



УДК 579.222;577.151

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В ПРОТИВ ТРИПТОФАН-БОГАТЫХ АНТИПРОТОЗОЙНЫХ ПЕПТИДОВ

© 2026 г. А. Г. Михайлова*, Д. Е. Петренко**,***, Д. М. Карлинский*,
В. В. Бритиков****, Е. В. Бритикова****, Т. В. Ракитина*, **

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Россия, 123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

*** Московский физико-технический институт, Россия, 141700 Долгопрудный, Институтский пер., 9

**** Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Академика Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 29.08.2025 г.

После доработки 13.09.2025 г.

Принята к публикации 15.09.2025 г.

Пролин- и триптофан-богатые антимикробные пептиды (ПБ- и ТБ-АМП), а также их антипаразитарные аналоги представляют интерес как альтернатива традиционным лекарственным средствам. Предполагается, что олигопептидаза В (OpdB) служат естественной защитой бактерий и простейших от ПБ- и ТБ-АМП. Данная работа посвящена изучению протеолитической активности OpdB из *Serratia proteamaculans* (PSP) в отношении модельных антипаразитарных пептидов. Проведены количественная оценка и сравнительный анализ эффективности PSP-зависимого гидролиза для трех типов протеолитической активности: аминопептидазной, расщепления связи Arg-Pro и гидролиза связи Arg(Lys)-Хаа, где Хаа – любой аминокислотный остаток, кроме Pro. Установлено, что PSP действительно гидролизует пептидную связь Arg-Pro и обладает аминопептидазной активностью. Эти результаты подтверждают значимую роль OpdB в системе защиты бактериальных и протозойных клеток от ПБ- и ТБ-АМП и подчеркивают важность поиска специфических ингибиторов фермента.

Ключевые слова: пролин- и триптофан-богатые антимикробные пептиды, эффективность гидролиза, олигопептидаза В, *Serratia proteamaculans*

DOI: 10.7868/S1998286026020064

ВВЕДЕНИЕ

Активность микроорганизмов, обладающих множественной резистентностью к традиционным лекарственным средствам, – серьезная проблема в стационарах всех стран, при этом частота внутрибольничных инфекций варьируется от 62 до 72% среди всех нозокомиальных инфекций [1, 2]. Антимикробные пептиды (АМП) и их антипаразитарные аналоги – многообещающая альтернатива исполь-

зуемым в настоящее время антибиотикам [3, 4]. АМП выделяются растениями, беспозвоночными и млекопитающими в ответ на бактериальное заражение; считается, что в последнем случае они представляют собой часть системы врожденного иммунитета, защищающей организм хозяина от патогенных бактерий [5, 6]. Многочисленные типы АМП отличаются происхождением, размерами, зарядом, структурными особенностями и механизмами действия.

Сокращения: OpdB – олигопептидаза В; PSP – олигопептидаза В из *Serratia proteamaculans*; АМП – антимикробные пептиды; ПБ-АМП – пролин-богатые АМП; ТБ-АМП – триптофан-богатые АМП.

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 281-37-03; эл. почта: taniarakitina@yahoo.com).

Среди различных типов АМП особое внимание привлекают пролин-богатые АМП (ПБ-АМП) и триптофан-богатые АМП (ТБ-АМП) [7, 8]. Данные АМП широко распространены в природе и, как правило, имеют нелитический механизм действия, ингибируя внутриклеточный биосинтез за счет связывания с 70S рибосомой, белками теплового шока (DnaK и GroEL), а также липополисахаридами [9–11]. ПБ- и ТБ-АМП демонстрируют низкую токсичность для клеток млекопитающих, сохраняя высокую активность против широкого спектра патогенов, включающего не только бактерии, но и простейших, грибы, вирусы, а также против опухолевых клеток [4, 8], при этом термин АМП продолжают применять в отношении пептидов с разными антипатогенными активностями.

подавляющее большинство ПБ- и ТБ-АМП обогащено остатками аргинина [8], которые, как правило, собраны в пролин-аргининовые кластеры, обеспечивающие устойчивость пептидов к протеолитической деградации внутриклеточными протеазами. Известно, что классические сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин, эластаза и др.) не способны гидролизовать пептидные связи, образованные иминой группой остатка пролина [12–14]. В то же время сообщалось, что отдельные представители олигопептидаз В способны гидролизовать данную пептидную связь [15, 16].

