



## INHIBITION OF PROTEOLYSIS IN PLANT AND ANIMAL TISSUES

Chirkin Aliaksandr\*, Dolmatova Viktoryia

Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Vitebsk, Belarus

## ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОТЕОЛИЗА В РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Чиркин Александр, Долматова Виктория

Received 23. 6. 2017

Revised 25. 6. 2017

Published 25. 11. 2017

The aim of the study was a comparative analysis of the alpha-1-antitrypsin and the alpha-2-macroglobulin content in 6-day seedlings *Phaseolus vulgaris* L. and hepatopancreas *Lymnaea stagnalis* L and *Planorbarius corneus* L. Quantification of proteinase inhibitors ( $\alpha$ 1-antiprotease inhibitor and  $\alpha$ 2-macroglobulin) was performed according to a method based on BAPNA-amidase reaction at pH values of incubation media of 3.0; 3.8; 6.1; 7.2; 8.0 and 9.0. It has been found that *Phaseolus vulgaris* cotyledons contain more alpha-1-antiprotease inhibitors that work in acidic, neutral and alkaline media compared to similar inhibitors of molluscs hepatopancreas. At pH 3.8, the content of alpha-2-macroglobulin in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* is 8 times higher than the levels of this inhibitor in the hepatopancreas of molluscs. The sites of ethionine binding with human trypsin and pulmonary freshwater molluscs are located in close loci at the C-ends of the enzyme molecules, which allows to consider these animals as potential model organisms for biopharmaceutical studies of the proteolysis-antiproteolysis system.

**Keywords:** proteolysis; antiproteolysis; amidase reaction; docking; *Phaseolus vulgaris*; *Lymnaea stagnalis*; *Planorbarius corneus*

### Введение

Группу белков, имеющих определённое структурное сходство между собой и способных ингибировать сериновые протеазы называют серпинами. В 2001 году была опубликована классификация серпинов, по которой 500 белков, отнесённых к серпинам, были разделены на 16 кладов (Silverman et al., 2001). Для диагностики патологий удобно выделять ингибиторы сериновых протеаз (альфа-антитрипсин, альфа-антихимотрипсин, антитромбин и др.), а также связывающие глобулины и другие белки (транскортин, овальбумин, альфа-2-макроглобулин и др.). Белки суперсемейства серпинов участвуют в важных биологических процессах: в стресс-реакции, свертывании крови, активации комплемента, фибринолизе, ангиогенезе, воспалении, подавлении роста опухолей, в механизмах запрограммированной гибели клеток и постэмбриональном развитии. Серпины построены из 350 – 400 аминокислот. С-терминальный адресный код, предназначенный для ассоциации с секреторными органеллами, присутствует, например, во всех ортологах нейросерпинов.

\*Corresponding author: Aliaksandr Chirkin, Vitebsk State University named after P.M. Masherova, Vitebsk, Belarus, ✉ [chir@tut.by](mailto:chir@tut.by)

Следовательно, контроль серпинами за маршрутами эндоцитоза и экзоцитоза является древним способом защиты основных внутриклеточных путей экспорта и импорта от неконтролируемой эндогенной или чужеродной протеолитической активности (Van Gent D. et al., 2003; Pak et al., 2004; Kumar and Ragg, 2008). Серпины найдены у разных видов царства растений и в зеленых водорослях. Такой контроль протеолиза важен для роста растений, развития, реакции на стресс и защиты от насекомых и патогенов. Серпины растений являются мощными ингибиторами сериновых протеаз млекопитающих семейств трипсинов и химотрипсинов *in vitro* (Roberts and Hejgaard, 2008).

Большинство серпинов необратимо инактивируют специфические сериновые протеазы. Процесс взаимодействия ингибитора и целевой протеазы быстрый, поэтому нативная структура серпинов метастабильная. Серпиновые гены обнаружены у ряда бактерий, архей и одноклеточных эукариот (зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*, динофлагеллят *Alexandrium tamarense* и человеческие патогены *Entamoeba* spp., *Eimeria tenella*, *Toxoplasma gondii* и *Giardia lamblia*). Филогенетическая изменчивость серпинов у одноклеточных организмов проявляется в области петли активного центра ингибиторов, важной для их специфичности (Roberts et al., 2004). По механизму действия различают три основных типа ингибиторов: канонические (стандартный механизм), неканонические и серпины. Канонические ингибиторы связываются с ферментом через открытую выпуклую петлю связывания, которая комплементарна активному центру целевого фермента. Неканонические ингибиторы взаимодействуют через их N-концевой сегмент. Существуют также обширные вторичные взаимодействия за пределами активного центра, что в значительной степени способствует силе, скорости и специфике распознавания. Серпины, подобно каноническим ингибиторам, взаимодействуют с их целевыми протеазами подобно субстратам. В результате разрыва даже одной пептидной связи в целевой молекуле связывания возникают существенные конформационные изменения, нарушающие ее функциональную активность (Krowarsch et al., 2003).

