

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный  
исследовательский центр «Курчатовский институт»**

*На правах рукописи*

Петренко Дмитрий Евгеньевич

Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с  
применением рентгеновских методов

1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат химических наук,  
Ракитина Татьяна Владимировна

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Особенности сериновых протеаз семейства S9.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Подсемейства пролилолигопептидаз .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Эндопептидазы семейства S9A.....	15
1.2.2. Пептидазы семейства S9B .....	20
1.2.3 Ациламиноацилпептидаза семейства S9C.....	24
1.2.4. Глутамилэндопептидаза семейства S9D .....	25
<b>1.3. Многообразие биологических и патофизиологических функций пролилолигопептидаз.....</b>	<b>26</b>
1.3.1. Функциональные аспекты и патогенная роль OpB из паразитических простейших.....	31
<b>1.4. Олигопептидаза В - наименее изученный представитель семейства пролилолигопептидаз .....</b>	<b>36</b>
1.4.1. Структурно-функциональные особенности OpB.....	38
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. ....</b>	<b>44</b>
<b>3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1 Структурные исследования PSP, её мутантов и комплексов методом PCA. ....</b>	<b>58</b>
3.1.1 Поиск условий, способствующих кристаллизации PSP, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. ....	59
3.1.2 Характеристика мутантных вариантов PSP, используемых в рентгеноструктурных экспериментах.....	61
3.1.3. Сравнение кристаллических структур PSPmod и её производных между собой и со структурой PSP-S532A. ....	66
3.1.4 Общая топология белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A. ....	69
3.1.5. Каталитическая триада в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A .....	75

3.1.6. Конформация белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A .....	76
3.1.7 Сравнительный анализ кристаллических структур PSP и PSPmod в комплексе с ингибитором N $\alpha$ -p-тозил-лизилхлорметилкетонем	80
3.1.8. Изучение конформации PSP и PSPmod в растворе, а также роли спермина методом МУРР.....	83
3.1.9 Сравнительный структурный анализ PSP и TbOpB в разных конформациях: стабилизация каталитических триад в закрытой конформации у бактериальных и протозойных OpB.....	85
<b>3.2. Встречаемость консервативного у протозойных OpB солевого мостика (CM1) в бактериальных OpB.....</b>	<b>95</b>
3.2.1 Стабилизация каталитической триады в моделях PSP- и TbOpB-подобных олигопептидаз B, построенных с помощью программы AlphaFold2 .....	99
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>103</b>
<b>СПИСОК ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>104</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- OpB – олигопептидаза B
- POP - пролилолигопептидаза
- LmOpB - олигопептидаза B из *Leishmania major*
- TbOpB - олигопептидаза B из *Trypanosoma brucei*
- PSP - олигопептидаза B из *Serratia proteamaculans*
- МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние
- TEV – вирус гравировки табака
- ТСК - Na-p-тозил-лизилхлорметилкетон
- AIP - антипаин
- МД – молекулярная динамика
- PEP - пролилэндопептидаза
- DPP - дипептидилпептидаза
- AAP - ациламиноацилпептидаза
- ApPEP – пролилэндопептидаза из *Aeromonas punctate*
- PfPEP – пролилэндопептидаза из *Pyrococcus furiosus*
- GmPEP - пролилэндопептидаза из *Galerina marginata*
- GmPOPВ - макроциклаза из *Galerina marginata*
- AbPOPВ - макроциклаза из *Amanita bisporigera*
- FAP - белок активации фибробластов
- ApAAP – ациламиноацилпептидаза из *Aeropyrum pernix*
- CGEP - глутамилэндопептидаза хлоропластов
- ANF - предсердный натрийуретический фактор
- TcOpB - олигопептидаза B из *Trypanosoma cruzi*
- PLC - фосфолипаза C
- IP3 - инозитолтрифосфат
- GPCR - рецептор, сопряженный с G-белком
- РТК - рецепторные тирозинкиназы
- TeOpB - олигопептидаза B из *Trypanosoma evansi*
- DTT - дитиотрейтол
- PMSF - фенилметансульфонилфторид
- СМ – солевой мостик
- ВАРНА - p-нитроанилид Na-бензоил-D,L-аргинина
- ДСН - додецилсульфат натрия
- IPTG - изопропил-β-D-тио-галактозид
- Tris - трис(гидроксиметил)аминометан
- ЭДТА - Na-соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
- DMCO - диметилсульфоксид

ТЕМЕД - тетраметилендиамин

ГФХ - гель-фильтрационная хроматография

ДСН-ПААГ - полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия

КД – круговой дихроизм

ДСФ – дифференциальная сканирующая флуориметрия

СКО – среднеквадратичное отклонение

Sp - спермин

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Олигопептидазы В (OpB) это трипсиноподобные ферменты, относящиеся к сериновым пептидазам из семейства пролилолигопептидаз (POP). Все пептидазы семейства POP состоят из двух доменов: С-концевого  $\alpha/\beta$ -гидролазного каталитического домена и N-концевого регуляторного  $\beta$ -пропеллерного домена. Регуляторный домен препятствует проникновению высокомолекулярных субстратов во внутреннюю полость интерфейса между доменами, где находится каталитическая триада. OpB найдены в бактериях и одноклеточных эукариотах (трипаносомах и лейшманиях). Известно, что OpB являются патогенными факторами при паразитарных и некоторых бактериальных инфекциях. При гибели инфекционных агентов OpB попадают в кровь больных и гидролизуют физиологически-важные пептиды, включая предсердный натрийуретический фактор. Также было установлено, что OpB является фактором резистентности к антимикробным пептидам для многих бактерий. В связи с этим, селективные ингибиторы олигопептидаз востребованы в качестве химической основы для создания новых антипаразитарных и антибактериальных препаратов. Моделирование таких ингибиторов *in silico* основано на знании трёхмерной структуры ферментов-мишеней. Пространственные структуры были получены для OpB из *Leishmania major* (LmOpB) и *Trypanosoma brucei* (TbOpB), тогда как структуры бактериальных OpB отсутствовали. При этом сравнение аминокислотных последовательностей ферментов из бактерий и простейших показывало, что из-за аминокислотных замен механизм каталитической активации, предложенный для TbOpB и LmOpB, не может быть автоматически распространён на все бактериальные ферменты. Для выявления структурных детерминант, регулирующих каталитическую активность бактериальных OpB, требовалось установить пространственные структуры бактериальных ферментов.

### **Цели и задачи**

Целью настоящей работы является изучение структурных особенностей бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP) с применением рентгеноструктурных и вычислительных методов.

При выполнении работы были решены следующие задачи:

1. Получение ферментов дикого типа и мутантных производных для структурных исследований, характеристика мутантных производных, получение комплексов с необратимым ингибитором.

2. Подбор условий кристаллизации, получение кристаллов, их рентгеноструктурный анализ, включая сбор и анализ дифракционных данных, решение и уточнение структур.

3. Структурные исследования PSP, её мутантных производных методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) с целью определения конформации фермента в растворе.

4. Сравнительный анализ основных конформаций бактериальных и протозойных OpB с использованием в качестве модельных белков PSP и OpB из *Trypanosoma brucei* (TbOpB). Сравнение способов стабилизации собранной каталитической триады в закрытой конформации ферментов.

5. Биоинформатический анализ последовательностей бактериальных OpB с целью выявления ферментов, сходных с PSP или TbOpB по способу стабилизации собранной каталитической триады, изучение представленности данных групп в бактериальном царстве.

### **Научная новизна**

Установлено, что полиамины способствуют кристаллизации PSP.

Получены и функционально охарактеризованы мутантные варианты PSP: PSPmod, в которой область первого шарнирного пептида заменена на сайт расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV), и её производные PSPmod-S532A, PSPmod-F75E и PSPmod-E125A, а также мутанты PSP-R151A/E и каталитически неактивный мутант PSP-S532A. Установлено, что модификация шарнирного региона значительно снижает каталитическую эффективность фермента.

Получены комплексы PSP и PSPmod с ковалентным ингибитором N $\alpha$ -птозил-лизилхлорметилкетон (ТСК) и установлено, что модификация шарнирного региона влияет на способ связывания белка и ингибитора.

Получены, депонированы в базу данных PDB, и охарактеризованы первые кристаллические структуры бактериальных OpB и их комплексов с ковалентно-связанным ингибитором ТСК в двух разных конформациях: семь структур представляют промежуточную конформацию фермента, мало описанную в литературе, а одна структура представляет фермент в закрытой (каталитически-активной) конформации.

Методом МУРР установлено, что в растворе PSP и PSPmod существуют преимущественно в открытой конформации, а при добавлении спермина фермент стабилизируется в промежуточной конформации. В случае PSPmod в растворе детектируется небольшая фракция промежуточной конформации.

Сравнение структуры ТСК-связанной PSP в закрытой конформации со структурой антипаин (AIP)-связанной TbOpB в закрытой конформации

позволило установить, что в PSP и TbOpV стабилизация собранной каталитической триады осуществляется разными способами.

Биоинформатический анализ показал, что по способу стабилизации собранной каталитической триады (PSP- и TbOpV-подобному) все бактериальные OpV можно разделить на две основные группы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Получены первые пространственные структуры OpV бактерий в двух разных конформациях, которые могут служить отправными точками для моделирования каталитического цикла бактериальных OpV, получения мутантных белков с изменённой активностью и/или поиска специфических ингибиторов фермента, которые могут быть использованы для создания новых антибактериальных препаратов.

Установлено, что путём модификации шарнирного региона можно подавлять каталитическую активность PSP, что в свою очередь указывает на то, что данный регион фермента может служить мишенью для поиска и/или моделирования ингибиторов OpV и POP (предположительно пептидной природы), способных оказывать терапевтический эффект при протозойных и бактериальных инфекциях.

Подобрана и успешно опробована эффективная комбинация экспериментальных и вычислительных методов структурной биологии, основанная на использовании структурных данных низкого разрешения, полученных в МУРР экспериментах, как для уточнения конформации белка в растворе, так и для валидации структурных моделей, полученных методами молекулярного моделирования и молекулярной динамики (МД).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Присутствие полиамина спермина в кристаллизационном растворе повышает термостабильность PSP и как следствие способствует кристаллизации.

2. Модификация шарнирной области PSP подавляет каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента.

3. В растворе PSP имеет открытую конформацию, присутствие спермина вызывает сближение доменов без сборки каталитической триады, т.е. образование промежуточной конформации, хорошо поддающейся кристаллизации.

4. PSP и PSPmod связывают TCK двумя способами: связывание одной молекулы ингибитора с двумя каталитическими остатками собранной каталитической триады с образованием закрытой конформации и независимое связывание двух молекул ингибитора с каталитическими S и H с сохранением промежуточной конформации фермента.



5. Способ стабилизации собранной каталитической триады в закрытой конформации PSP отличается от такового в протозойных ферментах TbOpB и LmOpB.

6. По способу стабилизации каталитической триады (PSP- и TbOpB-подобный) бактериальные олигопептидазы B можно разделить на две основные группы.

#### **Личный вклад**

Петренко Д.Е. принимал активное участие в планировании и постановке экспериментов, разработке методик, а также в обработке и анализе результатов.

Автором были получены молекулярные модели целевого фермента и изучено их поведение методом молекулярно-динамической симуляции.

Были выявлены функционально-важные заряженные аминокислотные остатки интерфейса между доменами, проведён мутагенез, получены и охарактеризованы мутантные ферменты.

Были подготовлены образцы рекомбинантных белков для рентгеноструктурного анализа.

Автором были найдены условия, способствующие кристаллизации целевого фермента.

Автором были обработаны дифракционные данные, собранные с полученных кристаллов в рентгеноструктурном эксперименте, решены и уточнены пространственные структуры.

#### **Степень достоверности**

Достоверность полученных результатов определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах. Полученные в работе результаты подтверждаются современными исследованиями в данной области.

#### **Апробация результатов**

Содержание работы отражено в 19 публикациях, в том числе – в восьми опубликованных статьях в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, РИНЦ) и в 11 тезисах конференций.

#### **Список публикаций по теме диссертации:**

##### **Статьи в журналах**

1. **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. Crystal Structure of Inhibitor-Bound Bacterial Oligopeptidase B in the Closed State: Similarity and Difference

between Protozoan and Bacterial Enzymes.// *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2286. Scopus, WoS

**2. Petrenko, D.E.;** Timofeev, V.I.; Britikov, V.V.; Britikova, E.V.; Kleymenov, S.Y.; Vlaskina, A.V.; Kuranova, I.P.; Mikhailova, A.G.; Rakitina, T.V. First Crystal Structure of Bacterial Oligopeptidase B in an Intermediate State: The Roles of the Hinge Region Modification and Spermine.// *Biology* 2021, 10, 1021 Scopus, WoS

**3. Петренко Д.Е.,** Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Поиск условий, способствующих кристаллизации олигопептидазы B из *Serratia proteamaculans*, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии // *Кристаллография.* 2020. 65(2). 266-270 Scopus, WoS

**4. Петренко Д.Е.,** Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Дороватовский П.В., Тимофеев В.И., Власкина А.В., Корженевский Д.А., Михайлова А.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В. Кристаллографические исследования мутантных форм и комплексов олигопептидазы B из *Serratia proteamaculans*// *Кристаллография.* 2020. 65(6). 907-913 Scopus, WoS

**5. Timofeev, V.I.;** **Petrenko, D.E.;** Agapova, Y.K.; Vlaskina, A.V.; Karlinsky, D.M.; Mikhailova, A.G.; Kuranova, I.P.; Rakitina, T.V. The Crystal Structure of N $\alpha$ -p-tosyl-lysyl Chloromethylketone-Bound Oligopeptidase B from *Serratia Proteamaculans* Revealed a New Type of Inhibitor Binding. // *Crystals* 2021, 11, 1438. Scopus, WoS

**6. Петренко Д.Е.,** Тимофеев В.И., Карлинский Д.М., Плащинская Д.Д., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Изучение свободной энергии связывания пептидных субстратов в активном центре олигопептидазы B из *Serratia proteamaculans* методом ММ-GBSA // *Кристаллография.* 2022. 67(3). 411-418 Scopus, WoS

**7. Petrenko D.E.,** Mikhailova A.G., Timofeev V.I.; Agapova Yu. K., Karlinsky D.M., Komolov, A.S., Korzhenevskiy D.A., Vlaskina A.V., Rumsh, L.D., Rakitina T.V. Molecular dynamics complemented by site-directed mutagenesis reveals significant difference between the interdomain salt bridge networks stabilizing oligopeptidases B from bacteria and protozoa in their active conformations// *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. 38(16) 4868-4882. Scopus, WoS

**8. 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. Elucidation of the Conformational Transition of Oligopeptidase B by an Integrative Approach Based on the Combination of X-ray, SAXS, and Essential Dynamics Sampling Simulation. // *Crystals* 2022, 12, 712. Scopus, WoS

### **Тезисы докладов на конференциях**

**1. Petrenko D.E.;** Timofeev V.I.; Mikhailova A.G.; Rakitina T.V. Binding of double-positively charged substrates by *Serratia proteamaculans* oligopeptidase B studied by means of molecular dynamics // the 44th FEBS Congress “From molecules to living systems”, Польша, г. Краков, 2019;

2. Корженевский Д.А., **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Агапова Ю.К., Власкина А.В., Дороватовский П.А., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Структурные исследования олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* // IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи-Дагомыс, 2019

3. **Петренко Д.Е.**, Николаева А.Ю., Лазаренко В.А., Тимофеев В.И. Получение первой пространственной структуры бактериальной олигопептидазы В // XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа, Москва, 2019;

4. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Пространственная структура олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* – первая структура бактериальной олигопептидазы В // 63-ья Всероссийская научная конференция МФТИ, г. Долгопрудный, 2020;

5. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Кристаллографические исследования мутантных форм и комплексов олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* // XXXIII Зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, Москва, 2021.