Олигопептидазы В (OpdB, EC 3.4.21.83) – это сериновые эндопептидазы, принадлежащие к семейству пролилолигопептидаз S9A и обладающие трипсиновой активностью. Они присутствуют в одноклеточных эукариотах (трипаносомах и лейшманиях), а также в бактериях, преимущественно патогенных [15, 17]. OpdB – важный фактор вирулентности при трипаносомных инфекциях и лейшманиозах: попадая в кровоток инфицированных млекопитающих, они гидролизуют физиологически важные пептидные гормоны, что приводит к нарушению работы системы гормональной регуляции организма-хозяина [18, 19]. Однако данное свойство OpdB простейших не может быть их физиологической ролью, это лишь побочный эффект, вызванный разрушением патогенов в крови инфицированных организмов [16]. Физиологическая роль OpdB бактерий до сих пор также остается невыясненной, а их природные субстраты не обнаружены [17]. В то же время внутриклеточная локализация бактериальных OpdB в совокупности с их способностью гидролизовать пептидные связи Arg(Lys)-Pro позволяют предположить, что защита бактериальной

клетки от ПБ- и ТБ-АМП – одна из физиологических функций бактериальных OpdB, а сами АМП – это природные субстраты данного фермента [16, 20]. Аналогичную защитную функцию могут нести и протозойные OpdB, поэтому проведение количественной оценки эффективности OpdB-зависимого гидролиза пептидной связи Arg-Pro представляет большой научный и практический интерес. Ранее подобные исследования не проводились.

Целью данной работы было количественное изучение эффективности гидролиза пептидной связи Arg-Pro в модельных антипаразитарных пептидах под действием OpdB из условно-патогенного грамотрицательного микроорганизма *Serratia proteamaculans* (PSP).

PSP – типичный представитель OpdB [20–23], и это единственная бактериальная OpdB, для которой экспериментально получены пространственные структуры [24–28]. Наличие структурной информации высокого разрешения о конформации фермента в свободной форме и в комплексах с ингибиторами – аналогами переходного состояния – уже сейчас позволяет эффективно использовать расчетные методы для предсказания специфических ингибиторов [29], а в дальнейшем даст возможность выявить структурные основы уникальной гидролитической способности OpdB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методология оценки эффективности гидролиза. Если пептид содержит несколько центров гидролиза, то хроматографическая оценка эффективности гидролиза каждого центра представляет сложную задачу, т.к. при детекции пиков на 220 нм их площадь не пропорциональна молярной концентрации, в результате при расчетах их процентного содержания в инкубационной смеси требуется введение поправки на количество пептидных связей. Кроме того, присутствие ароматических аминокислотных остатков в составе отдельных пептидных фрагментов приводит к повышенному оптическому поглощению и к кажущемуся повышению их концентрации. Поэтому оценка сравнительной эффективности гидролиза по составу инкубационной смеси с помощью ВЭЖХ при детекции на 220 нм в общем случае будет приближительной, для точного количественного анализа при 220 нм необходимы калибровка по стандартам с аналогичным числом пептидных связей и учет искажений, вносимых ароматическими остатками.

Значительно проще оценить эффективность гидролиза, если сам пептид, и, следовательно, промежуточные и конечные продукты гидролиза

содержат хромофоры – ароматические аминокислотные остатки ($\text{Tyr} \sim 1200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ или $\text{Trp} \sim 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), которые могут быть идентифицированы с помощью ВЭЖХ при детекции на 280 нм. Если субстрат и продукты гидролиза содержат один и тот же хромофор, то их концентрации можно сравнивать напрямую по площади пиков на хроматограмме. Соответственно, начальную скорость убывания субстрата в моль/мин, а также скорости образования продуктов можно определить по данным хроматографии, построив кинетические кривые. При низкой степени конверсии (<10%) по начальной скорости убывания субстрата, которая равна сумме скоростей образования продуктов, можно определить общую эффективность гидролиза.

В качестве модельных субстратов в работе был использован синтетический антипаразитарный пептид, найденный методом фагового дисплея, HPLKQYWWRPSI-NH₂ (D2) [30] и его укороченный фрагмент KQYWWRPSI-NH₂ (C3). Пептид D2 активен в отношении *Eimeria acervulina* и *E. tenella* – возбудителей эпидемий кокцидиоза на птицефермах [31]. Оба пептида по своему аминокислотному составу относятся к ТБ-АМП и содержат два положительно заряженных аминокислотных остатка Lys и Arg, формирующих классический центр трипсинового гидролиза (K-Q) и его нерасщепляемый вариант (R-P). В пептиде C3-остаток лизина занимает N-концевое положение. Данная пептидная пара позволяет исследовать как способность PSP гидролизовать пептидную связь Arg-Pro, так и наличие у фермента

аминопептидазной активности, которая, как правило, не характерна для эндопептидаз семейства S9A [15, 17].

Оба пептида содержат два центра гидролиза (K-Q и R-P), разделенные хромофором, состоящим из двух остатков триптофана. В этом случае данные ВЭЖХ при детекции на 280 нм позволяют определить правильное соотношение начальных скоростей гидролиза и, соответственно, вычислить эффективность гидролиза каждого центра по известному соотношению начальных скоростей образования продуктов.