Филогенетический анализ показал, что серпины, вероятно, возникли у обитателей кембрийских морей (полипы, медузы, гребневники и черви) около 1 000 миллионов лет назад, что подтверждается сходством аминокислотных последовательностей ингибиторов сериновых протеаз у медузы волосистая цианея (*Cyanea capillata*) и нематоды – возбудителя эхинококкоза у некоторых наземных млекопитающих и человека (*Echinococcus multilocularis*). Ингибитор сериновых протеаз медуз - jellupin подавлял активность химотрипсина, катепсина G и эластазы человека каноническим способом, образуя стабильный комплекс фермент-ингибитор (Hou et al., 2003; Cole et al., 2004). Широко распространенным компонентом, участвующим в защите клеток и тканей от патогенов, является альфа-2-макроглобулин (альфа-2МГ), который функционирует как протеазосвязывающий белок широкого спектра без прямой блокировки активного центра протеазы. Этот белок регулирует также связывание трансферрина с его поверхностным рецептором, связывает несколько важных цитокинов, ряд гормонов, цинк и медь. Связанная с альфа-2МГ протеаза интернализуется и деградирует во вторичных лизосомах клеток. Предполагают, что альфа-2-МГ появился и распространился среди многоклеточных организмов способом горизонтального переноса генов. Большинство бактерий с генами альфа-2МГ используют многоклеточные растения и животных в качестве хозяев (эффект колонизации) (Armstrong and Quigley, 1999; Budd et al., 2004; Rehman et al., 2013).

Секреция сериновых протеаз различными фитопатогенными микроорганизмами вызывает изменения в системе протеолиз-антипротеолиз атакуемого растения. Показано, что фитопатогены картофеля оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и грибы *Rhizoctonia solani* и *Fusarium culmorum* секретируют сериновые протеазы трипсино- и субтилизиноподобного действия (Кудрявцева и др., 2013). Растения производят множество белков (пептидов), которые участвуют в защите от патогенов, в частности, ингибиторы, которые

могут ингибировать аспарагиновые, сериновые и цистеиновые протеиназы. Повышенные уровни ингибиторов трипсина и химотрипсина коррелируют с устойчивостью растений к патогену (Kim et al., 2009). Первым одобренным биофармацевтическим белком, полученным из растительных клеток, явилась лизосомальная кислая бета-глюкоцереброзидаза, фермент человека, который используется в энзиматической терапии пациентов с болезнью Гоше.

Однако, технологии рекомбинантных ДНК растительных клеток в создании белковых препаратов для человека сталкиваются с проблемой протеолиза. Были протестированы различные стратегии для уменьшения нежелательного протеолиза рекомбинантных белков в растительных клетках, таких как совместная экспрессия ингибиторов протеазы вместе с целевым белком и подавление экспрессии генов протеаз, позволяют увеличить выход белка пока всего в 2 раза (Mandal et al., 2016).

Целью работы был сравнительный анализ содержания альфа-1-антитрипсина и альфа-2-макроглобулина в тканях проростков обыкновенной фасоли и легочных пресноводных моллюсков.

## Материалы и методы

Семена фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) проращивали в присутствии H<sub>2</sub>O и семядоли собирали через 6 дней согласно Karmous et al. (2012). Семядоли гомогенизировали в ступке при 4 °C в четыре раза превышающем свежую массу объеме воды. Гомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 × g и супернатант использовали для измерения содержания ингибиторов протеаз. Аналогичным образом готовили гомогенаты тканей гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков – прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis* L) и катушки роговой (*Planorbarius corneus* L), отличающихся по типу транспорта кислорода. Первый из них признан модельным организмом для исследования действия водорастворимых химических агентов в ЕЭС в 2010 году. Разработаны детальные требования к проведению строго контролируемых исследований в течение всей или части жизни моллюска (Series on Testing and Assessment. No. 121. Detailed review paper on molluscs life-cycle toxicity testing. JT03284405. Environment Directorate. Paris 2010). В работе использованы N-α-бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА; 3 ммоль/л), трипсин (1,7 мкмоль/л), ингибитор трипсина (0,42 мкмоль/л) фирмы Fluka. Определение содержания ингибиторов протеаз (α1-антипротеазного ингибитора и α2-макроглобулина) проводили по методу, основанному на БАПНА-амидазной реакции при значениях pH инкубационных сред 3,0; 3,8; 6,1; 7,2; 8,0 и 9,0. Содержание определяемых ингибиторов протеаз выражали в г/кг свежей ткани (Karmous et al., 2012; Чиркин и др., 2012).