6. **Петренко Д.Е.**, Бритиков В.В., Бритикова Е.В., Тимофеев В.И. , Михайлова А.Г. , Ракитина Т.В. Обратное моделирование конформационного перехода олигопептидазы В с помощью комбинации классической молекулярной динамики с методом главных компонент. XXIX Российская конференция по электронной микроскопии. 2022, онлайн.

7. **Петренко Д.Е.**, Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Модификация шарнирной области олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* подавляет каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента. XXXV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2022, Москва.

8. Bershatsky Y., Britikov V., Timofeev V., **Petrenko D.**, Britikova E., Vocharov E., Mikhailova A.G., Rakitina T. Application of X-Ray, SAXS and essential dynamics simulations to study conformational transitions of oligopeptidase B. Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2022), Новосибирск, 2022 г.

9. **Д.Е. Петренко**, В.И. Тимофеев, А.Г. Михайлова, Т.В. Ракитина. Структурно-функциональный анализ модифицированной олигопептидазы В из бактерий *Serratia Proteamaculans*: роль шарнирной области и спермина в конформационной динамике и кристаллизации. 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ, 2021, Москва-Долгопрудный-Жуковский

10. **Петренко Д.Е.**, Агапова Ю.К., Тимофеев В.И., Михайлова А.Г., Ракитина Т.В. Кристаллическая структура связанной с ингибитором Бактериальной олигопептидазы В в закрытом состоянии: сходство и различие ферментов простейших и бактерий. XXXV зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН, 2023, Москва

11. **Петренко Д.Е.**, Агапова Ю.К. , Тимофеев В.И. , Карлинский Д.М., Ракитина Т.В. Сравнение закрытых конформаций бактериальных и протозойных олигопептидаз В. 65-ая Всероссийская научная конференция МФТИ. 2023, Москва

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 116 страницах и содержит 36 рисунков, 14 таблиц и 242 источника литературы. Структура изложения включает введение, обзор литературы, материалы и методы, обсуждение результатов, выводы, список сокращений и условных обозначений и список литературы.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Особенности сериновых протеаз семейства S9

Протеазы или протеиназы (включая пептидазы) — это ферменты, гидролизующие пептидную связь. Протеазы, содержащие в каталитическом центре серин, называют сериновыми протеазами, по классификации базы данных MEROPS они имеют букву S в названии семейства [1]. Например, пролилполигопептидазы семейства S9 имеют каталитическую триаду Ser-Asp-His, расположенную в С-концевой части белка; каталитический Ser находится в составе мотива Gly-X-Ser-X-Gly

Как следует из его названия, основу семейства S9 составляют POP, расщепляющие пептидную связь после остатка пролина. В семейство S9 собраны ферменты, имеющие достаточно широкий диапазон субстратной специфичности, которые гидролизуют пептидные связи как внутри полипептидной цепи (эндопептидазы), так и отщепляя одну или несколько аминокислот с N- или С-конца полипептидной цепи (экзопептидазы). Экзопептидазы, которые высвобождают одиночный аминокислотный остаток с N-конца полипептида, называют аминопептидазами, дипептид или трипептид - дипептидилпептидазами и трипептидил-пептидазами соответственно. Если расщепление происходит на С-конце и высвобождается одиночный аминокислотный остаток, то такие ферменты называют карбоксипептидазами или пептидилдипептидазами, если отщепляется дипептид. На основании субстратной специфичности и аминокислотного мотива, окружающего каталитический серин, семейство S9 делится на несколько подсемейств (таблица 1) [2].

OpB и пролилполигопептидазы, также называемые пролилэндопептидазами (PEP), составляют подсемейство S9A. Первым охарактеризованным представителем данного семейства является PEP из мозга свиньи [3]. Обычно эти ферменты гидролизуют олигопептиды размером менее 30 аминокислот [4]. Ферменты семейства S9A являются цитозольными эндопептидазами, встречающимися у бактерий, архей и эукариот, которые расщепляют пептидные связи на карбоксильной стороне основных аминокислотных остатков (OpB) и пролина (POP).

Мембранносвязанные дипептидилпептидазы (DPP), обнаруженные только у эукариот, составляют подсемейство S9B. Они обладают специфичностью к пролину и отщепляют ди- или трипептиды с N-конца олигопептидов. Типичным представителем семейства S9B является дипептидилпептидаза IV из *Stenotrophomonas maltophilia* (PDB ID: 2ECF)[5]

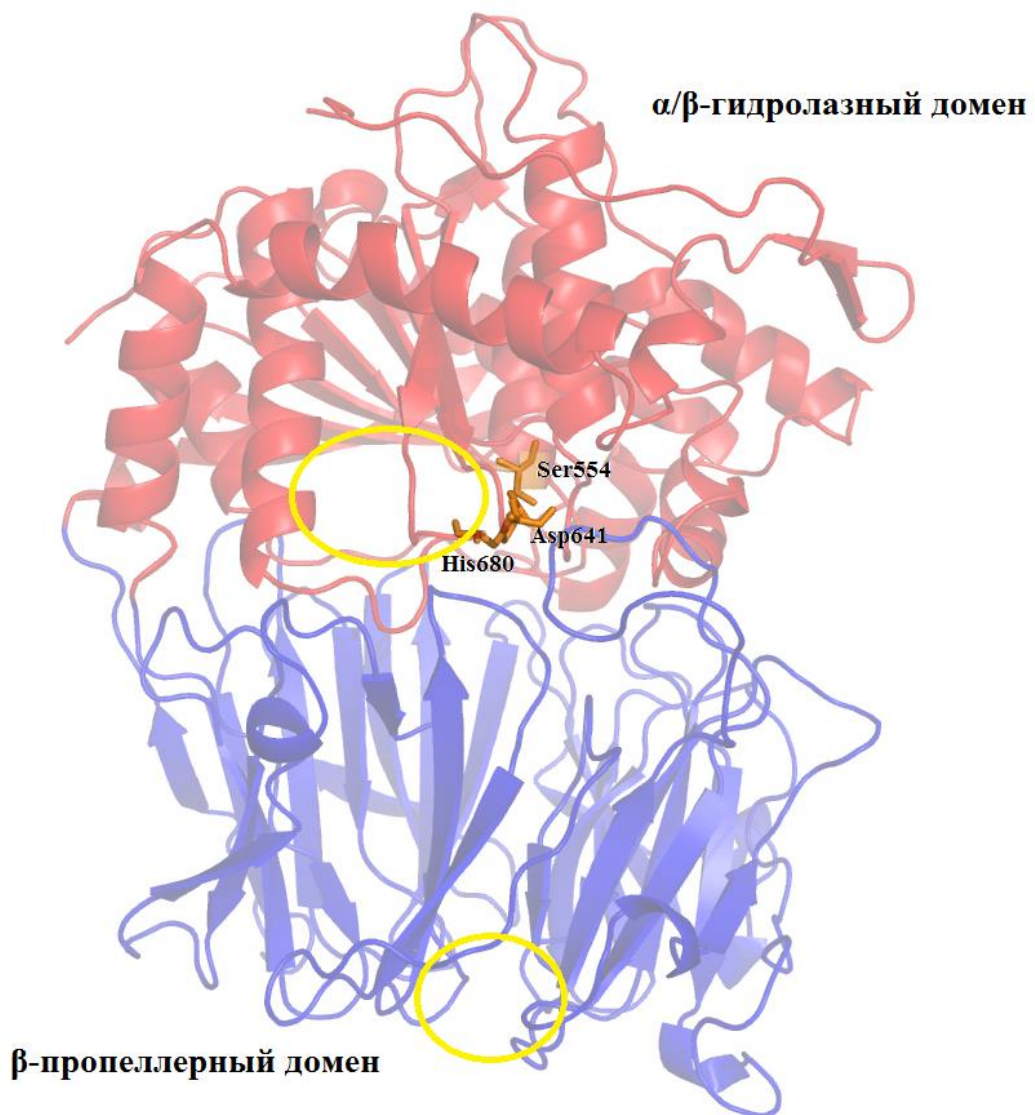
Ациламиноацилпептидазы (AAP), обнаруженные у бактерий, архей и эукариот, составляют подсемейство S9C. Типичным представителем семейства S9B является фермент из *Aeropyrum pernix* (PDB ID: 3O4G, 3O4H, 3O4I и 3O4J [6]). Ферменты этого подсемейства удаляют N-ацетилированный пролин с N-конца олигопептидов. По составу мотива, окружающего каталитический серин, к данному подсемейству также причисляют дипептидилпептидазы V и карбоксипептидазу из *Deinococcus radiodurans* (PDB ID: 5YZM, 6IGQ, и 6IGP [4]).

Недавно, было выявлено подсемейство S9D, обнаруженное у бактерий и у фотосинтезирующих эукариот. Помимо эндопептидазной активности, для этих ферментов характерно автокаталитическое отщепление C-концевого остатка [7].

**Таблица 1.** Классификация сериновых протеаз семейства S9

Семейство	Мотив каталитического Ser	Фермент	Субстратная специфичность	Активность
S9A	GGSXGG	Пролилолигопептидаза или пролилэндопептидаза (POP или PEP)	XXXR*XXXX	Эндопептидазная
		Олигопептидаза B (OpB)	XXR/K*XXXX	Эндопептидазная
S9B	GWSYGG	Дипептидилпептидаза IV (DPP IV)	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -XR*XXXX	Дипептидилпептидазная
		Трипептидилпептидаза	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -XXR*XXXX	Трипептидилпептидазная
S9C	GGSYGG	Ациламиноацилпептидаза	F/A*XXXX	Ациламиноацилпептидазная
		Дипептидилпептидаза V	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -XA*XXXX	Дипептидилпептидазная
		Карбоксипептидаза	XXXXA*X-COO <sup>-</sup>	Карбоксипептидазная
S9D	GGHSYGA	Глутамилпептидаза	A[S/T]GGG[N/G]PE	Эндо- и экзопептидазная

Аминокислотные последовательности пролилолигопептидаз из разных подсемейств (и даже в пределах одного подсемейства) имеют относительно низкую гомологию, в то же время их пространственные структуры имеют единую топологию, отличительной особенностью которой является наличие N-концевого β-пропеллерного домена, препятствующего проникновению в активный центр объемных глобулярных белков, и каталитического домена, расположенного в C-концевой части молекулы (рисунок 1) [3,4].



**Рисунок 1.** Структура POP из *Sus scrofa* (PDB ID: 1QFM) [3]. Остатки, составляющие каталитическую триаду, отмечены и подписаны. Желтыми кругами отмечены доступные растворителю полости, через которые возможен доступ субстрата к активному центру.

Таким образом, можно заключить, что от классических сериновых протеаз ферменты семейства S9 отличаются, в первую очередь, размером (80 кДа) и двух-доменной структурой, которая образует систему селекции размера субстратов. [4].

## 1.2 Подсемейства пролилолигопептидаз

### 1.2.1 Эндопептидазы семейства S9A

Пролилэндопептидазы семейства S9A (EC 3.4.21.26) стали родоначальниками всего семейства POP, поэтому имеют аналогичное название (POP), другое название – пролилэндопептидазы (PEP) [3]. Эти

ферменты широко распространены в природе и были выделены и/или клонированы из разных источников, включая бактерии, например, *Flavobacterium meningosepticum* [8,9] и *Aeromonas hydrophila* [10], археи, например, *Pyrococcus furiosus* [11,12], эукариотические источники, включая млекопитающих: мозг и мышцы свиньи [13,14], мышшь [15], мозг быка [16], лимфоциты человека [17], а также насекомых, например, *Sarcophaga peregrina* [18].

В 1991 году в работе [14] был разработан метод выделения POP из мышечной ткани свиньи. Кинетические исследования этого фермента показали, что лимитирующей стадией катализа являются конформационные изменения, а не химическая стадия, что характерно для классических сериновых протеаз трипсинового типа [17].

Первая кристаллическая структура POP (PDB ID: 1QFS и PDB ID: 1QFM) была получена для фермента из мышц свиньи в 1998 году с разрешением 1,4 Å (рисунок 1) [3]. Эта структура позволила описать двухдоменную укладку полипептидной цепи, характерную для всего семейства POP. Эта укладка, как уже отмечалось, включает С-концевой  $\alpha/\beta$ -гидролазный каталитический домен и N-концевой 7-лопастный  $\beta$ -пропеллерный домен, препятствующий проникновению объёмных субстратов к каталитической триаде, локализованной во внутренней полости между доменами [3,19].

Анализ активного центра показал, что порядок остатков каталитической триады отличается от характерного для трипсина и субтилизина, и похож на тот, который наблюдается в ферментах, содержащих  $\alpha/\beta$  гидролазную укладку [20]. Каталитический Ser554 находится на пике очень острого изгиба полипептидной цепи, называемого нуклеофильным изгибом, который характерен для гидролаз типа  $\alpha/\beta$  [20]. Следовательно, ОН-группа серина хорошо открыта и легкодоступна для имидазольной группы каталитического His680 с одной стороны, и для субстрата, с другой. Один из атомов кислорода карбоксильной группы каталитического Asp641 находится в плоскости имидазольного кольца His680, обеспечивая идеальное положение для образования водородной связи. Однако, ЯМР исследования показали, что в POP водородная связь между каталитическими Asp и His должна быть слабее, чем в трипсине или химотрипсине [21]. Другой атом кислорода карбоксильной группы Asp641 координирован NH-группами основной цепи остатков Arg643 и Val644.