Гидролиз пептидной связи Arg-Pro и аминокислотная активность PSP. На рис. 1 и 2 представлены результаты хроматографического анализа PSP-зависимого гидролиза 12-членного антипаразитарного пептида D2 и укороченного на три N-концевых аминокислотных остатка пептида C3.

Исходные пептиды выходят на ВЭЖХ одним пиком (рис. 1а и 2а). При добавлении 30 нМ PSP к пептиду D2 наблюдается эффективное расщепление связи K-Q с образованием продуктов гидролиза HPLK (P2) и QYWWRPSI-NH₂ (P1) (рис. 1б). Однако при повышении концентрации фермента (с 0.6 до 3 мкМ) и времени гидролиза (с 3 до 30 ч) продукт P1 подвергается дальнейшему расщеплению с появлением пептида QYWWR (P3), который образуется в результате гидролиза пептидной связи R-P (рис. 1в). Таким образом, продемонстрирован PSP-зависимый гидролиз пептидной связи между остатками аргинина и пролина.

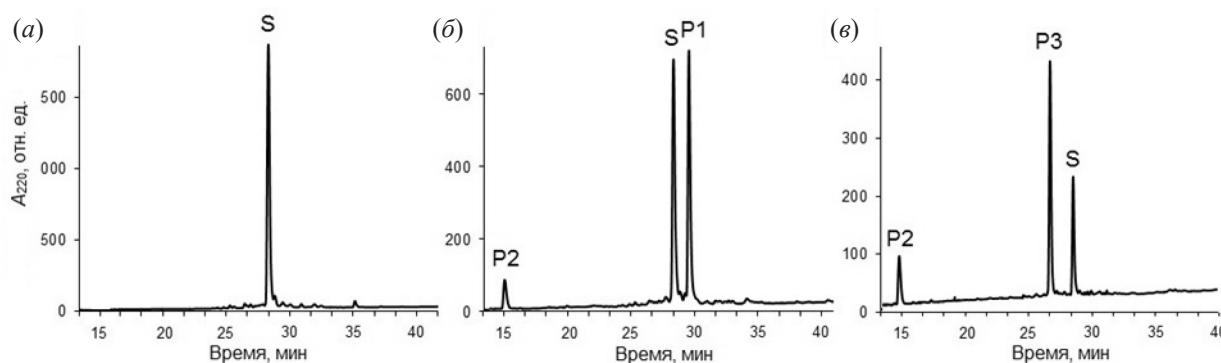


Рис. 1. Хроматографический анализ гидролиза пептида D2 (100 мкМ) при инкубации с PSP в 0.1 М Tris-HCl-буфере (pH 8.0) при 25°C. ВЭЖХ: колонка Luna C8, 2 × 250 мм (Phenomenex, США); элюция 0.1%-ным раствором ТФУ с градиентом ацетонитрила 0–80%, скорость элюции 0.3 мл/мин. Детекция при 220 нм. (а) – Исходный пептид; (б) и (в) – продукты гидролиза при инкубации с 30 нМ PSP (3 ч) и 3 мкМ PSP (30 ч) соответственно. S – HPLKQYWWRPSI-NH₂ (пик 28.8 мин); P1 – фрагмент 5–12: QYWWRPSI-NH₂ (пик 29.5 мин); P2 – фрагмент 1–4: HPLK (пик 15.2 мин); P3 – фрагмент 5–9: QYWWR (пик 27.5 мин).