Представлял интерес поиск общих мишеней для действия антиметаболита этионина на протеолитические ферменты человека и модельного организма. Для этой цели был произведен сравнительный анализ *Biomphalaria glabrata* и *Planorbarius corneus*, поскольку они относятся к одному семейству брюхоногих моллюсков (Planorbidae) из отряда лёгочных моллюсков (*Pulmonata*). На сайте National Center for Biotechnology Information в разделе «Nucleotide» была найдена аминокислотная последовательность белка трипсина *Biomphalaria glabrata* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/908461094/>), которая при парном выравнивании с аминокислотной последовательностью белка трипсина человека (PDB ID 1H4W) давала наибольший процент сходства (26,67 %). Для проведения молекулярного докинга (соответствия) необходимо наличие 3D структуры белка, для получения которой был использован сервер [www.swissmodel.expasy.org](http://www.swissmodel.expasy.org). Проведено моделирование по образцу (User Template Mode) с использованием в качестве шаблона структуры белка трипсина человека. Две структуры белка трипсина (*Homo sapiens* и *Biomphalaria glabrata*) были загружены на сервер молекулярного докинга [www.dockingserver.com](http://www.dockingserver.com). В качестве лиганда в докинге был использован этионин ((L)-Ethionine).

## Результаты и их обсуждение

Результаты исследования содержания ингибиторов протеаз в тканях семян фасоли обыкновенной и гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков представлены в таблице 1.

**Таблица 1** Зависимость содержания ингибиторов протеаз (г/кг) в тканях фасоли и гепатопанкреаса легочных пресноводных моллюсков от величины pH инкубационной среды

**Table 1** Dependence of the content of protease inhibitors (g/kg) in the tissues of kidney beans and hepatopancreas of pulmonary freshwater molluscs on the pH value of the incubation medium

pH	Альфа-1-антипротеазный ингибитор			Альфа-2-макроглобулин		
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Planorbarius corneus</i>
3,0	9,19 ±2,43	0,97 ±0,11*	3,06 ±0,59*	14,4 ±6,33	22,8 ±3,70	20,1 ±3,80
3,8	7,94 ±0,97	9,84 ±0,16	9,82 ±0,17	73,3 ±3,91	9,92 ±0,11*	8,65 ±1,02*
6,1	1,45 ±0,06	0,36 ±0,08*	0,22 ±0,11*	4,98 ±0,11	5,99 ±0,52	6,10 ±0,58
7,2	1,65 ±0,12	0,75 ±0,14*	0,19 ±0,14*	5,66 ±0,10	5,84 ±0,59	5,83 ±0,49
8,0	0,40 ±0,06	1,04 ±0,17*	0,59 ±0,27	6,20 ±0,35	5,44 ±0,21	5,98 ±0,43
9,0	1,07 ±0,07	0,47 ±0,05*	0,31 ±0,11*	5,26 ±0,15	5,89 ±0,03	5,85 ±0,58

\*  $P < 0,05$  при сравнении показателей моллюсков с аналогичными показателями фасоли при одинаковом значении pH

Из анализа данных таблицы следует, что в семенах фасоли обыкновенной содержится больше альфа-1-антипротеазных ингибиторов, работающих в кислой, нейтральной и щелочной среде по сравнению с аналогичными ингибиторами легочных пресноводных моллюсков. При pH 8,0 количество альфа-1-протеазного ингибитора оказалось повышенным только в гепатопанкреасе *Lymnaea stagnalis*, а при pH 3,8 были выявлены одинаковые уровни этих ингибиторов во всех исследуемых тканях.

В то же время содержание альфа-2-макроглобулина в семенах фасоли обыкновенной в 8 раз превышало уровни этого ингибитора в гепатопанкреасе моллюсков. Известно, что при среднем содержании белка в семенах фасоли 240 г/кг из них можно получить примерно 200 мг ингибиторов протеаз в виде 14 полипептидов.

В предварительных опытах было показано, что после введения моллюскам антимагнетолита метионина – этионина наблюдается уменьшение уровня белков в гепатопанкреасе и гемолимфе с последующей активацией ингибиторов протеолиза. Такой эффект позволяет рассматривать легочных пресноводных моллюсков как модельных животных для биофармацевтических исследований потенциальных препаратов, в том числе растительного происхождения. При сравнении результатов 2-х докингов между собой было выяснено, что 6 аминокислот у *Homo sapiens* и у *Biomphalaria glabrata* связываются с этионином. Аминокислоты для *Homo sapiens*: Asp 189, Ser 190, Gln 192, Ser 195, Val 213, Cys 220. Аминокислоты для *Biomphalaria glabrata*: Asp 224, Ser 225, Gln 227, Ser 230, Val 248, Cys 254. Таким образом, места связывания этионина с протеолитическими ферментами человека и легочных пресноводных моллюсков располагаются в близких локусах на С-концах молекул ферментов, что позволяет рассматривать этих животных в качестве потенциальных

модельных организмов для биофармацевтических исследований системы протеолиз-антипротеолиз.