Последующие структурные исследования бактериальных PER показали, что шарнирная область, которая связывает два домена между собой, обеспечивает переход фермента между открытым и закрытым

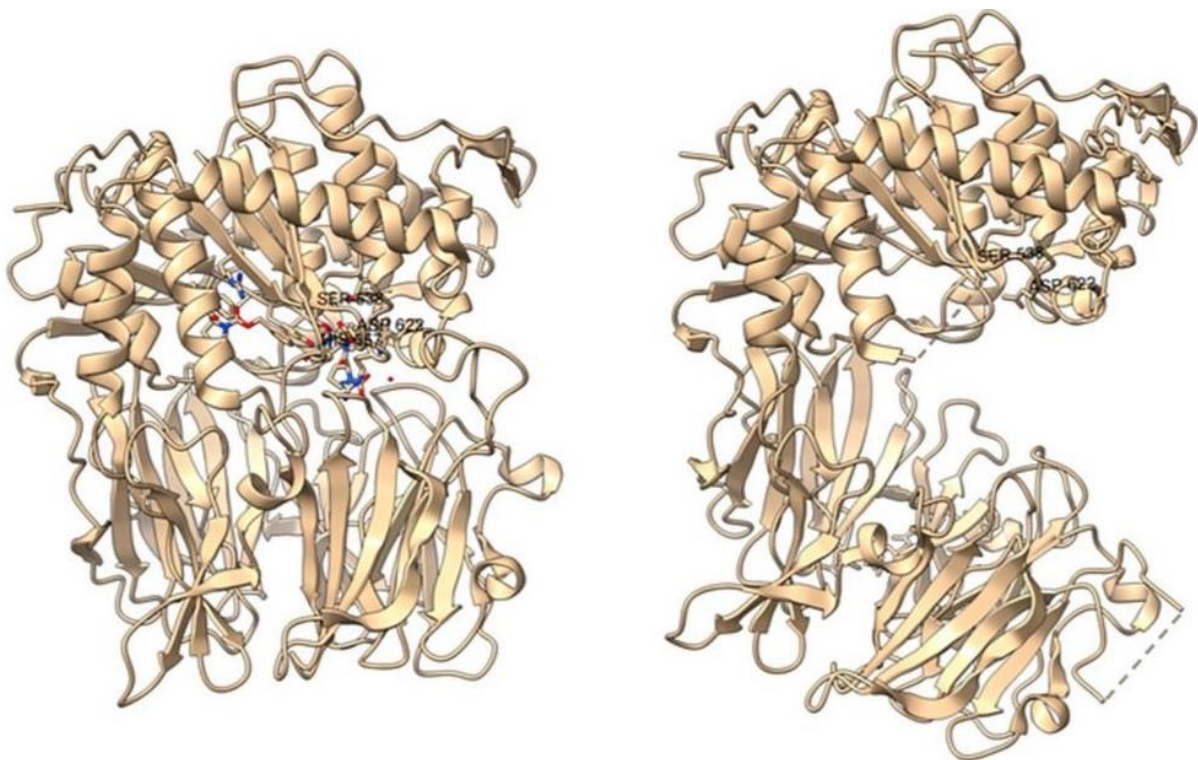


конформационными состояниями (рисунок 2) [22,23]. В закрытой (активной) конформации домены и остатки каталитической триады расположены близко друг к другу, что позволяет протекать катализу. В открытом (неактивном) состоянии домены и остатки каталитической триады пространственно разобщены, что облегчает проникновение субстрата в полость между доменами, где находится активный центр. Открытая конформация была обнаружена в кристаллах свободной PEP из *Sphingomonas capsulate* (PDB ID: 1YR2), закрытая - в кристаллах PEP из *Mucococcus xanthus* в комплексе с ингибитором (PDB ID: 2BKL) [22]. В случае PEP из *Aeromonas punctate* (ArPEP) нативный фермент кристаллизовался в открытой конформации; тогда как добавление субстрата к предварительно сформированным кристаллам вызвал переход в закрытую конформацию, а ингибирование этого перехода предотвращало связывание субстрата [30]. В результате было высказано предположение, что POP связывают субстрат, используя механизм индуцированного соответствия, согласно которому конформационные изменения могут быть индуцированы добавлением субстрата или ингибитора [23]. В открытом состоянии даже большой субстрат (более чем 30 остатков) может проникать в активный центр, но не расщепляется, поскольку каталитические остатки не находятся в активной конформации. Сборка каталитической триады модулируется механизмом “защелкивающейся петли”, так как при переходе из открытого состояния в закрытое, благодаря движению гибкой петли, каталитический His перемещается с периферии фермента в область активного центра, где он встраивается между каталитическими Ser и Asp.

Позднее, при структурных исследованиях архейной PEP из *Pyrococcus furiosus* (PfPEP) была обнаружена третья конформация POP, названная промежуточной [24,25]. В этой конформации расстояние между доменами чуть больше, чем в закрытой, но значительно меньше, чем в открытой конформации, при этом положение петли, содержащей каталитический гистидин, сходно с положением петли в структурах с открытой конформацией, то есть каталитическая триада разобрана. Данная конформация также наблюдалась в одной из структур каталитически-неактивного мутанта макроциклазы из *Galerina marginata* (GmPEP) в комплексе с субстратом макроциклизации [26].

В кристаллических структурах как свободных, так и связанных с субстратом/ингибитором POP млекопитающих (свиньи и человека) были обнаружены только закрытые конформации [3,27,28]. Поэтому предполагалось, что субстрат попадает к активному центру через боковое отверстие между гибкими петлями, расположенное на стыке доменов [29,30]

или через отверстие центрального канала  $\beta$ -пропеллера [31,32] (рисунок 1). В то же время, в работе [33] на основании биоинформатических и молекулярно-динамических исследований POP из *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* и *Sus scrofa* было высказано предположение о наличии у POP млекопитающих конформационных переходов, аналогичных таковым у бактериальных POP. При этом существование конформационных переходов в POP млекопитающих было подтверждено с помощью ЯМР [34]; а их важность для каталитического цикла – в экспериментах по искусственному созданию междоменных дисульфидных связей [35]. Электронная микроскопия PEP человека показала, что молекула фермента содержит боковое отверстие, отличающееся от того, которое наблюдали в кристаллах, что возможно связано, с тем, что конформация белка, наблюдаемая в кристаллах POP млекопитающих, не является единственно возможной [36].



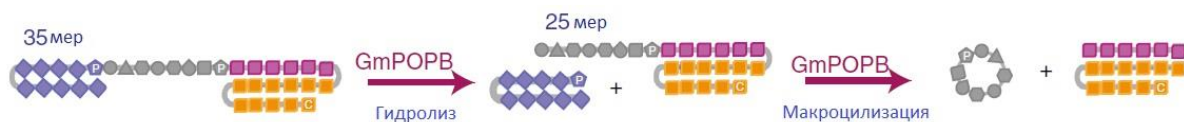
**Рисунок 2.** Кристаллические структуры АрРЕР. Слева: закрытая конформация АрРЕР с ингибитором ZPP (PDB ID: 3IVM), справа открытая конформация АрРЕР дикого типа (PDB ID: 3IUL). В закрытой конформации, показана собранная каталитическая триада (Ser538, Asp622, His657). В открытой конформации, пунктиром показаны петли, включая петлю каталитического His657, которые не удалось разрешить

К семейству S9A также относятся олигопептидазы В (OpB, EC 3.4.21.83), которые в отличие от остальных ферментов семейства обладают трипсиноподобной субстратной специфичностью. OpB были найдены только в простейших паразитических одноклеточных эукариотах и бактериях, хотя

гены *OrV* были также идентифицированы у отдельных представителей высших растений и клещей. Подробному описанию этой группы будет посвящена отдельная глава.

### 1.2.1.1. Макроциклазы

В отдельную подгруппу семейства S9A могут быть выделены макроциклазы. Эти ферменты описаны у *Aspergillus niger* [37], *Flammulina velutipes* [38], *Aspergillus oryzae* [39], *Omphalotus olearius* [40] и др. Макроциклазы катализируют образование циклического пептида, с отщеплением С-концевого и N-концевого фрагментов (рисунок 3). Такие кольцевые молекулы обладают значительно большей проницаемостью через клеточные мембраны, чем линейные полипептиды и представляют большой интерес для фармакологии.



**Рисунок 3.** Схема реакции образования макроцикла ферментом GmPOPВ

У *Amanita bisporigera* и *Galerina marginata* есть по два POP-гена, известных как POPA и POPB [41]. Гены POPA присутствуют у всех видов мухоморов *Amanita* и, а также у других мухоморов. POPA является типичным представителем PER; он может расщеплять 25-мерный, но не 35-мерный субстрат и не катализирует циклизацию. [26,42].

Гены POPB присутствуют только у видов *G. marginata* (GmPOPВ S09.077, PDB: 5N4F [26]) и *A. bisporigera* (AbPOPВ), продуцирующих аматоксины (группу циклических пептидов, являющихся сильнейшими гепатотоксинами, летальная доза для взрослого человека составляет <10 мг [43]). Исследования рекомбинантных белков позволили предположить, что POPB участвует в биосинтезе аматоксина  $\alpha$ -аманитина.  $\alpha$ -аманитин синтезируется рибосомой в виде 35-аминокислотного пропептида. Аминокислоты зрелых токсинов расположены внутри пропептидов между двумя консервативными остатками Pro. Пептиды-предшественники расщепляются и макроциклизируются в 7-10 членные аминокислотные циклические пептиды, макроциклазами, например, GmPOPВ которая отщепляет 8-ми членный пептид IWGIGC(N/D)P.

Энзимологическая основа макроциклизации была выявлена и у других видов, например, у растений *Saponaria vaccaria* (тысячеголовник) [44]. В этом случае, для циклизации необходима протеаза, которая отщепляет

консервативный остаток Asn в предшественнике циклического пептида. Циклизация катализируется ферментом PCY1, который, подобно POPB, является членом семейства сериновых протеаз S9 [44].

Две системы макроциклизации имеют сходства и различия. Одним из общих признаков является то, что пептиды-предшественники имеют аминокислоты-лидеры и последовательности, которые участвуют в циклизации. Вторым общим признаком является то, что процессинг пропептидов, в которых участвуют POPB и PCY1 требует двух протеолитических реакций для перехода от первичных продуктов трансляции к конечному циклическому пептидному продукту. Однако в случае PCY1 два отдельных фермента катализируют две протеолитические реакции, тогда как POPB катализирует обе стадии в биосинтезе  $\alpha$ -аманитина.

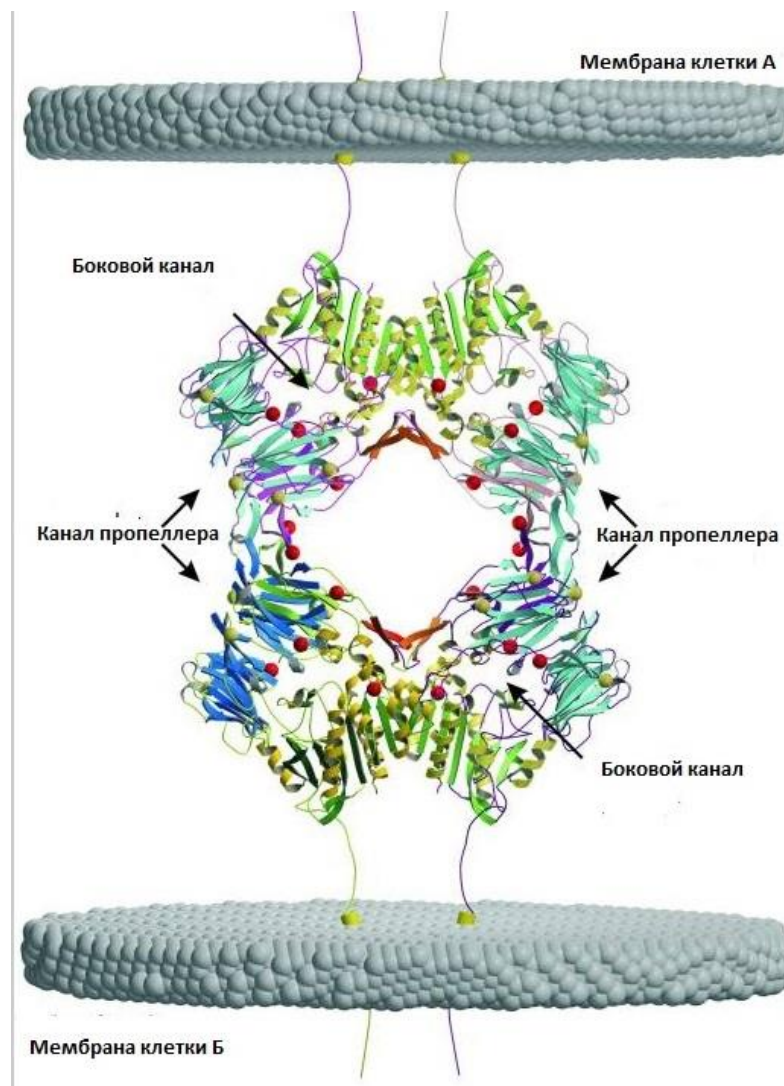
## 1.2.2. Пептидазы семейства S9B

### 1.2.2.1. Дипептидилпептидаза DPP IV

Дипептидилпептидаза IV (DPP-IV/CD26, EC 3.4.14.5) - мембранный фермент, который изначально был охарактеризован как дифференцировочный антиген активации Т-клеток (CD26)[45]. В отличие от ферментов семейства S9A, DPP- IV представляет собой трансмембранный белок, состоящий из короткого цитоплазматического и трансмембранного доменов, а также преобладающего С-концевого внеклеточного домена (остатки 40-766), имеющего типичную пролилолигопептидазную топологию и содержащего активный центр, участок, богатый цистеином и гликозилированную область [5]. Таким образом, DPP IV представляет собой экзопептидазу, гликопротеин и эктоэнзим, связанный с клеточной мембраной. Она отщепляет дипептиды с предпоследним пролином, реже - аланином, с N -конца олигопептидов [25,46]. DPP-IV участвует в гидролизе различных субстратов, включая нейропептиды, хемокины и пептиды семейства глюкагонов.

На поверхности клетки DPP IV образует тетрамер, который по стерическим соображениям включает мембранносвязанную и растворимую пару димеров DPP IV, или пару димеров, расположенных на поверхности двух разных клеток, как показано на рисунке 5. Взаимодействие с клеточной мембраной опосредовано трансмембранным доменом из 8 аминокислотных остатков [47]. Таким образом, DPP IV функционирует как коммуникационная межклеточная молекула, которая вовлечена в межклеточные контакты путем тетрамеризации двух димеров DPP IV, присутствующих на поверхностях

взаимодействующих клеток. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные о нарушении межклеточных взаимодействий при добавлении свободного DPP IV к клеткам [48].



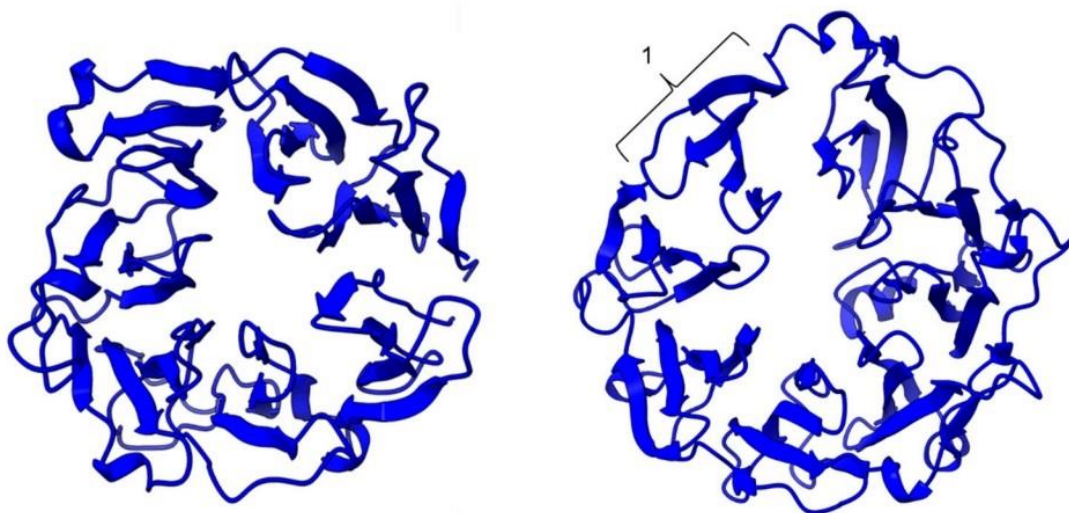
**Рисунок 5.** Тетрамеризация DPP IV. Тетрамер включает пару димеров, расположенных на поверхности двух разных клеток [48]

В отличие от описанной выше структуры POP,  $\beta$ -пропеллер DPP-IV человека (S09.003) содержит не семь, а восемь лопастей (рисунок 6) [49]. Предполагается, что дополнительная лопасть в структуре DPP-IV участвует в транспорте субстрата в каталитический центр [49]. По сравнению с  $\beta$ -пропеллерными доменами, каталитические  $\alpha/\beta$ -гидролазные домены у POP и DPP-IV, в основном, являются консервативными [46,50].

Как уже говорилось выше, DPP-IV найдены только у эукариот. В частности, у человека DPP-IV широко экспрессируется в большинстве тканей и клеток и является ключевым метаболическим ферментом при диабете II типа, который активно исследуется как фармакологическая мишень [51]



(смотри также главу 1.3). В связи с этим на настоящий момент получены многочисленные кристаллические структуры как для свободной DPP-IV человека, так и для её комплексов с ковалентно-связанными ингибиторами (PDB ID: 1NU6 [27] 5Y7K [52]). Во всех кристаллических структурах фермент был в закрытой конформации.