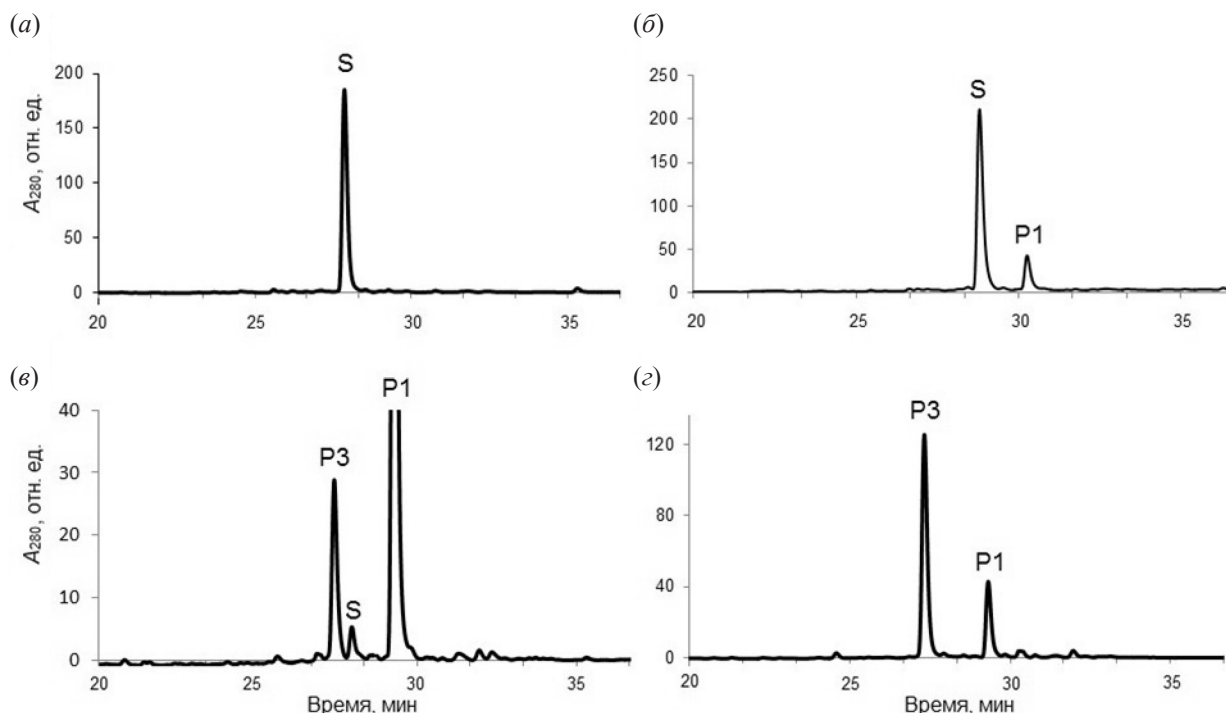


Рис. 2. Гидролиз пептида C3 (100 мкМ) при инкубации с PSP в 0.1 М Tris-HCl-буфере (pH 8.0) при 25°C. ВЭЖХ: колонка Luna C8, 2 × 250 мм (Phenomenex, США); элюция 0.1%-ным раствором ТФУ с градиентом ацетонитрила 0–80%, скорость элюции 0.3 мл/мин. Детекция при 280 нм. (а) – Исходный пептид; (б–г) – продукты гидролиза при инкубации с 0.6 мкМ PSP (1.3 ч), 0.6 мкМ PSP (4.5 ч) и 3 мкМ PSP (49.5 ч) соответственно. S – KQYWWRPSI-NH₂ (пик 28.3 мин); P1 – фрагмент 2–9: QYWWRPSI-NH₂ (пик 29.5 мин, идентичный пику фрагмента 5–12 пептида D2); P3 – фрагмент 5–9: QYWWR (пик 27.5 мин, тот же, что и при гидролизе пептида D2).

При инкубации пептида C3 (с *N*-концевым остатком Lys) с 0.6 мкМ PSP, как и в случае пептида D2, сначала появляется пептид P1 (рис. 2б), а затем продукт его расщепления P3 (рис. 2в, 2г). Следует отметить, что в случае D2 продукт P1 (QYWWRPSI-NH₂) образуется вместе с P2 (HPLK) в результате обычного трипсиноподобного гидролиза пептидной связи K-Q, тогда как в случае пептида C3 продукт P1 – результат отщепления *N*-концевого остатка лизина. Появление P1 при гидролизе пептида C3 доказывает наличие у PSP аминопептидазной активности. Таким образом, пара пептидов D2 и C3 позволяет исследовать эффективность аминопептидазной активности PSP наряду с эффективностью гидролиза связи R-P.

Как уже было отмечено выше, аминопептидазная активность не характерна для OpdB [15, 17]. Однако в работе Morty et al. [18] приведены данные об очень медленном гидролизе субстрата H-Arg-AMC (где AMC – 7-амино-4-метилкумарин) OpdB из *Trypanosoma evansi*. Эффективность такого гидролиза в 2000 раз меньше, чем в случае *N*-защищенного производного аргинина, который, в свою очередь, тоже представляет собой

низкоэффективный субстрат для OpdB. В то же время гидролиза дипептида H-Arg-Arg-OH с образованием двух молекул аргинина обнаружено не было [18].

Исходные пептиды D2 и C3 и продукты гидролиза P1 и P3 содержат по два остатка триптофана, что позволяет в процессе гидролиза фиксировать изменение площадей соответствующих хроматографических пиков при детекции на 280 нм. Более того, существенная разница скоростей гидролиза пептидов D2 и C3 с образованием продукта P1 и последующего гидролиза P1 с образованием P3 позволяет независимо определить скорости гидролиза пептидных связей K-Q как в пептиде D2, так и в пептиде C3, где гидролиз – результат аминопептидазной активности, а также скорость гидролиза связи R-P (рис. 3). Процесс отщепления *N*-концевого лизина от пептида C3 с образованием продукта P1 происходит намного медленнее, чем образование продукта P1 при гидролизе пептида D2 по такой же связи K-Q (рис. 3а). В то же время скорость расщепления связи R-P еще меньше и одинакова при гидролизе пептидов D2 и C3 (рис. 3б).

