ОЛИГОПЕПТИДАЗА В – ИНСТРУМЕНТ ЗАЩИТЫ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Михайлова А.Г.¹, Ракитина Т.В.^{1,2}, Шамова О.В.³, Овчинникова М.В.^{1,4},
Горленко В.А.⁴

¹ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; ²ФГБУ Национальный
исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия; ³ФГБНУ
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; ⁴ФГБОУ
ВПО Московский педагогический государственный университет, Москва,
Россия
anna.mikhailova@ibch.ru

Олигопептидаза В (КФ 3.4.21.83) (OpdB) – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролил-олигопептидаз. OpdB присутствует в одноклеточных эукариотах: трипаносомах и лейшманиях. OpdB или гены, кодирующие этот фермент, обнаружены также в бактериях (*Escherichia coli*, *Moraxella lacunata*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Serratia proteamaculans*, *S. marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *My. leprae*, *Treponema denticola*). В настоящий момент наиболее изучены OpdB из простейших; определены трехмерные структуры OpdB *Leishmania major* и *Trypanosoma brucei*. Для большинства бактериальных олигопептидаз В известны лишь нуклеотидные последовательности, а пространственная структура и энзимологические характеристики отсутствуют. OpdB являются важными факторами вирулентности при трипаносомных инфекциях и лейшманиозах. Физиологическая роль OpdB бактерий до сих пор остается невыясненной; ее природные субстраты не обнаружены.

Природные пептиды с высоким содержанием основных остатков эффективно гидролизуются OpdB после Arg/Lys. Особый интерес представляет способность OpdB гидролизовать связь Arg(Lys)-Pro, недоступную для большинства трипсиноподобных сериновых протеиназ.

Объектом исследования является первая психрофильная OpdB (PSP), выделенная нами из непатогенного грамотрицательного психротолерантного микроорганизма *S. proteamaculans*, клонированная и функционально охарактеризованная.

Цель исследования: доказательство выдвинутой нами в результате детального изучения субстратной специфичности PSP гипотезы, что физиологической функцией OpdB грамотрицательных микроорганизмов может быть защита от антимикробных пептидов (АМП), выделяемых растениями, беспозвоночными и млекопитающими в ответ на бактериальное заражение. Для моделирования действия PSP на АМП мы выбрали пролин-богатый пептид ChBac3.4 (RFRLPFRRPPIRINPPPFYPPFRRFL-NH₂), выделенный из лейкоцитов козы *Capra hircus*.

В настоящее время все более остро встает проблема широкого распространения бактериальных патогенов, резистентных к большинству известных лекарственных средств. Антимикробные пептиды представляются многообещающей альтернативой используемым в настоящее время антибиотикам. АМП являются частью системы врожденного иммунитета, защищающей организм хозяина от патогенных бактерий. Они широко

распространены как среди позвоночных, так и беспозвоночных. Структура АМП – высокое содержание остатков положительно заряженных аминокислот и, в особенности, последовательностей из двух и более остатков Arg/Lys, а также последовательностей Arg(Lys)-Pro, делает их потенциальными субстратами олигопептидазы В. В нашей работе проведен гидролиз химически синтезированного пептида ChBac3.4 ферментом PSP, выполнен масс-спектрометрический анализ полученных фрагментов, выявлены сайты расщепления пептида OpdB.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект №17-14-01256) (выделение и очистка PSP) и РФФИ (проект №17-04-02177) (пептидный синтез).

OLIGOPEPTIDASE B AS A TOOL OF PATHOGEN MICROORGANISMS DEFENSE AGAINST ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Mikhailova A.G.¹, Rakitina T.V.^{1,2}, Shamova O.V.³,
Ovchinnikova M.V.^{1,4}, Gorlenko V.A.⁴

¹Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia; ²National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia; ³Institute for Experimental Medicine, St-Petersburg, Russia; ⁴Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia
anna.mikhailova@ibch.ru

Oligopeptidase B (EC 3.4.21.83) (OpdB) is a trypsin-like peptidase belonging to the family of serine prolyl oligopeptidases. OpdB is present in ancient unicellular eukaryotes: trypanosomes and leishmania. The OpdB enzymes and/or the genes encoding them have been also found in bacteria (*Escherichia coli*, *Moraxella lacunata*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Serratia proteamaculans*, *S. marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *My. leprae*, *Treponema denticola*). Protozoan OpDBs are now the most studied; the three-dimensional structures of OpdB from *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei* were obtained. For the main part of bacterial oligopeptidases B only the nucleotide sequences are known; the spatial structure as well as enzymological characteristics are lacking. The OpdB enzymes are important virulence factors of trypanosomal infections and leishmaniases. The physiological role of OpDBs from bacteria is still unexplained; their natural substrates are not found.

Natural peptides with a high content of basic residues are effectively hydrolyzed by OpdB after Arg/Lys. Of particular interest is the ability of OpdB to hydrolyze the Arg(Lys)-Pro bond, which is inaccessible for most trypsin-like serine proteases.

The object of the study is the first psychrophilic OpdB (PSP), isolated from a non-pathogenic Gram-negative psychrotolerant microorganism *S. proteamaculans*, cloned and functionally characterized.

Purpose of the study: proof of the hypothesis that the physiological function of OpDBs from Gram-negative microorganisms may be protection from antimicrobial peptides (AMPs) secreted by plants, invertebrates and mammals in response to bacterial infection, put forward by us as a result

of the substrate specificity of PSP studies. To simulate the effect of PSP on AMP, we chose the proline-rich peptide ChBac3.4 (RFRLPFRRPPIRIHPPPFYPPFRRFL-NH₂) isolated from the goat *Capra hircus* leukocytes.

Currently, the problem of the wide spread of bacterial pathogens resistant to most of the known drugs is becoming more acute. Antimicrobial peptides are a promising alternative to the antibiotics currently used. AMPs are part of a system of innate immunity that protects the host from pathogenic bacteria. They are widespread among both vertebrates and invertebrates. The structure of the AMPs – the high content of residues of positively charged amino acids and, in particular, sequences of two or more Arg/Lys residues, as well as Arg (Lys)-Pro sequences, makes them potential oligopeptidase B substrates. In our work, the hydrolysis of the chemically synthesized peptide ChBac3.4 by the PSP enzyme was carried out, mass spectrometry analysis of the obtained fragments was carried out, and the cleavage sites of the peptide by OpdB were revealed.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project №17-14-01256) (isolation and purification of PSP) and the Russian Foundation for Basic Research (project №17-04-02177) (peptide synthesis).