**Рисунок 6.** Сравнение структуры  $\beta$ -пропеллерного домена POP свиньи (PDB ID: 1QFM [3], (слева) и человеческой DPP-IV (PDB ID: 1J2E [49], (справа)); дополнительная лопасть отмечена цифрой 1

#### 1.2.2.2. Белок активации фибробластов FAP

Белок активации фибробластов (fibroblast activation protein (FAP), сепсаза) - это антиплазмин, расщепляющий фермент (S09.007, UniProt: Q12884, PDB\_ID: 1Z68) [53]. Он представляет собой мембраносвязанный гликопротеин II типа, обладающий дипептидилпептидазной и эндопептидазной активностью и имеющий 52% идентичности первичной структуры с DPP-IV [54]. Белок FAP состоит из 760 аминокислот и включает короткий внутриклеточный домен (6 аминокислот), трансмембранный домен (20 аминокислот) и обширный внеклеточный домен (734 аминокислоты). Как дипептидилпептидазная, так и эндопептидазная активность FAP определяются каталитической триадой, состоящей из серина (S624), аспартата (D702) и гистидина (H734), и требуют гомодимеризации белка [55]. Эндопептидазная активность проявляется в способности расщеплять  $\alpha$ 2-антиплазмин, желатин и денатурированный коллаген I типа [56,57].

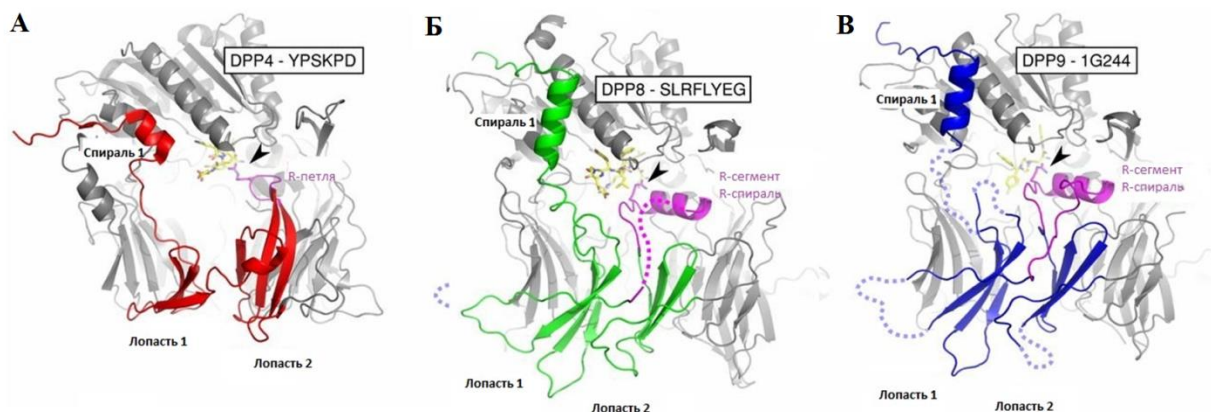
#### 1.2.2.3. Дипептидилпептидазы DPP8 и DPP9

Известными внутриклеточными представителями семейства S9B являются DPP8 (S09.018, UniProt: Q6V1X1) и DPP9 (S09.019, UniProt:

Q86T12). Оба фермента локализируются в цитозоле и ядре, а также ассоциируются с плазматической мембраной [58]. DPP8 и DPP9 имеют 58% гомологии и 72% гомологии во фрагменте из 200 аминокислот, содержащем предполагаемую каталитическую область [59]. DPP9 более распространен, чем DPP8, и уменьшение её количества приводит к резкому снижению способности клеток перерабатывать пролин-содержащие пептиды [60]. В дополнение к пептидам, в качестве субстратов DPP9 были идентифицированы несколько белков [61]. К ним относится тирозинкиназа Syk - центральная киназа в сигнальном пути, опосредованном В-клеточными рецепторами. Ранее было показано, что процессинг N-конца Syk с помощью DPP9 приводит к деградации Syk [62], что, вероятно, связывает DPP9 с убиквитин-протеасомной системой [63]. DPP9 имеет критическое значение для выживания новорожденных [64] и играет важную роль в иммунном ответе [65]. Методом pull-down показано взаимодействие DPP8/9 с малым убиквитин-подобным белком, который предположительно выступает в роли аллостерического регулятора DPP9 [66]. Нарушение регуляции DPP9 связано с патофизиологическими состояниями, например онкогенезом [67].

Структуры DPP8 (PDB: 6E0O) и DPP9 (PDB: 6E0Q) были получены относительно недавно. Установлено, что  $\alpha/\beta$ -гидролазный домен также, как и в случае DPP-IV, является высоко консервативным, тогда как область  $\beta$ -пропеллера демонстрирует ряд различий (рисунок 6) [68]. В то время как лопасти пропеллера в DPP-IV неизменно четырехцепочечные, количество нитей в лопастях у DPP8 и DPP9 варьирует. Средняя длина  $\beta$ -цепи шесть и восемь остатков для DPP-IV и DPP8/9, соответственно. Лопастей 4 и 5 в DPP8/9 длиннее и содержат до 13 остатков. В DPP8/9 лопасть 4 образует спиральный виток, содержащий E275/248 и E276/249, предположительно являющиеся первичными сайтами связывания субстрата. Лопастей 4 и 5 плотно уложены и переплетены, между ними находится трехоборотная спираль, отсутствующая в DPP-IV. Эта спираль блокирует поверхность, которая в DPP-IV является консенсусной областью связывания аденозиндезаминазы.

Критически важный для связывания субстрата остаток R125 в  $\beta$ -пропеллере DPP-IV расположен в петле второй лопасти, называемой R-петлей (рисунок 7). Соответствующую структурную и функциональную роль в DPP8/9 играют остатки R160/R133, которые расположены в другой области пропеллера, а именно в петле между лопастями 1 и 2 (DPP8: 137-165; DPP9: 110-138), называемой R-сегментом. При связывании с субстратом, часть R-сегмента сворачивается в R-спираль, содержащую остаток аргинина на C-конце [68]



**Рисунок 7.** Сравнение структур DPP4V (А), DPP8 (Б), DPP9 (В) [68]. Все ферменты были закристаллизованы в связанной с лигандами форме. Цветом выделены области  $\beta$ -пропеллера, описанные в тексте.

### 1.2.3 Ациламиноацилпептидаза семейства S9C

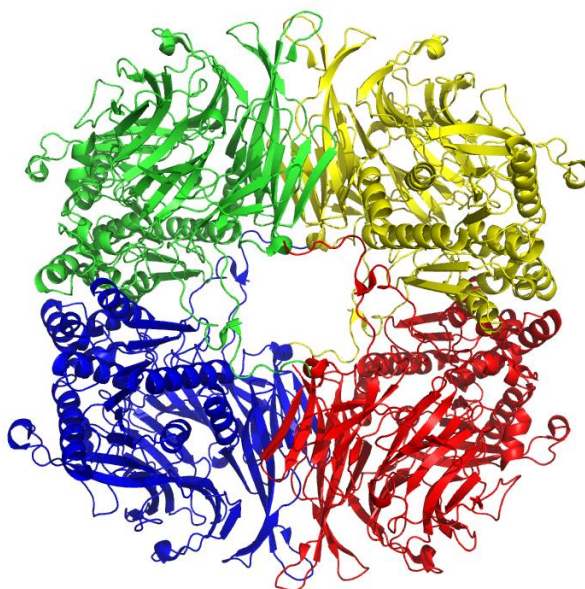
Ациламиноацилпептидаза (AAP, UniProt: P13798, EC 3.4.19.1, S09.004) альтернативное название – ацилпептидгидролаза (АСРН) – катализирует удаление ацилированной аминокислоты с N-конца пептида. Продуктами реакции являются ациламинная кислота и пептид со свободным N-концом, укороченным на одну аминокислоту. Фермент действует на множество пептидов с различными N-концевыми ацильными группами, включая ацетил, хлорацетил, формил и карбамил [69]. Данные ферменты встречаются практически повсеместно. Наиболее хорошо исследованы AAP из эритроцитов человека [70], а также из печени мыши [71] и крупного рогатого скота [72]. Фермент также был охарактеризован у растений, где было показано, что он имеет сходный состав с ферментом млекопитающих, а также сопоставимую реакцию на ингибиторы [73].

Структурные исследования показали, что AAP являются тетрамерами с молекулярной массой около 300 кДа (рисунок 8) [74], а также что мультимеризация AAP играет роль в селекции субстратов [75]. В AAP млекопитающих наиболее важным центром взаимодействия между мономерами является внешний элемент 8-нитевого  $\beta$ -слоя, образующего ядро каталитического домена [76].

В работах по исследованию AAP из археи *Aeropyrum pernix* (ApAAP) было показано, что в дополнение к каталитической триаде несколько остатков, включая остатки, расположенные вне каталитического домена, способствуют каталитической активации [77]. Это остаток Glu88 пропеллерного домена, который нейтрализует заряд и создает термодинамически стабильный междоменный солевой мостик с Arg526, выполняющим ключевую роль при связывании субстрата [77]. Роль данного



солевого мостика в стабилизации каталитической триады в закрытой конформации POP будет обсуждаться отдельно. Кроме того, структурные исследования АрААР [6,78] показали, что, в отличие от POP, мономеры АрААР в составе тетрамера могут принимать открытую или закрытую конформацию независимо друг от друга. При этом было установлено, что открытая конформация АрААР действительно функционально неактивна. Было постулировано, что в АрААР существуют различные механизмы попадания субстратов разной длины и структурной сложности к активному центру. Субстраты, которые достаточно малы и могут пройти через канал внутри  $\beta$ -пропеллера, напрямую попадают к полностью функциональному активному сайту закрытой конформации. Более крупные субстраты могут проникать к доступной, но каталитически неактивной триаде в открытой конформации, после чего происходит переход фермента в закрытую конформацию [6,78].



**Рисунок 8.** Структура тетрамера APP из *Sus scrofa* (PDB ID: 7QUN). [74]

#### 1.2.4. Глутамилэндопептидаза семейства S9D

Глутамилэндопептидаза хлоропластов (CGEP, AT2G47390) – это белок с молекулярной массой 97 кДа, который является одной из растительных пептидаз, недавно выделенных из стромы хлоропласта *Arabidopsis thaliana* [7,79]. CGEP был отнесен к подсемейству пептидаз S9D и проявляет как эндо-, так и экзопептидазную активность. CGEP обнаружены у бактерий и фотосинтезирующих эукариот (где они, скорее всего, ограничены пластидами). Кристаллические структуры белков семейства S9D на

настоящий момент не получены, что затрудняет уточнение особенностей каталитического механизма. Характеристика CGEP *A. thaliana* и мутантного варианта (CGEP-C2) показала, что ферменты образуют множество олигомерных состояний (гексамер, тетрамер, тример и димер). Олигомерные состояния CGEP, вероятно, находятся в равновесии, зависящем от концентрации белка.

Эксперименты *in vitro* показали, что для CGEP характерен автокаталитический процессинг С-концевой области, в результате которого облегчается доступ субстрата к каталитическому центру фермента. Было показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* в CGEP автокаталитическое расщепление происходит после E946, с удалением 15 остатков с С-конца. Консервативный мотив (A[S/T]GG[N/G]PE946) непосредственно перед E946 был идентифицирован у двудольных, но не у однодольных растений. Интересно, что гомологи CGEP у фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих бактерий не имеют С-концевой последовательности, что позволяет предположить, что процессинг С-конца - эволюционно-поздняя адаптация у растений [7,79,80].

### **1.3. Многообразие биологических и патофизиологических функций пролилолигопептидаз**

Белки с высоким содержанием пролина и пролинсодержащих пептидов играют важную роль в процессах метаболизма, клеточного распознавания и внутриклеточной передачи сигналов [81]. Многие структурные и запасующие белки и пептиды содержат пролин, и физиологическая потребность в белках с высоким содержанием пролина сохраняется на протяжении всей жизни человека и животных [82]. В частности, проламины, основные белки-накопители зерновых культур и семян злаковых, являются важными представителями богатых пролином белков, которые содержат до 30% остатков пролина [83]. Коллагены являются еще одним ярким примером белков с высоким содержанием пролина и являются основой соединительной ткани, обеспечивая её прочность и эластичность. Остатки пролина и гидроксипролина в избытке представлены в коллагенах и составляют до 25% их последовательности [84].

Среди двадцати природных протеиногенных аминокислот пролин является единственной иминокислотой. Особенность его состоит в том, что пролин не имеет свободного атома водорода, необходимого для образования водородной связи с кислородом карбонильного остатка основной цепи остатка субстрат-связывающего центра [3]. Находясь внутри полипептидной

цепи, пролин формирует такую ее конформацию, которая препятствует деградации богатых пролином белков пептидазами широкого спектра действия - химотрипсином и субтилизином. В природе гидролиз пролинсодержащих белков (к каковым относятся, например, проламины (10-30% пролина), глютелины (12-16%), альбумины (7%)) осуществляется преимущественно особой группой протеолитических ферментов пролин-специфичных протеаз и пептидаз [85,86]. К данной группе как раз и относятся POP, практический интерес к которым связан с их потенциально возможным применением для производства продуктов без глютена. Большое количество белков однодольных растений имеет высокое содержание пролина (более 30%) - это так называемые белки глютена (в частности, проламины). Образующиеся из них при неполном переваривании богатые пролином пептиды, вызывают у чувствительных людей аутоиммунную целиакию. Использование коммерчески доступных POP из различных источников для нейтрализации иммуногенного потенциала богатых пролином пептидов глютена выглядит многообещающе для таких пациентов [84].

Помимо их очевидной метаболической роли, POP участвуют в регуляции различных биологических функций путём поддержания уровня (и активности) широкого спектра биологически активных пептидов. Причём, даже один и тот же представитель POP может обладать противоположными биологическими функциями в зависимости от таких факторов, как тип клеток, регуляция и микросреда [84]. Например, DPP IV и FAP были идентифицированы и как раковые маркеры и потенциальные терапевтические мишени, и как пептидазы с противоопухолевыми свойствами [87].

Иммуногистохимическое исследование выявило большое количество PER в хвостатом ядре, гиппокампе и коре головного мозга [88]. Экспериментальные данные подтверждают, что у животных и человека POP играют важную роль в процессах памяти и обучения, а также в когнитивном и поведенческом развитии [89–109]. У мышей уровень экспрессии POP (S09.001) высок в головном мозге, почках, семенниках и тимусе [110].

У пациентов, страдающих когнитивными заболеваниями и другими заболеваниями нервной системы и психики, была обнаружена измененная активность PER. Выявлена связь повышенной активности PER с воспалением [89], а также с психогенными расстройствами и шизофренией, тогда как пониженная активность PER связана с депрессией [91], рассеянным склерозом [93], анорексией, нервной булимией, болезнью Альцгеймера,

деменцией с тельцами Леви, болезнью Паркинсона и болезнью Хантингтона [95]. Более того, PEP и DPP-IV были связаны с агрессивным поведением как у нормальных, так и аутичных подростков [96]. Активность PEP у детей с аутизмом может быть связана с деградацией специфических нейропептидных гормонов, которые влияют на социальное поведение и навыки межличностного общения [96,98]. Помимо этого, распределение PEP в головном мозге человека напоминает распределение рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3), что согласуется с гипотезой о том, что PEP играет роль в регуляции движения, развитии когнитивных способностей и передаче сигнала IP3 [88]. Кроме того, было установлено, что PEP разрушает нейропептид, играющий важную роль в формировании памяти [100]. Однако, в целом, поскольку PEP является цитоплазматическим ферментом, гипотезы о том, что PEP непосредственно ответственны за метаболизм нейропептидов или их предшественников *in vivo*, являются на данный момент спекулятивными [101]. Однако, поскольку PEP были обнаружены в плазме крови [102] и семенной жидкости [103], можно предположить, что эти ферменты высвобождаются из клетки во внеклеточное пространство. Уровень PEP в плазме крови снижался у людей с депрессией и увеличивался у пациентов с маниакальными расстройствами и шизофренией, что указывает на возможную связь между изменениями активности PEP и нервно-психическими заболеваниями [104]. Если цитозольный фермент у психиатрических пациентов может нерегулируемо высвободиться в кровотоки и спинномозговую жидкость, то наблюдаемые изменения уровня PEP могут влиять на скорость гидролиза нейропептидов или их предшественников, которые оказывают значительное влияние на социальное поведение, эмоции, чувствительность и стрессоустойчивость [84].