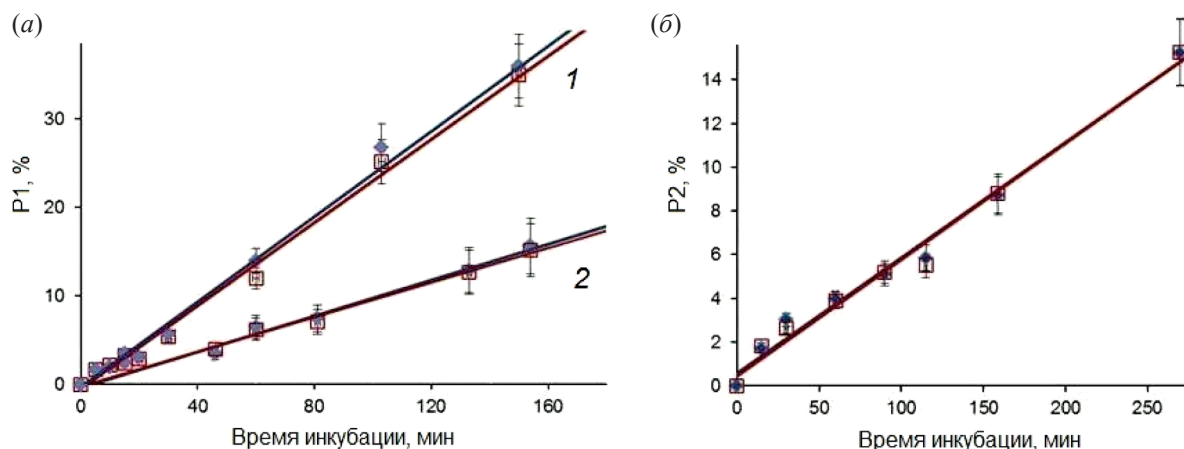


Рис. 3. Эффективность PSP-зависимого гидролиза пептидной связи К-Q в пептидах D2 ([E] – 30 нМ) (1) и C3 ([E] – 0.6 мкМ) (2) (а) и пептидной связи R-P в пептидах D2 и C3 ([E] – 3 мкМ) (б). Условия гидролиза: 0.1 М Tris-HCl-буфер (рН 8.0) при 25°C; [S] – 100 мкМ. ВЭЖХ: колонка Luna C8, 2 × 250 мм (Phenomenex, США); элюция 0.1%-ным раствором ТФУ с градиентом ацетонитрила 0–80%, скорость элюции 0.3 мл/мин. Детекция при 220 (синий цвет) и 280 нм (красный цвет).

Для количественной оценки эффективности гидролиза пептидных связей К-Q и R-P при инкубации пептидов D2 и C3 с PSP использовали параметр $v/[E]$, где v – начальная скорость гидролиза (не более 10% превращения), а $[E]$ – концентрация фермента. Как следует из табл. 1, эффективность аминопептидазной активности PSP ниже эффективности трипсиноподобного гидролиза типичного субстрата в 50 раз, тогда как эффективность гидролиза пептидных связей, образованных остатками аргинина и пролина, на порядок ниже аминопептидазной активности и в ~500 раз ниже эффективности гидролиза типичного субстрата.

Таблица 1. Эффективность гидролиза пептидов D2 и C3 (100 мкМ) при инкубации с PSP в 0.1 М Tris-HCl-буфере (рН 8.0) при 25°C

Гидролизующий пептид	$v/[E]$, мин ⁻¹
HPLK*QYWWRPSI-NH ₂	8.0 ± 1.6
K*QYWWRPSI-NH ₂	0.16 ± 0.03
HPLKQYWWR*PSI-NH ₂	0.017 ± 0.003
KQYWWR*PSI-NH ₂	0.017 ± 0.003

Примечание: звездочкой отмечена гидролизующая связь.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и измерение активности рекомбинантной PSP. Рекомбинантный фермент, содержащий 6-гистидиновый таг, был получен с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, как описано в работах [21–23].

Подтверждение ферментативной активности препаратов PSP проводили спектрофотометрически с использованием *p*-нитроанилида N_α-бензоил-D,L-аргинина (BAPNA) (Sigma-Aldrich, США) в качестве субстрата в 0.1 М Tris-HCl-буфере (рН 8.0), содержащем 2% DMSO, при 25°C. В ходе инкубации 100 мкМ BAPNA с 8.55 нМ PSP на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® Kinetic (Германия) при 405 нм измеряли возрастание оптического поглощения, происходящее при образовании свободного *p*-нитроанилина ($\epsilon_{405} = 10400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Начальную скорость гидролиза BAPNA определяли по прямолинейному участку кинетической кривой (при глубине гидролиза не более 15%).

