вторичной структуры, содержащего аспарагин активного центра цистеиновых протеаз 3VPF (А) и 1X9Y (Б)

Выводы: аминокислотные остатки активного центра изученных цистеиновых протеаз характеризуются различной способностью подвергаться структурным переходам, что, видимо, необходимо в процессе взаимодействия данных ферментов с их лигандами.

Литература

1. Биопленка [Электронный ресурс]: Википедия. Свободная энциклопедия. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/биопленка> (дата обращения: 10.03.2023).
2. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia / Nirwati H. [et al.] // BMC Proc. – 2019. – Vol. 13 (Suppl 11). – N. 20.
3. Marlieke, E. A. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? / E. A. Marlieke, J. S. Andrew, H. Stephan // PLoS Med. – 2016. – Vol. 13. – P. 1–6.
4. The PentUnFOLD algorithm as a tool to distinguish the dark and the light sides of the structural instability of proteins / V. V. Poboinev [et al.] // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 1155–1171.