Для клеток периферических тканей, особенно для секретирующих эпителиальных клеток желудка, протоков молочной железы, почек, поджелудочной железы и репродуктивной системы также характерна активность PEP. Как и у мышей, в семенниках человека обнаружено большое количество PEP, особенно в ядрах первичных сперматоцитов и сперматид, яйцеклетках и первичных фолликулах. Кроме того, обнаружено, что уровень PEP повышен при злокачественных опухолях [88,110]. Помимо этого, пролилолигопептидазы семейства S9 участвуют в патологии заболеваний легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких и COVID-19 [105,106]. Совместно с матриксными металлопротеиназами пролилолигопептидазы могут генерировать матрикин – трипептид пролин-глицин-пролин (PGP) путем расщепления богатого пролином коллагена внеклеточного матрикса. PGP затем ацетируется и действует как

хемоаттрактант для рекрутирования нейтрофилов и запуска нейтрофильного воспаления [107].

Ингибитор DPP-IV, введенный мышам обоих полов, вызывал изменения уровней активности PEP и DPP-IV в различных отделах головного мозга [100]. Было показано, что DPP-IV участвует в регуляции гомеостаза глюкозы в мозге путем расщепления глюкозозависимого инсулиноподобного полипептида-1 (GIP-1), и глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1) [108,109]. Применение ингибиторов DPP-IV при лечении сахарного диабета 2 типа значительно повышает уровень инсулина, а ингибиторы DPP-IV растительного и животного происхождения оказались эффективны на животных моделях диабета и в настоящее время находятся на различных стадиях клинических исследований [111–113].

Роль DPP-IV также выявлена в онкопроцессах. В клетках Caki-2 (рак почки) моноклональные антитела против DPP-IV индуцируют остановку клеточного цикла в G1-S фазе и ингибируют рост опухоли *in vivo* [114,115]. Точные молекулярные механизмы участия DPP-IV в онкогенезе еще предстоит выяснить.

FAP избирательно экспрессируется в клетках доброкачественных опухолей и в нормальных тканях во время ремоделирования. К таковым, например, относятся стромальные клетки и мезенхимальные стволовые клетки во время эмбриогенеза, заживления ран, фиброзных реакций и воспалительных состояний, связанных с развитием артрита и атеросклероза [116], а также в ишемизированной ткани сердца после инфаркта миокарда [117]. Гомодимеры FAP и гетеродимеры FAP/DPP-IV, а также более крупные комплексы FAP были идентифицированы в клеточных экстрактах культивируемых человеческих фибробластов, меланоцитов и клеток саркомы [118]. При многих злокачественных новообразованиях человека, включая колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак яичников и другие виды рака, высокая экспрессия FAP коррелирует с увеличением локальной инвазии опухоли, повышенным риском метастазирования в лимфатические узлы и снижением выживаемости пациентов [55].

Участие в онкопроцессах показано и для AAR [119,120]. Удаление ацилированной N-концевой аминокислоты (N-As) приводит к существенным изменениям физико-химических и функциональных свойств белка, таких как заряд, пространственная укладка, локализация и белок-белковые взаимодействия [121]. Например, удаление N-As усиливает убиквитинирование, что приводит к деградации белка. И наоборот, снижение активности AAR приводит к накоплению некорректно свернутых белков из-

за нарушения убиквитин-протеасомной системы (UPS) [119,120]. Можно заключить, что ААР является ключевым активатором протеасомной функции. Так как ингибиторы UPS уже используются как противораковые терапевтические агенты, то и ААР может рассматриваться как потенциальная фармакологическая мишень. В работе [121] была обнаружена связь ААР с мембранной локализацией основного онкогенного белка K-Ras, что ещё раз подтверждает фармакологическую значимость ААР, так как ингибирование ААР может стать перспективной стратегией для лечения K-Ras-индуцированного рака. Ещё одна связь ААР с развитием и лечением онкологии следует из того, что ААР является ключевым белком в клеточном ответе на повреждение ДНК [122].

Известно, что POP (S09.033), а также OpB (S09.010), и ААР играют патогенную роль в инфекциях, вызываемых протозойными паразитами и бактериями [123] (см. также следующий раздел). Предполагается, что антимикробное действие карбапенемных антибиотиков связано с их способностью необратимо ингибировать ААР [74,124]. Показано, что эти ферменты из *Mycobacterium tuberculosis* могут стимулировать секрецию провоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами и приводить к воспалительной реакции при инфекции *M. Tuberculosis* [94].

Известно, что *Trypanosoma spp.* (а также другие паразиты), прикрепленная к внеклеточному матриксу, выделяет POP, которые разрушают коллаген. Появление продуктов деградации коллагена в крови больных является сигналом для высвобождения матриксных металлопротеаз лейкоцитами, что приводит к дальнейшему разрушению внеклеточного матрикса. В конечном счете это позволяет паразиту преодолевать защитные барьеры, такие как внеклеточный матрикс или гематоэнцефалический барьер [125]. Кроме того, в острых фазах заболевания OpB и POP попадают в кровь больных, где гидролизуют ряд физиологически важных пептидных гормонов, в том числе предсердный натрийуретический фактор (ANF), адренокортикотропный гормон, глюкагон, нейротензин, ангиотензин I и вазоактивный кишечный полипептид, что вызывает серьезные физиологические нарушения [130].

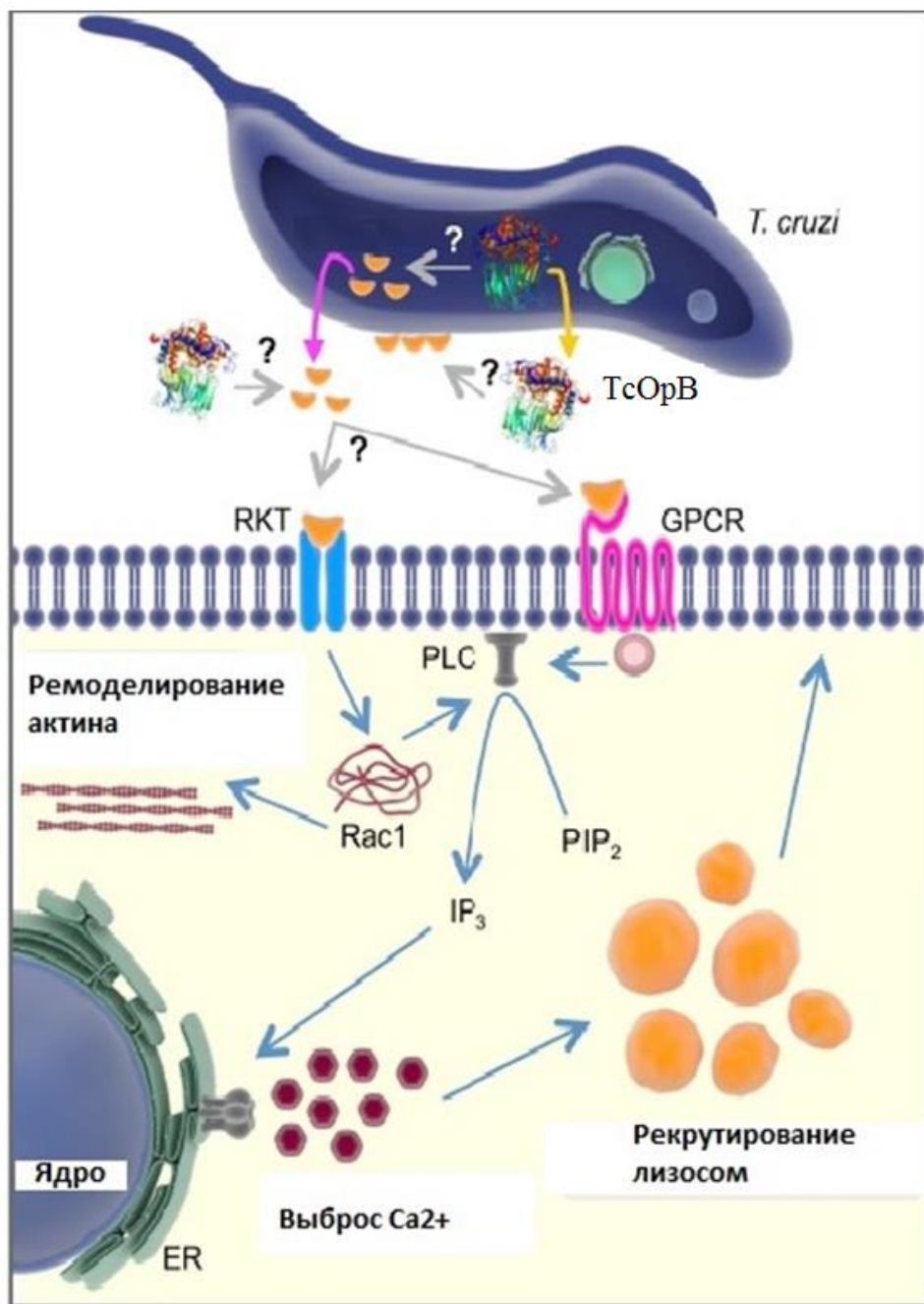
Участию OpB в патогенезе тропических инфекций, которые поражают почти 9 миллионов человек во всем мире, ежегодно вызывая около 40 000 смертей [126–128], будет посвящена следующая глава.

### 1.3.1. Функциональные аспекты и патогенная роль ОрВ из паразитических простейших.

Тропические инфекции, такие как Болезнь Шагаса, африканский трипаносомоз человека и лейшманиоз поражают преимущественно проживающих в сельских или отдаленных районах Африки, Азии и Америки, где ограничен доступ к диагностике и лечению, и где по данным Всемирной организации здравоохранения, проживает 1 миллиард человек [126–128]. Переносчиками этих инфекций являются простейшие *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* и *Trypanosoma brucei gambiense* и *Leishmania spp.*

#### 1.3.1.1 Роль ОрВ из *Trypanosoma cruzi* в инвазии паразита.

Один из способов, с помощью которого *T. cruzi* проникает в нефагоцитирующие клетки млекопитающих, связан с  $Ca^{2+}$ -сигналингом, приводящим к рекрутированию и слиянию лизосом клетки-хозяина в месте прикрепления паразита. В отличие от многих внутриклеточных патогенов, выживание *T. cruzi* зависит от слияния лизосом хозяина с вакуолью паразита, кислая среда которой необходима для дифференцировки паразита из нереплицирующегося трипомастигота в репликативную форму амастигота [129,130]. Связь протеолитической активности ОрВ с концентрацией  $Ca^{2+}$ , которая была установлена ещё в середине 1990-х годов [131], позволила прояснить биологическую функцию ОрВ из *Trypanosoma cruzi* (ТсОрВ) (рисунок 9) [135,136].



**Рисунок 9.** Роль OpV *Trypanosoma cruzi* в инвазии паразита. TcOpV гидролизует неизвестный предшественник с образованием активного агониста Ca<sup>2+</sup>, который связывается с рецепторами клетки-хозяина и активирует фосфолипазу C (PLC), приводя к образованию инозитолтрифосфата и, следовательно, к освобождению внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>. Пока не ясно, взаимодействует ли TcOpV со своим субстратом внутри или снаружи паразита. Обозначения на рисунке: ? – неизвестные этапы сигнального пути; ER - эндоплазматический ретикулум; GPCR - рецептор, связанный с G-белком; PLC - фосфолипаза C; PIP<sub>2</sub> - фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат; IP<sub>3</sub> - инозитолтрифосфат; RTK - рецептор тирозинкиназы; Rac1 - субстрат ботулинического токсина C3, связанный с Ras 1 [126]



Первоначально, цитозольная или внеклеточная TcOpV катализирует расщепление какого-то белка в клетке *T. cruzi* или за её пределами. Хотя TcOpV не имеет сигнального пептида, не секретируется и должна находиться в цитозоле [131], в супернатанте культур трипомастиготов была обнаружена активность TcOpV в отношении флуорогенного субстрата N-Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC, у эпимастиготов аналогичная активность не была обнаружена [134].

Продукт гидролиза секретируется клеткой *T. cruzi* и связывается с рецепторами клетки-хозяина, активируя PLC и последующую выработку IP<sub>3</sub>, что вызывает высвобождение Ca<sup>2+</sup> из эндоплазматического ретикулума и других внутриклеточных запасов Ca<sup>2+</sup>. Активность PLC также может стимулироваться как через рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR) путем прямого взаимодействия PLC с  $\alpha$ -субъединицей G-белка семейства Gq, так и через рецепторные тирозинкиназы (RTK) и малую GTP-азу Rac [135].

Высвобождение Ca<sup>2+</sup> индуцирует лизосомальный экзоцитоз и разрушение филаментов F-актина, что вызывает усиление инвазии паразитов [131,132,136] (рисунок 9). Вышеописанный сигнальный путь служит для проникновения *T. cruzi* в фибробласты, эпителиальные клетки и миобласты, но не в макрофаги, в которых инвазия *T. cruzi* не зависит от активности TcOpV [137].

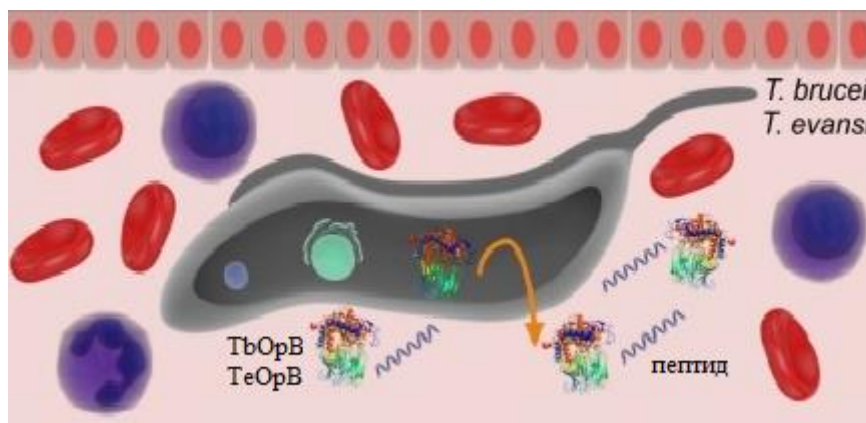
Специфические антитела к TcOpV способны предотвращать выработку Ca<sup>2+</sup> и тем самым уменьшать инвазию трипомастигота в клетки млекопитающих [131]. Паразиты с нокаутированным геном, кодирующим TcOpV, демонстрировали сниженную способность к инвазии клеток млекопитающих *in vitro*, и этот фенотип был подтвержден экспериментами *in vivo*, в которых мутанты имели сниженную инфекционную способность по сравнению с популяцией дикого типа [136].