Получение синтетических пептидов. Твердофазный синтез пептидов D2 (HPLKQYWWRPSI-NH₂) и C3 (KQYWWRPSI-NH₂) выполняли с использованием ортогональной стратегии защитных групп на автоматическом пептидном синтезаторе ResPepSL (Intavis Bioanalytical Instruments, Германия). В качестве твердофазного носителя для синтеза использовали смолу Rink Amide с емкостью функциональных групп 0.45 мкМ/г (Intavis Bioanalytical Instruments, Германия). Предварительный анализ аминокислотной последовательности

пептидов при помощи программного обеспечения Intavis ResPEP SL (Intavis Bioanalytical Instruments, Германия) не выявил вероятности значительного образования β -складчатых структур в процессе синтеза, затрудняющих присоединение последующих аминокислотных остатков. Программа синтеза состояла из повторяющихся циклов, каждый из которых включал снятие защитных групп, активацию и присоединение аминокислот, блокирование свободных α -аминогрупп пептидных цепей и промывку диметилформамидом между всеми этапами. На заключительном этапе проводили снятие концевой Fmoc-защитной группы и трехкратную промывку дихлорметаном для удаления остатков диметилформамида и пиперидина, которые в дальнейшем могли ингибировать процесс депротекции. Для увеличения выхода целевых пептидов ряд стадий выполняли с повторами: двукратное снятие защитных групп, двойную активацию и блокировку свободных α -аминогрупп. По окончании синтеза смолу со связанным пептидом переносили в шприцы с PTFE-фильтрами с размером пор 0.2 мкм (Macherey-Nagel, Германия). Для отщепления пептидов от твердофазного носителя и депротекции кислотолабильных защитных групп аминокислот пептиды на твердофазном носителе инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием в 95%-ном растворе трифторуксусной кислоты (Alfa Aesar, США) с добавлением 2.5% триизопропилсилана (Alfa Aesar, США) для ингибирования свободнорадикальных процессов. Отделение смолы производили фильтрованием раствора через шприцевые фильтры. Для очистки пептидов от защитных групп и компонентов раствора депротекции использовали преципитацию пятикратным избытком ледяного метил-*трет*-бутилового эфира. Эфир удаляли декантацией после центрифугирования (4000 об/мин, 4°C, 10 мин; центрифуга Allegra X15R, Beckman Coulter, США), процедуру повторяли 3 раза. К осажденным пептидам добавляли смесь ACN/H₂O (1 : 1) до полного растворения. На заключительном этапе образцы замораживали в жидком азоте и подвергали лиофилизации в течение 24 ч в лиофильной сушке Freezone 12 (Labconco, США). Степень чистоты и соответствие полученных пептидов ожидаемой молекулярной массе определяли масс-спектрометрически с использованием MALDI-TOF MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Мониторинг гидролиза пептидов. Инкубировали пептиды (100 мкМ) с PSP (в указанной концентрации) в 0.1 М Tris-HCl-буфере, pH 8.0, при 25°C. В определенные интервалы времени

собирали аликвоты инкубационной смеси по 25 мкл. Параллельно инкубировали соответствующие контроли: 100 мкМ пептида в 0.1 М Tris-HCl-буфере, pH 8.0.

Анализ инкубационных смесей с помощью ВЭЖХ проводили на хроматографе VWR Hitachi Chromaster 5430 (Япония) с использованием колонки Luna C8, 2 × 250 мм (Phenomenex, США) и 0.1%-ного раствора ТФУ с градиентом ацетонитрила 0–80% при скорости элюции 0.3 мл/мин. В случае контрольных образцов пики пептидов оставались неизменными в течение 7–10 сут, это подтверждало, что разрушение пептидов в отсутствие фермента не происходит. Результаты хроматографии обрабатывали в программе Мультихром 5.0 (Амперсанд, Россия).

Для доказательства структуры продуктов гидролиза собирали аликвоты индивидуальных пиков и анализировали с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Масс-спектры получали на tandemном времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре с лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF/TOF-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker, Германия), оснащенном УФ-лазером, в режиме регистрации положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измерения моноизотопных масс-пиков составляла 0.007% (70 ppm). Спектры были получены в диапазоне масс 500–2000 m/z с выбором мощности лазера, оптимальной для достижения наилучшего разрешения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовали гидролитическую активность PSP в отношении антипаразитарного пептида, содержащего пептидную связь Arg-Pro, и его укороченного фрагмента, содержащего остаток Lys в N-концевом положении. С помощью ВЭЖХ и MALDI-TOF-масс-спектрометрии было установлено, что PSP действительно гидролизует пептидную связь Arg-Pro, а также обладает аминокатализаторной активностью. Наличие обеих активностей у родственных PSP ферментов упоминалось в научной литературе и ранее, но детальные исследования эффективности гидролиза не проводились. В дальнейшем использование комбинации ВЭЖХ и MALDI-TOF-масс-спектрометрии позволит детально охарактеризовать способность PSP гидролизовать широкий спектр ПБ-АМП, обогащенных пролин-аргининовыми кластерами.