## Выводы

В шестисуточных семядолях фасоли обыкновенной содержится больше серпинов, чем в гепатопанкреасе легочных пресноводных моллюсков. Введение моллюскам антиметаболита метионина – этионина вызывает уменьшение уровня белков в гепатопанкреасе и гемолимфе с последующей активацией ингибиторов протеолиза. Места связывания этионина с трипсинами человека и легочных пресноводных моллюсков располагаются в аналогичных локусах молекул ферментов, что позволяет рассматривать *Lymnaea stagnalis* L and *Planorbarius corneus* L в качестве потенциальных модельных организмов для биофармацевтических исследований системы протеолиз-антипротеолиз.

## Литература

- Armstrong, P.B., Quigley, J.P. 1999. Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 23, no. 4–5, p. 375–390. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00018-x](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00018-x)
- Budd, A.1., Blandin, S., Levashina, E.A., Gibson, T.J. (2004). Bacterial alpha2-macroglobulins: colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome? *Genome Biol.*, vol. 5, no. 6, R38. DOI: 10.1186/gb-2004-5-6-r38.
- Cole, E.B., Miller, D., Rometo, D., et al. 2004. Identification and activity of a lower eukaryotic serine proteinase inhibitor (serpin) from *Cyanea capillata*: analysis of a jellyfish serpin, jellypin. *Biochemistry*, vol. 43, no. 37, p. 11750–11759. DOI:10.1021/bi049020u
- Hou, X-G., Aldridge, R.J., Bengstrom, J., Siveter, D.J., Feng, X-H. 2003. *The Cambrian Fossils of Chengjiang, China: The Flowering of Early Animal Life*. Wiley-Blackwell, 248 p. ISBN 978-1-4051-0673-3.
- Karmous, I., Jaouani Khadija, J., Chaoui, A., Ferjani, E.E.I. 2012. Proteolytic activities in *Phaseolus vulgaris* cotyledons under copper stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, vol. 18, no. 4, p. 337–343. DOI:10.1007/s12298-012-0128-4
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Hwang, I., et al. 2009. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 6, p. 2860–2872. DOI: 10.3390/ijms10062860
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., Otlewski, J. 2003. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol. Life Sci.*, vol. 60, no.11, p. 2427–2444. DOI:10.1007/s00018-003-3120-x
- Kumar, A., Ragg, H. 2008. Ancestry and evolution of a secretory pathway serpin. *BMC Evol. Biol.*, vol. 8, p. 250. Published online 2008 Sep 15. DOI: 10.1186/1471-2148-8-250
- Mandal, M.K., Ahvari, H., Schillberg, S., Schiermeyer, A. 2016. Tackling Unwanted Proteolysis in Plant Production Hosts Used for Molecular Farming. *Front. Plant Sci.*, vol. 7, p. 267. DOI: 10.3389/fpls.2016.00267.
- Pak, S.C., Kumar, V., Tsu, C., et al. 2004. SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 15, p. 15448–15459. DOI:10.1074/jbc.M400261200
- Rehman, A.A., Ahsan H., Khan, F.H. 2013. Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian. *J. Cell Physiol.*, vol. 228, no. 8, p.1665–1675. DOI: 10.1002/jcp.24266.
- Roberts, T.H., Hejgaard, J., Saunders, N.F.W. et al. 2004. Serpins in unicellular Eukarya, Archaea, and Bacteria: sequence analysis and evolution. *J. Mol. Evol.*, vol. 59, p. 437–447. DOI:10.1007/s00239-004-2635-6.
- Roberts, T.H., Hejgaard, J. 2008. Serpins in plants and green algae. *Funct. Integr. Genomics*, vol. 8, no. 1, p. 1–27. [https://DOI.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00134-1](https://DOI.org/10.1016/S1357-2725(03)00134-1)

- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W. et al. 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, vol. 276, p. 33293–33296. DOI: [10.1074/jbc.R100016200](https://doi.org/10.1074/jbc.R100016200)
- Van Gent, D., Sharp, P., Morgan, K., Kalsheker, N. 2003. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 35, no. 11. p. 1536–1547. [https://DOI.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00134-1)
- Кудрявцева, Н.Н., Софьин, А.В., Ревина, Т.А. и др. 2013. Секреция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами. *Прикладная биохимия и микробиология*, т. 59, № 5, с. 513–518. DOI: [10.7868/S0555109913050073](https://doi.org/10.7868/S0555109913050073)
- Чиркин, А.А., Данченко, Е.О., Бокуть, С.Б. 2012. *Биохимия филогенеза и онтогенеза*. Новое Знание Минск, 288 с. ISBN 978-985-475-506-9.