Субстрат TcOpV пока не был идентифицирован, но известно, что он взаимодействует с гепарином, что характерно для нескольких факторов роста [138,139], включая гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, который может стимулировать рецепторные тирозинкиназы [140]. Следовательно, протеолитическая активность TcOpV может генерировать молекулу, которая, подобно гепарин-связывающему эпидермальному фактору роста, может активировать GPCR- и/или RTK-зависимый сигнальный каскад, описанный выше (рисунок 9).

### 1.3.1.2. Патогенная роль OpV из *Trypanosoma brucei*

Несколько исследований показали, что в плазме инфицированных животных присутствуют POP *T. brucei*, которые гидролизуют

циркулирующие в организме хозяина пептидные гормоны и нейротрансмиттеры [141–145]. Для TbOpV было показано, что нативный фермент способен гидролизовать вазопрессин, нейротензин и ANF и нечувствителен к природным ингибиторам протеаз хозяина, таким как серпины, цистатины и  $\alpha$ 2-макроглобулин [125]. Впоследствии было продемонстрировано, что мертвые/отмирающие трипаносомы фактически высвобождают TbOpV в плазму инфицированных животных, и фермент сохраняет полную каталитическую активность в организме хозяина (рисунок 10) [146]. Кроме того OpV была идентифицирована в секрете *T. brucei gambiense* [147].



**Рисунок 10.** Патогенная роль OpV из *Trypanosoma brucei* и *Trypanosoma evansi* (TeOpV). TbOpV и TeOpV, высвобождаемые паразитами в плазму хозяина, могут гидролизовать биологически активные пептиды, в том числе совместно с другими POP паразитов [126]

Нокаутные исследования *T. brucei*  $\Delta$ orb(–/–), показали, что их вирулентность и патогенность такие же, как у дикого типа, включая способность преодолевать кровеносные барьеры мозга и семенников [148]. *T. brucei*  $\Delta$ orb(–/–), тем не менее, проявляла повышенную протеолитическую активность к субстрату с пролином в положении P1, что предполагает активацию каких-то POP для компенсации потери TbOpV [148]. Множественный нокаут привел к аналогичному выводу. TbOpV и два других члена семейства S9, DPP 8 и TbPOP, не были важны для выживания паразитов ни *in vitro*, ни *in vivo* [149]. Тем не менее вопрос о том, являются ли TbOpV и TbPOP факторами вирулентности, остаётся [145].

### 1.3.1.3. Патогенная роль и диагностическое значение OpV из *Trypanosoma evansi*

TeOpV по-видимому, участвует в деградации ANF в кровотоке инфицированных млекопитающих, вызывая некоторые симптомы,

способствующие развитию сурры - инвазионной болезни крови лошадей, крупного рогатого скота, верблюдов, собак и слонов (рисунок 10) [150,151]. В плазме крови грызунов, инфицированных *T. evansi*, активность TeOpB положительно коррелировала с паразитемией в крови и отрицательно - с уровнем ANF. Присутствие 3,4-дихлоризокумарина, необратимого ингибитора OpB, в бесклеточной плазме инфицированных крыс значительно уменьшало деградацию ANF. В том же исследовании было показано, что период полувыведения ANF из плазмы крови грызунов, инфицированных *T. evansi*, сокращался в 5 раз. Кроме того, эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что TeOpB расщепляет ANF в четырех местах: Leu2Arg3↓Arg4↓Ser5, Arg11↓Ile12 и Arg27↓Tyr28, причём любое расщепление приводило к дезактивации гормона [150,151].

Из-за недостаточной чувствительности и специфичности традиционных методов выявления болезни сурры у животных (микроскопии и серологии крови), идут исследования возможности использования ряда белков, включая TeOpB, цистеиновую протеазу и вариабельный поверхностный гликопротеин в качестве молекулярных генов-мишеней для разработки альтернативной диагностики и иммунопрофилактики [152].

#### 1.3.1.4. Роль OpB *Leishmania* spp. в вирулентности паразита.

*Leishmania* spp. – это паразитические простейшие, вызывающие лейшманиоз, (эндемическое заболевание, найденное в 98 странах). Промастиготы *Leishmania* передаются и дифференцируются в амастиготы внутри фагоцитирующих клеток позвоночного хозяина. Паразит имеет несколько факторов вирулентности, включая OpB, причем этому ферменту приписывается преобладающая протеолитическая активность внутри клеток *Leishmania* [153]. Было показано, что ферментативная активность OpB аксеновых амастигот *L. donovani*, *L. mexicana* и *L. amazonensis* выше в сравнении с промастиготами [154], а уровень транскрипта OpB *L. braziliensis* повышен на стадии амастиготы по сравнению с промастиготой [155]. С другой стороны, экспрессия OpB в *L. major* была обнаружена на сходных уровнях у промастиготных и амастиготовых форм [156]. OpB также был обнаружен в секрете промастигот *L. donovani* [157] и экзосомах промастигот *L. donovani* и *L. major* [158]. *In vitro* анализ подтвердил корреляцию уровня инфицирования *L. amazonensis* и активности OpB [153].

С целью изучения OpB в качестве фактора вирулентности были сконструированы генетически модифицированные паразиты. Анализ *in vitro* показал, что промастиготы *L. major* Δopb(-/-) обладают сниженной способностью к инфицированию и выживанию внутри макрофагов. Тем не

менее, не было замечено изменений во внешнем виде и развитии признаков заболевания у мышей, инфицированных *L. major* Δорb(-/-) [156]. Отсутствие ОрВ в *L. donovani* приводило к накоплению неактивной енолазы на поверхности клеток паразита, изменения в макрофагах хозяина, связанных с секрецией цитокинов, передачей сигнала и воспалительной реакцией, а также к замедленному прогрессированию поражения лап у мышей [154]. Тем не менее, у *Leishmania*, ОрВ, по-видимому, не является решающим фактором вирулентности.

В работе [159] было проведено сравнение протеома амастигот, полученных из *L. amazonensis*, выделенных от инфицированных мышей линий BALB/c и BALB/c с удалённым тимусом. В этом исследовании были впервые описаны изоформы ОрВ. Было замечено, что у паразитов голых мышей преобладали четыре изоформы. Авторы предположили, что Т-клетки или производные от Т-клеток медиаторы наряду с клеточными взаимодействиями ответственны за контроль посттрансляционных модификаций ОрВ у инфицированных BALB/c мышей. Различные изоформы ОрВ могут иметь одну или более посттрансляционных модификаций (фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и гликозилирование), которые могут генерировать более или менее активную форму фермента. Реальное влияние изоформ ОрВ на выживаемость паразитов и прогрессирование заболевания еще предстоит выяснить [159].

#### **1.4. Олигопептидаза В - наименее изученный представитель семейства пролилолигопептидаз**

Как уже было сказано, ОрВ совместно с РЕР относятся к подсемейству S9A, т.е. являются эндопептидазами. В отличие от подавляющего большинства РОР, ОрВ не являются пролидазами, а имеют другую субстратную специфичность.

Первым изученным представителем ОрВ была протеаза II, выделенная в 1975 году из лизата грамотрицательной бактерии *E. coli* [160]. Был идентифицирован и клонирован ген, кодирующий эту протеазу [161] и охарактеризована ее активность. Было обнаружено, что фермент не гидролизует пептидную связь на карбоксильной стороне остатков пролина, а имеет каталитическую специфичность к карбоксильной группе основных аминокислотных остатков (В в названии фермента относится к *basic amino acid*), причем значительное предпочтение отдается аргинину в положении P1 [161,162]. Позднее аналогичная протеолитическая активность была также

выявлена в клетках других бактерий и одноклеточных эукариот *Trypanosoma cruzi* (TcOpB) [163] и *T. brucei* (TbOpB) [126].

На настоящий момент известно, что гены OpB присутствуют в клетках многих патогенных бактерий и протозойных паразитов (*Trypanosomatidae* и *Leishmania spp* [155,156,164]), а также в растениях (*Prosopis velutina* [165], пыльце *Ambrosia artemisiifolia* [166], сое *Glycine max* [167]). Кроме того существование OpB предсказано в геноме грибов, как, например, *Rozella allomycis* (MER0992896) и *Rhizopus microspores* (MER0991486), а также клеща *Ixodes scapularis* (MER0181390)[1]. У млекопитающих гены, кодирующие этот фермент, не обнаружены (таблица 2).

Таблица 2. Распространение олигопептидаз B в природе

Эукариоты		Прокариоты		
Протозойные паразиты		Растения	Грамм-отрицательные бактерии	Грамм-положительные бактерии
Трипаносомы	Лейшмании	Проростки пшеницы <i>Triticum aestivum</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Южная, центральная и северная Америка		Соя <i>Glycine max</i> (семена)	<i>Salmonella enterica</i> → сальмонеллез	
<i>Trypanosoma cruzi</i> ↓ болезнь Шагаса (человек)	<i>Leishmania major</i> <i>Leishmania amazonensis</i> ↓ лейшманиозы (человек и животные)		<i>Serratia proteamaculans</i>	
Африка		Мескит <i>Prosopis velutana</i> (пыльца)	<i>Moraxella lacunata</i> → конъюнктивит	
<i>Trypanosoma brucei</i> <i>Trypanosoma congolense</i> ↓ сонная болезнь (человек) нагана (животные)		Амброзия <i>Ambrosia artemisiifolia</i> (пыльца) ↓ поллинозы (аллергический ринит, астма)	<i>Treponema denticola</i> → пародонтит	
<i>Trypanosoma evansi</i> ↓ сурра (животные)			<i>Yersinia pestis</i> → чума	
			<i>Salmonella typhi</i> → брюшной тиф	
			<i>Mycobacterium tuberculosis</i> → туберкулез	
			<i>Mycobacterium leprae</i> → проказа	
			<i>Shigella disenteriae</i> → дизентерия	
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	} → пневмония
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
			<i>Shewanella putrefaciens</i>	} внутрибольничные инфекции
			<i>Serratia marcescens</i>	
			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	

Следует отметить, что трипаносоматиды из родов *Leishmania* и *Trypanosoma* обладают несколькими сходными генами, кодирующими OpB, названным OpB, OpB2 и OpB3. Открытая рамка считывания (ORF) OpB2 содержит 903-905 аминокислот, и обладает 19-21% идентичностью и 33-36% сходством с OpB. Согласно MEROPS [1], OpB2 присутствует исключительно в этих двух родах и в роде *Paramecium* ([https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/sequence\\_features?mid=S09.034](https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/sequence_features?mid=S09.034)). Полная ORF OpB3 был обнаружен только у *T. cruzi marinkellei* (995 аминокислот; Tc\_MarkIII; Tc\_MARK\_8399), подвида *T. cruzi* подрода *Schizotrypanum* (паразита летучих мышей) [168], и у

*T. brucei* (1028 аминокислот; Tb927\_III; Tb927.11.3120). У других видов из обоих родов последовательность OpV3, по-видимому, фрагментирована или обозначена как псевдоген (<https://tritypdb.org/tritypdb/>). Несмотря на то, что трипаносоматиды разошлись около 500 миллионов лет назад, геномы этих организмов сохраняют высокую степень синтении [169]. Первичные последовательности Tc\_MarkIII и Tb927\_III имеют 56% идентичности друг с другом, около 30% и 25% идентичности с OpV из *T. cruzi* и *T. brucei* и OpV2 из *T. cruzi* и *T. brucei* соответственно. Наибольшая степень гомологии наблюдается в пределах каталитического домена, что характерно для представителей семейства пролилолигопептидаз [170]. OpV2 имеет дополнительное С-концевое удлинение каталитического домена [164]. Роль OpV2 и OpV3 в биологии паразитов, а также в развитии заболеваний, которые они вызывают, требует дальнейшего изучения. Тем не менее, установлено, OpV2 экспрессируется на всех стадиях цикла *L. amazonensis* и была обнаружена в обогащенном сумоилированием протеоме эпимастигота *T. cruzi* [171,172].

#### 1.4.1. Структурно-функциональные особенности OpV

Олигопептидаза V гидролизует пептидные связи на карбоксильной стороне Arg (предпочтительно) или Lys. Наиболее эффективный гидролиз идёт после пары основных остатков. Как и остальные POP, OpV имеют консервативную каталитическую триаду Ser, Asp и His [161,173]. В число пептидных субстратов OpV попадают многие физиологические активные пептиды, а также пролин-богатые антибактериальные пептиды [151,174,175]. Как правило, OpV неактивны в отношении макромолекулярных субстратов, таких как желатин, коллаген, фибриноген и фибронектин [176].

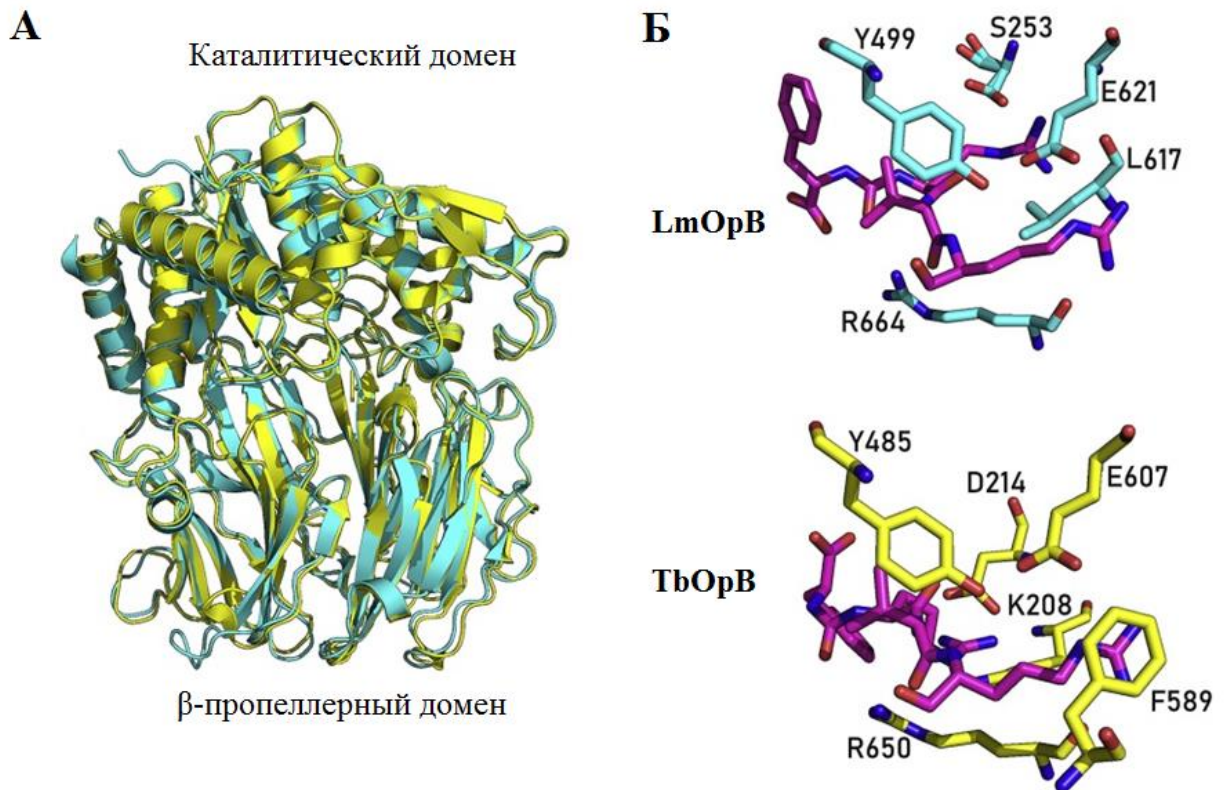
Условия, оптимальные для каталитической реакции, зависят от источника фермента. Так, трипаносоматидные OpV активны при pH от 8 до 9,5 [151,154,173,177], сохраняя значительную активность при физиологическом pH [151,154,173,176,177]. Оптимальная температура для работы TcOpV колеблется между 37 и 42°C [178], а TbOpV стабилен до 45°C [179]. В отличие от OpV из *T. brucei* и *T. congolense*, дитиотрейтол (DTT) не оказывает влияния на ферментативную активность TcOpV и OpV *L. major* (LmOpV) [173,177,178,180,181]. Чувствительность активности TbOpV к тиоловым реагентам вероятно обусловлена остатком Cys256, восстановление которого приводит к изменению конформации фермента [181]. TcOpV и LmOpV не имеют этого остатка в своей первичной последовательности, что может объяснить их нечувствительность к DTT [178].