Следует отметить, что используемые в работе пептиды содержали два центра гидролиза, разделенные хромофором, что позволило с помощью ВЭЖХ с детекцией при 280 нм провести нагляд-

ную количественную оценку эффективности гидролиза в случае аминопептидазной активности PSP, гидролиза связи Arg-Pro и гидролитической активности фермента в отношении пептидной связи Arg(Lys)-Хаа, где Хаа – любая аминокислота, кроме Pro.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарности сотрудникам Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” за проведение масс-спектрометрического анализа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

В части протеолитического анализа работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536). Твердофазный синтез пептидов проведен в Институте биоорганической химии НАН Беларуси при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № X23РНФ-091).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АГМ, ТВР; получение и анализ данных – АГМ, ВВБ, ЕВБ, ДЕП, ДМК, ТВР; написание статьи – АГМ, ВВБ, ЕВБ, ДЕП, ТВР; администрирование проекта – ТВР. Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Antimicrobial resistance, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators // *Lancet*. 2024. V. 404. P. 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
3. Boparai J.K., Sharma P.K. // *Protein Pept. Lett.* 2020. V. 27. P. 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
4. Kopeikin P.M., Zharkova M.S., Kolobov A.A., Smirnova M.P., Sukhareva M.S., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N., Orlov D.S., Milman B.L., Balandin S.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V., Komlev A.S., Tossi A., Shamova O.V. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 552905. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.552905>
5. Sarkar T., Chetia M., Chatterjee S. // *Front. Chem.* 2021. V. 9. P. 691532. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691532>
6. Zheng S., Tu Y., Li B., Qu G., Li A., Peng X., Li S., Shao C. // *J. Transl. Med.* 2025. V. 23. P. 292. <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06321-9>
7. Welch N.G., Li W., Hossain M.A., Separovic F., O'Brien-Simpson N.M., Wade J.D. // *Front. Chem.* 2020. V. 8. P. 607769. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.607769>
8. Mishra A.K., Choi J., Moon E., Baek K.I.-H. // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 815. <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>
9. Dmitriev R., Ropiak H.M., Yashunsky D.V., Ponomarev G.V., Zhdanov A.V., Papkovsky D.B. // *FEBS J.* 2010. V. 277. P. 4651–4661. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07872.x>
10. Шамова О.В., Орлов Д.С., Жаркова М.С., Баландин С.В., Ямищикова Е.В., Кнаппе Д., Хоффманн Р., Кокряков В.Н., Овчинникова Т.В. // *Acta Naturae*. 2016. T. 8. C. 147–157. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-3-136-146>
11. Panteleev P.V., Pichkur E.B., Kruglikov R.N., Paleskava A., Shulenina O.V., Bolosov I.A., Bogdanov I.V., Safronova V.N., Balandin S.V., Marina V.I., Kombanova T.I., Korobova O.V., Shamova O.V., Myasnikov A.G., Borzilov A.I., Osterman I.A., Sergiev P.V., Bogdanov A.A., Dontsova O.A., Konevega A.L., Ovchinnikova T.V. // *Nat Commun.* 2024. V. 15. P. 8925. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53309-y>
12. Shinnar A.E., Butler K.L., Park H.Ju. // *Bioorg. Chem.* 2003. V. 31. P. 425–436. [https://doi.org/10.1016/s0045-2068\(03\)00080-4](https://doi.org/10.1016/s0045-2068(03)00080-4)
13. Schellenberger V., Turck Ch.W., Rutter W.J. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 4251–4257. <https://doi.org/10.1021/bi00180a020>
14. Thompson R.C., Blout E.R. // *Biochemistry*. 1973. V. 12. P. 66–71. <https://doi.org/10.1021/bi00725a012>
15. Coetzer T.H., Goldring J.P., Huson L.E. // *Biochimie*. 2008. V. 90. P. 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.011>
16. Mattiuzzo M., De Gobba C., Runti G., Mardirossian M., Bandiera A., Gennaro R., Scocchi M. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 24. P. 160–167. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10015>
17. Morty R.E., Fulop V., Andrews N.W. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 3329–3337. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3329-3337.2002>