Известно, что ОрВ инактивируются необратимыми ингибиторами сериновых пептидаз: 3,4-дихлоризокумарином (DCI) [151,173,177], 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторидом, диизопропилфторфосфатом, фенилметансульфонилфторидом (PMSF) [173,177], ТСК [154,176], а также ингибируется антипаином и лейпептином, которые содержат альдегид на Arg в положении P1 [154,173,176,177,180].

В работах по поиску специфических ингибиторов ОрВ, которые, как ожидалось, могут быть использованы в терапевтических целях, было показано, что такой активностью обладает эпокси- $\alpha$ -лапахон, производное нафтохинона, обладающее антилейшманиальной активностью *in vitro* и *in vivo* [182,183]. Методом молекулярного докинга было показано, что эпокси- $\alpha$ -лапахон может связываться с каталитическим сайтом ОрВ *L. amazonensis* способом, сравнимым со связыванием антипаина [183]. В качестве потенциальных ингибиторов ОрВ, интерес представляют протамины, которые представляют собой основные пептиды, богатые аргинином [184].

Первая 3D-модель ОрВ из *Escherichia coli* была построена методом гомологического моделирования на основе структуры POP из *Sus scrofa* [185]. Эти данные затем были уточнены рентгеновскими структурами высокого разрешения, полученными для LmОрВ и TbОрВ [180,186]. В настоящее время доступны три структуры ОрВ простейших, которые представляют фермент в двух конформациях, ранее обнаруженных у бактериальных PER [180,186]. Закрытые конформации наблюдались в двух структурах LmОрВ и TbОрВ в комплексах с пептидным ингибитором антипаином (Phe-Arg-Val-Arg; остатки P4, P3, P2 и P1 соответственно), а открытое состояние было обнаружено в структуре TbОрВ в свободной от лигандов форме [186] (рисунок 11).





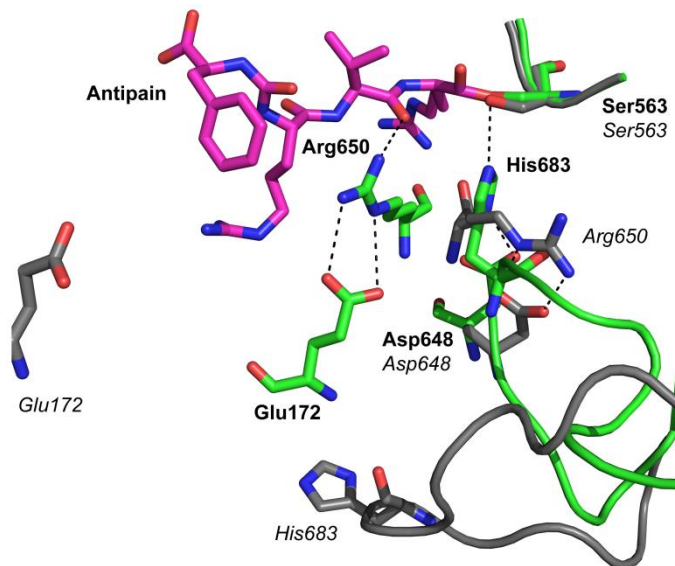
**Рисунок 11.** Структуры протозойных OpV в комплексе с антипаином. **А.** Наложение структур LmOpV (синий, PDB ID 2XE4) на TbOpV (желтый, PDB ID 4BP9). **Б.** S1, S2 и S3 сайты связывания субстрата в протозойных OpV. Антипаин окрашен фиолетовым [126].

Структуры комплексов ферментов с ингибитором позволили описать субстрат-связывающий карман OpV (рисунок 11). Положения P1 и P2 связанного лиганда были схожи в обеих структурах OpV [186]. Glu621 (Glu607) отвечает за первичную субстратную специфичность фермента к Arg [180,186], в то время как Tyr499, по-видимому, играет роль в позиционировании Glu621, а также стабилизации Arg в P1 положении [180] (рисунок 11Б). Кроме того, гуанидиновая группа Arg взаимодействует с Phe603 (Phe589) посредством  $\pi$ -стэкинг-взаимодействия, а также образует водородные связи с Arg664 (Arg650) [180,186]. В антипаине в P2 положении находится Val, в ближайшем окружении которого не наблюдается отрицательно-заряженных остатков, однако стабилизации Arg или Lys в P2 положении могли бы способствовать остатки Tyr499 (Tyr485) [180,186]. (рисунок 11Б). Контакты Arg в положение P3 различаются в 2-х структурах OpV [186]. В LmOpV P3 Arg взаимодействует с Ser253 пропеллерного» домена посредством водородной связи и с Leu617 посредством гидрофобных взаимодействий [180]. В TbOpV P3 Arg взаимодействует с Asp214 и Lys208 пропеллерного» домена [186] (рисунок 11Б). Остаток Phe в положении P4



антипаина расположен в полости центрального канала пропеллера и не имеет контактов с остатками фермента ни в одной из структур [186].

Сравнение полученных структур ОрВ простейших, закристилизованных в разных конформациях, между собой, а также со структурами POP (PDB\_ID: 3IUN и 3IVM) и ААР из *Aeropyrum pernix* (PDB\_ID: 304J и 2HU8), проведенное в работе [186], позволило предложить механизм, обеспечивающий синхронизацию сближения и расхождения доменов со сборкой и разборкой каталитической триады. В закрытой (активной) конформации ОрВ и РЕР, стабилизация каталитической триады в собранной (каталитически-активной) конфигурации обеспечивается консервативным солевым мостом (СМ1), формирующимся между двумя доменами при их сближении (рисунок 12). В формировании СМ1 участвует остаток Arg, расположенный через одну аминокислоту от каталитического остатка Asp. В открытой конформации увеличение расстояния между доменами препятствует формированию СМ1, и свободный Arg формирует солевой мост с каталитическим Asp; при этом каталитический His, расположенный на длинной и подвижной петле, вытесняется из центра междоменной полости к её периферии. Изменение позиции His приводит к распаду каталитической триады, и переходу фермента в каталитически неактивное состояние.



**Рисунок 12.** Сравнение каталитического центра в открытой и закрытой конформациях ТьОРВ. Открытая и закрытая конформации наложены друг на друга, чтобы четко показать локализованные структурные изменения, которые происходят при связывании субстрата. Остатки в открытой конформации окрашены в серый цвет, остатки в закрытой конформации — в зеленый, а связанный антипаин — в фиолетовый. В открытой конформации остаток Glu172 из петли пропеллерного домена находится далеко от остатков активного центра, Arg650 образует солевой мост с находящимся рядом

каталитическим Asp648, при этом каталитический His683, расположенный на длинной и подвижной петле, вытесняется из активного центра, что приводит к разобщению каталитической триады и инактивации фермента. При сближении доменов Glu172 сближается с Arg650 что приводит к образованию междоменного солевого моста, освобождению каталитического Asp648 и освобождению места в центре междоменной полости для каталитического His683, при перемещении которого с периферии междоменного интерфейса в центр междоменной полости, происходит сборка каталитической триады.

Ранее было замечено, что в большинстве охарактеризованных бактериальных ферментов, CM, аналогичный CM1 в OpV простейших, не может быть сформирован, так как Arg, расположенный через одну аминокислоту от каталитического остатка Asp, заменён на Gln, а второй компонент междоменного CM1 в OpV простейших (остаток Glu) заменён на Arg [187]. Можно было предположить, что стабилизации собранной каталитической триады в закрытой конформации бактериальных OpV происходит не так, как это было описано для протозойных ферментов. Однако, в отсутствии пространственных структур бактериальных OpV, однозначно определить механизм этой стабилизации не представлялось возможным. Поэтому основной упор в моей работе был сделан на структурные исследования бактериальной OpV.

В качестве объекта исследования была выбрана OpV из бактерии *Serratia proteamaculans*. Впервые данный фермент был выделен из организма-хозяина в 2006 г. [188]. Позднее фермент был клонирован, и был разработан препаративный метод получения рекомбинантного фермента (His6-PSP) [189]. Был проведен субстратный и ингибиторный анализ PSP, изучено влияние ионов кальция, pH и температуры на активность фермента [190,191]. Развёрнутая сравнительная характеристика нативного и рекомбинантного белка была опубликована в 2014 г [192]. В 2015 г. было установлено, что обработка PSP иммобилизованным химотрипсином в нативных условиях приводит к образованию укороченного фермента с удалённой N-концевой областью, сохраняющего каталитическую активность в отношении низкомолекулярных субстратов, и способного гидролизовать высокомолекулярные субстраты [193]. Следует отметить, что именно эта работа инициировала получение мутантной формы PSP, в которой шарнирный пептид заменён на сайт протеазы TEV, и который стал одним из основных объектов моих исследований. Другие мутантные производные PSP, используемые в моей работе были отобраны на основании исследований по изучению структурно-функциональной роли заряженных аминокислотных остатков, окружающих гистидин каталитического центра, и их партнёров из

N-концевого домена [187,194], в результате которой были созданы мутантные варианты PSP с увеличенной по сравнению с исходным ферментом эффективностью катализа и с изменённой специфичностью к Arg/Lys в P2 позиции субстрата.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

### Материалы

В работе использовали p-нитроанилидные субстраты (p-NA): p-N $\alpha$ -бензоил-D,L-аргинина (BAPNA), Z-Arg-Arg-pNA, Z-Lys-Arg-pNA (Z = бензилоксикарбонил) («Bachem», Швейцария); ингибиторы сериновых протеаз PMSF и ТСК; а также додецилсульфат натрия (ДСН), изопропил- $\beta$ -D-тио-галактозид (IPTG), DTT, акриламид, N,N`-метиленабисакриламид, реактив Protein Assay, белковые стандарты для электрофореза («Bio-Rad», США), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris); NaCl; глицерин («ICN», США); Na-соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА),  $\beta$ -меркаптоэтанол, Кумасси G-250, диметилсульфоксид (ДМСО) («Fluka», Германия); NERES («Gerbu», Германия); ампициллин («Биохимик», Россия); бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт («Beckton Dickinson», Франция); лизоцим («Applichem», Германия); метанол, этанол, изопропанол, соляную кислоту («Реахим», Россия); персульфат аммония 10%, тетраметиленамин (ТЕМЕД)

Остальные реагенты — отечественного производства классификации ос.ч. или х.ч.

### Методы.

*Получение PSP дикого типа и её мутантных вариантов. Сайт-направленный мутагенез*

Для получения точечных мутаций сайт-направленный мутагенез с одним праймером проводили, как описано в [195] с небольшими модификациями. Синтетические олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для замены аминокислот (один праймер на мутант), и праймеры для отбора мутантных клонов, были синтезированы в компании Евроген (Москва, Россия) (таблица 3).

**Таблица 3.** Синтетические олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для замены аминокислот и контрольные праймеры для отбора мутантных клонов.

Название	Последовательность (от 5' к 3')
F75E.R F75Echeck.F	ATAAGGCACCGATTGCTCATACAGGTTCTCGCG; CGCGAGAACCTGTATGAG;
E125A.R E125Acheck.F	CCCAGAGTATAAAAGGCACGCTGCTCGG TGCCGAGCAGCGTGCC
S532A.F S532A.check.F	CGCCATGGGTGGCGCGGCCGGCGGCTTGCTG TCGCCATGGGTGGCGCG
TEV.F TEV_Check.F	GAGATGGTGGCGCGCGAGAACCTGTATTTCCAA TCGGTGCCTTATGTCCG AGATGGTGGCGCGGAG

На матрице PSP-экспрессирующей плазмиды, полученной ранее [189] было проведено 18 циклов ПЦР с использованием набора для ПЦР Tersus Plus («Евроген», Москва, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой DpnI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), расщепляющей ДНК-матрицу, а затем трансформировали в компетентные клетки *E. coli* Match1. Мутантные клоны отбирали методом ПЦР непосредственно на колониях с использованием ДНК-полимеразы Taq (Евроген, Москва, Россия) и контрольных праймеров из таблицы 3 с соответствующим универсальным праймером T7. Плазмидную ДНК, выделенную из мутантных клонов, секвенировали, чтобы гарантировать отсутствие случайных мутаций, связанных с ПЦР. Для получения двойных мутантов проводили два последовательных цикла мутагенеза.

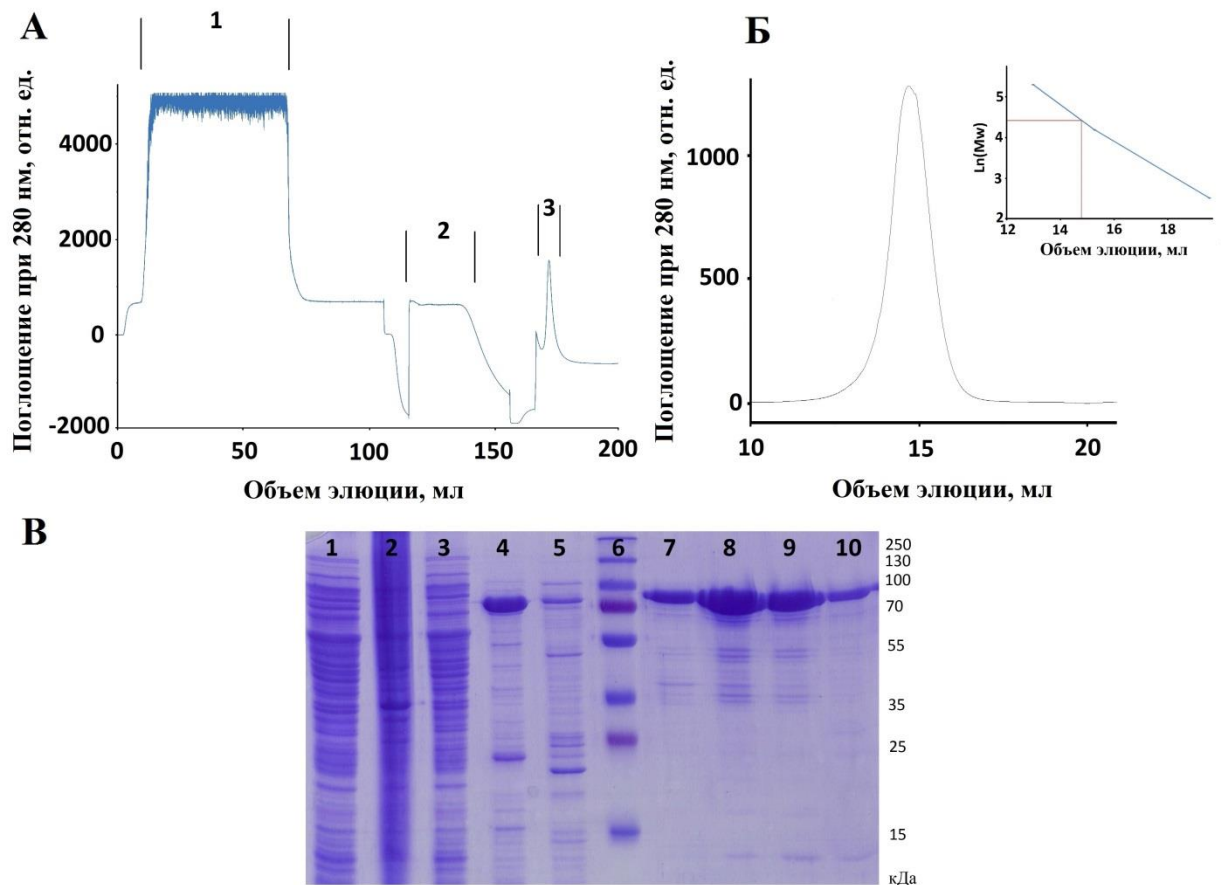
#### *Наработка рекомбинантных белков.*

Экспрессионные векторы, содержащие гены, кодирующие целевой белок с N-концевым полигистидиновым тагом, трансформировали в химически

компетентные клетки *E. coli* Rosetta (DE3) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки выращивали в среде LB с высоким содержанием соли, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола (Panreac-AppliChem, Дармштадт, Германия) при 37 °С до тех пор, пока значение OD 600 не достигало 0,8. Экспрессию индуцировали 0,2 mM IPTG при 24°С в течение 16 часов.