18. Morty R.E., Pellé R., Vadász I., Uzcanga G.L., Seeger W., Bubis J. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 10925–10937.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M410066200>
19. Motta F.N., Azevedo C.D.S., Neves B.P., de Araújo C.N., Grellier P., de Santana J.M., Bastos I.M.D. // Biochimie. 2019. V. 167. P. 207–216.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.006>
20. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 591–603.
21. Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю., Лубенец Н.Л., Зиганишин Р.Х., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 1427–1437.
22. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Y., Rumsh L.D. // Protein Expr. Purif. 2014. V. 93. P. 63–76.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.011>
23. Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Karlinsky D.M., Korzhenevsky D.A., Agapova Yu.K., Vlaskina A.V., Ovchinnikova M.V., Gorlenko V.A., Rumsh L.D. // Biochimie. 2017. V. 139. P. 125–136.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.013>
24. Petrenko D.E., Timofeev V.I., Britikov V.V., Britikova E.V., Klymenov S.Y., Vlaskina A.V., Kuranova I.P., Mikhailova A.G., Rakitina T.V. // Biology. 2021. V. 10. P. 1021.
<https://doi.org/10.3390/biology10101021>
25. Timofeev V.I., Petrenko D.E., Agapova Yu.K., Vlaskina A.V., Karlinsky D.M., Mikhailova A.G., Kuranova I.P., Rakitina T.V. // Crystals. 2021. V. 11. P. 1438.
<https://doi.org/10.3390/cryst11111438>
26. Britikov V.V., Timofeev V.I., Petrenko D.E., Britikova E.V., Nikolaeva A.Y., Vlaskina A.V., Boyko K.M., Mikhailova A.G., Rakitina T.V. // Crystals. 2022. V. 12. P. 712.
<https://doi.org/10.3390/cryst12050712>
27. Petrenko D.E., Karlinsky D.M., Gordeeva V.D., Arapidi G.P., Britikova E.V., Britikov V.V., Nikolaeva A.Y., Boyko K.M., Timofeev V.I., Kuranova I.P., Mikhailova A.G., Bocharov E.V., Rakitina T.V. // J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 2286.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032286>
28. Timofeev V.I., Gaponov Y.A., Petrenko D.E., Peters G.S., Agapova Y.K., Nikolaeva A.Y., Mikhailova A.G., Rakitina T.V. // Crystals. 2023. V. 13. P. 1642.
<https://doi.org/10.3390/cryst13121642>
29. Mohamed M.S., Elsaman T., Mohamed M.A., Eltayib E.M., Abdalla A.E., Idriss M.T. // Pharmaceuticals. 2025. V. 18. P. 709.
<https://doi.org/10.3390/ph18050709>
30. da Silva A., Kawazoe U., Freitas F.F.T., Gatti M.S.V., Dolder H., Schumacher R.I., Juliano M.A., da Silva M.J., Leite A. // Mol. Biochem. Parasitol. 2002. V. 120. P. 53–60.
[https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00439-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00439-x)
31. Flores R.A., Nguyen B.T., Cammayo P.L.T., Võ T.C., Naw H., Kim S., Kim W.H., Na B.K., Min W. // BMC Veterin. Res. 2022. V. 18. P. 277.
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03369-3>

Proteolytic Activity of Oligopeptidase B Against Tryptophan-Rich Antiprotozoal Peptides

A. G. Mikhailova*, D. E. Petrenko,***, D. M. Karlinsky*, V. V. Britikov****,
E. V. Britikova****, and T. V. Rakitina*,****

Phone: +7 (903) 281-37-03; e-mail: taniarakitina@yahoo.com

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** National Research Center “Kurchatov Institute”, pl. Academica Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

*** Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, 141700 Russia

**** Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Acad. Kuprevichya 5/2, Minsk, 220141 Belarus

Proline- and tryptophan-rich antimicrobial peptides (PR- and TR-AMPs), as well as their antiparasitic analogues, are of interest as alternatives to traditional drugs. Oligopeptidases B (OpdB) are believed to serve as a natural defense mechanism for bacteria and protozoa against PR- and TR-AMPs. This study examines the proteolytic activity of OpdB from *Serratia proteamaculans* (PSP) against model antiparasitic peptides. A quantitative assessment and comparative analysis of the efficiency of PSP-dependent hydrolysis were performed for three types of proteolytic activity: aminopeptidase activity, cleavage of the Arg-Pro bond, and hydrolysis of the Arg(Lys)-Xaa bond, where Xaa is any amino acid residue except Pro. It was established that PSP indeed hydrolyzes the Arg-Pro peptide bond and exhibits aminopeptidase activity. These results confirm the significant role of OpdB in the defense system of bacterial and protozoan cells against PR- and TR-AMPs and emphasize the importance of searching for specific inhibitors of the enzyme.

Keywords: proline- and tryptophan-rich antimicrobial peptides, hydrolysis efficiency, oligopeptidase B, *Serratia proteamaculans*