*Выделение и очистка рекомбинантного белка.*

Клетки осаждали центрифугированием в течение 20 минут при 5000 об/мин (центрифуга Beckman Coulter, США). Осадок, содержащий рекомбинантный белок, суспендировали в буферном растворе L (40 mM Tris-HCl pH 7.8; 400 mM NaCl; 5 mM имидазола; 0.2% Triton-X100, 1 mM PMSF) и обрабатывали ультразвуком (дезинтегратор Branson Ultra, импульсы 2с с интервалом 6с, суммарная продолжительность 360 с) при 4°С. Лизат центрифугировали при 28000g в течение 30 мин при 4°С и наносили супернатант на металлохелатную колонку Ni-NTA 5 мл, предварительно уравновешенную буфером Б (40 mM Tris-HCl pH 7.8; 400 mM NaCl; 5 mM имидазола; 0.1% Triton-X100). Затем колонку промывали последовательно 40 мл стартового буфера Б, 40 мл буфера W (40 mM Tris-HCl pH 7.8; 400 mM NaCl; 40 mM имидазола) и 30 мл буфера Е (40 mM Tris-HCl pH 7.8; 400 mM NaCl; 300 mM имидазола). Элюцию белка контролировали УФ-детектором при длине волны 280 нм (рисунок 13А)



**Рисунок 13.** Выделение и очистка белка. **А.** Хроматограмма выделения белка на колонке Ni-NTA. 1 – растворимые компоненты бактериальных клеток, не связавшиеся с сорбентом (проскок через колонку); 2 – белки, смытые с сорбента промывочным буфером W (промывка); 3 – белки, смытые с сорбента элюирующим буфером E (элюция). **Б.** Результат гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ). **В.** Результаты электрофоретического анализа в 12% ДСН-ПААГ белковых фракций. 1 – клеточный лизат, 2 – осадок, 3 – проскок, 4 – промывка, 5 – элюция, 6 – маркер молекулярных масс PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 7-10 – фракции с гель-фильтрационной колонки.

Чистоту белков оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [196] на электрофорезной ячейке Mini-Protean 3 (Bio-Rad, США) (рисунок 13В). Концентрация разделяющего геля составляла 12%, концентрирующего геля – 4%. Гели окрашивали Coomassie G-250. Величину оптической плотности измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop (ThermoScientific). Концентрации белка определяли по методу Брэдфорда с использованием набора для анализа белка (Bio-Rad) и с-глобулина бычьей сыворотки в качестве стандарта. Молярную концентрацию

растворов ферментов определяли титрованием активных центров фермента р-нитрофениловым эфиром р'-гуанидинобензойной кислоты [197].

Концентрирование препаратов производилось центрифугированием при 4000 об/мин с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra (Merck, США) с размером пор 30 кДа.

Для определения олигомерного состояния белка и его финальной очистки препарат (концентрация 2 мг/мл) наносили на гель-фильтрационную колонку Superdex 200 10/30 GL (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), уравновешенную 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 и 200 mM NaCl (рисунок 13Б).

#### *Дифференциальная сканирующая флуориметрия.*

Эксперименты проводили в трёх повторах с использованием 96-ти луночных планшетов для ПЦР-РВ и РВ-амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Диапазон температур для получения кривых плавления был 25-65°C с шагом 1°C. Экспериментальные образцы содержали PSP (0.5 мг/мл) и 1х-кратный краситель SYPRO Orange ( $\lambda_{ex}$  – 300 и 470 нм,  $\lambda_{em}$  – 570 нм) (Sigma-Aldrich, США) в различных буферных системах. В образцах также варьировали вязкость, двухвалентные катионы, ионную силу и концентрацию детергентов. Кроме того, было проверено влияние на термостабильность PSP лигандов из набора Silver Bullet (Hampton Research). Реакционную смесь раскапывали в 96-луночные планшеты для полимеразной цепной реакции в реальном времени; реакцию без белка использовали в качестве контроля. Эксперимент проводили в режиме FRET. Результаты усредняли, вычитали базовую флуоресценцию растворов, а полученные значения использовали для построения кривых температурной зависимости уровня флуоресценции с помощью программы GraphPad Prism 8.0. Кривые аппроксимировали в соответствии с уравнением Больцмановской кривой плавления [198]. Температуру плавления определяли как температуру, при которой флуоресценция достигает половины максимального значения.

#### *Поиск условий кристаллизации и выращивание кристаллов белков.*

Кристаллизацию PSP проводили на базе ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии НИЦ «Курчатовский институт», оснащённого роботизированной системой кристаллизации фирмы «Rigaku» (Япония). Сначала методом «сидячей капли» посредством диффузии в парах проводили кристаллизационный скрининг, а затем методом диффузии в парах в варианте «висячей капли» проводили оптимизацию условий



кристаллизации. Концентрация белка в обоих случаях была 15-21 мг/мл. Белок был растворён в буфере (20мМ Трис pH 8.0, 100 мМ хлорид натрия, 5 мМ спермин).

В первом случае использовали 96-ти луночные кристаллизационные планшеты на 96 лунок (ArtRobbins, США) и наборы для кристаллизации глобулярных белков: Crystal Screen HT, Index HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT (Hampton Research, США) и TOP96 (Anatrace, США). Соотношения белок:противораствор брали 1:1, 2:1 и 1:2, при суммарном объеме содержимого в лунке 0,3 мкл. Объем противораствора для уравнивания был 50 мкл. Температура кристаллизации - +20 и +4°C. Результаты проверяли ежедневно в течение первой недели, а потом каждые 3 дня. Кристаллы появлялись в период с 8-го по 14-ый день.

Для оптимизации условий кристаллизации (варьирование pH и других компонентов противораствора) использовали 24-х луночные планшеты (VDX, США). Кристаллизационная капля имела объем 3 мкл, при соотношении белок:противораствор 1:1. Противораствор имел объем 400 мкл.

Финальные условия кристаллизации собраны в таблице 4.

**Таблица 4.** Финальные условия кристаллизации исследуемых ферментов.

Образец	Условия кристаллизации <sup>1</sup>	№ PDB
PSP_S532A	0.2M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1M Bis-Tris pH 5.5, 23% PEG 3350	7ZJZ
PSPmodE125A	0.2M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1M MES pH 6.5, 30% PEG 5000, MME	7NE4
PSPmodS532A	0.2M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1M Bis-Tris pH 5.5, 27% PEG 3350	7NE5
PSPmod	0.2M C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> pH 7.0, 20% PEG 3350	7OB1
PSPmod	0.2M C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> pH 7.0, 24% PEG 3350	7YWS
PSPmod	0.2M C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> pH 7.0, 20% PEG 3350	7YX7
PSPmod-TCK	0.2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1 M TrisHCl, pH 8.5, 30% PEG 4000	7NE7
PSP-TCK	0,1 M имидазол pH 7,0 и 20% PEG 6000	7YWP

<sup>1</sup> Во всех случаях кристаллизацию проводили в присутствии 5 мМ спермина, на +4°C. Время роста кристаллов – 1-3 недели.

### *Получение и кристаллизация комплексов с ТСК.*

Белки концентрировали до 20,0 мг/мл в буфере (20 мМ TrisHCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl). Готовили 100 мМ исходный раствор ТСК в воде. ТСК добавляли по каплям при постоянном перемешивании при +4 °С до конечной концентрации 1 мМ (стехиометрическое соотношение белок:ингибитор составляло примерно 1:4). Потерю каталитической активности контролировали гидролизом Na-бензоил-D,L-аргинин-р-нитроанилида (BAPNA) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Мичиган, США), как описано ниже.

Избыток ингибитора удаляли с помощью хроматографии на гельфильтрационной колонке Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, Marlborough, MA, USA), уравновешенной исходным буфером. В концентрированный комплекс добавляли спермин до 5 мМ.

Так же, как и при кристаллизации свободных белков, при кристаллизации комплексов, сначала методом «сидячей капли» посредством диффузии в парах проводили кристаллизационный скрининг, а затем методом диффузии в парах в варианте «висячей капли» проводили оптимизацию условий кристаллизации. Кристаллы росли в течение 3–4 недель, достигая средней длины наибольшей грани около 200 мкм.

### *Сбор и обработка дифракционных данных, решение, уточнение и анализ кристаллических структур.*

Дифракционные данные собирали на Российских и зарубежных источниках синхротронного излучения, включая «Курчатов» (НИЦ «Курчатовский Институт», Россия) (таблица 5), SPring8 (Харима Гарден сити, Япония) и ESRF (Гренобль, Франция) (таблица 6). Для криозащиты кристаллов использовали паратон.

Структуры были решены методом молекулярного замещения с использованием программы BALBES [199]. Уточнение всех структур проводилось с помощью программы REFMAC5 пакета CCP4 [200]. Визуальный просмотр карт электронной плотности и ручное перестроение модели проводились с помощью интерактивной графической программы COOT [201].

Асимметричная единица во всех случаях содержала одну молекулу белка. Визуальный осмотр структуры проводили с использованием программы COOT [201] и системы молекулярной графики PyMOL, версия 1.9.0.0 (Schrödinger, Нью-Йорк, США). Контакты и свободную энергию сольватации междоменного интерфейса анализировали с помощью

PDBePISA [202]. Наложение структур для сравнительного структурного анализа было выполнено с использованием программы LSQKAB [203]. Ближайшие структурные гомологи были найдены с помощью программы DALI [204].

**Таблица 5.** Сбор, обработка и анализ дифракционных данных, собранных на источнике синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский институт».

PDB_ID	7OB1 PSPmod	7NE5 PSPmodS532A	7NE4 PSPmodE125A	7NE7 PSPmod-TCK
<b>Сбор данных</b>				
Источник	Канал К4.4, НИЦ «Курчатовский институт»	Канал К4.4, НИЦ «Курчатовский институт»	Канал К4.4, НИЦ «Курчатовский институт»	Канал К4.4, НИЦ «Курчатовский институт»
Длина волны (Å)	0,79272	0,79272	0,79272	0,79272
Температура (К)	100	100	100	100
Детектор	RAYONIX MX-225	RAYONIX MX-225	RAYONIX MX-225	RAYONIX MX-225
Пр. группа	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a , b , c (Å)	73,21; 101.02; 1 08,89	70,71, 100,40, 108,67	68,84, 98,56, 108,26	73.32, 101.10, 108.76
α, β, γ (°)	90,0	90,0	90,0	90.0
Число независимых рефлексов	55364 (3999)	63282 (4622)	20453 (1476)	63282
Разрешение (Å)	20,0–2,00 (2,10–2,00)	47,8–1,88 (1,93–1,88)	44,9–2,72 (2,79–2,72)	19.98–2.30 (2.36–2.30)
Полнота набора (%)	99,90 (99,89)	99,80 (99,78)	99,92 (99,86)	99.71 (99.01)
Повторяемость	7,84 (4,22)	7,25 (4,31)	6,18 (5,96)	7.92 (4614)
⟨I/σ(I)⟩	23,3 (5,45)	10,15 (2,09)	8,45 (2,11)	7.98 (2.14)
Rmrgd-F (%)	5,2 (26)	4,9 (31)	6,1 (29)	5.7 (24)
<b>Уточнение</b>				
R fact (%)	20,8	20,9	25,2	19.1
Rfree . (%)	24,9	25,2	30,5	23.3
RMSD длин связей (Å)	0,01	0,01	0,004	0.008
RMSD углов (°)	1,63	1,63	1,02	1.65
<b>Карта Рамачандрана</b>				
Наиболее предпочтительные	99,2	99,2	99,2	99.6

области (%)				
Допустимые области (%)	0,8	0,8	0,8	0.4
Число атомов				
белок	5545	5534	5531	5545
вода	216	386	50	328
лиганды	70	28	42	124
B-фактор (Å <sup>2</sup> )	28.432	29.393	28.828	27.2

В скобках приведены значения для последнего слоя.

$$* R_{\text{mrgd-F}} = 2 \frac{\sum_{\text{hkl}} \langle I_1(\text{hkl}) \rangle - \langle I_2(\text{hkl}) \rangle}{\sum_{\text{hkl}} \langle I_1(\text{hkl}) \rangle + \langle I_2(\text{hkl}) \rangle}$$

**Таблица 6.** Сбор, обработка и анализ дифракционных данных, полученных на источниках синхротронного излучения SPring8 и ESRF

PDB_ID	7YWP PSP-TCK	7ZJZ PSPS532A	7YWS PSPmod	7YX7 PSPmod
<b>Сбор данных</b>				
Источник	ESRF (ID23-1beamline)	SPring 8	SPring 8	SPring 8
Длина волны (Å)	0.98	0.8	1	0.8
Температура (К)	100	100	100	100
Детектор	PILATUS 6M	DECTRIS EIGER X 16 M	DECTRIS EIGER X 16 M	DECTRIS EIGER X 16 M
Пр. группа	P2(1)2(1)2(1)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a, b, c (Å)	75.529, 89.660, 108.650	72.86; 100.45; 108.92	72.40, 100.45, 108.66	72.95, 100.53, 108.88
α, β, γ (°)	90.0	90.0	90.0	90.0
Число независимых рефлексов	37,524 (5487)	63693 (9183)	86543 (12364)	78,927 (12166)
Разрешение (Å)	30.00–2.20 (2.32–2.20)	30.0–1.90 (2.00–1.90)	30.0–1.70 (1.79–1.70)	30.0–1.72 (1.81–1.72)
Полнота набора (%)	98.57 (99.90)	99.96 (100.00)	98.80 (98.00)	92.50 (98.80)
Повторяемость	4.14 (4.27)	7.15 (2.27)	6.40 (6.16)	4.29 (4.67)
⟨I/σ(I)⟩	6.6952 (3.89)	3.32 (2.02)	9.46 (2.18)	3.33 (2.10)
R <sub>mrgd-F</sub> (%)	7.8 (19)	11.5 (57)	5.3 (35)	17.3 (32)
<b>Уточнение</b>				
R fact (%)	18.8	19.7	18.7	20.1
R <sub>free</sub> (%)	25.4	24.9	21.8	23.9
RMSD длин связей (Å)	0.008	0.009	0.011	0.011
RMSD углов (°)	1.566	1.578	1.704	1.634
Карта Рамачандрана				

Наиболее предпочтительные области (%)	99.6	99.2	99.2	99.2
Допустимые области (%)	0.4	0.8	0.8	0.8
Число атомов				
белок	5531	5547	5545	5545
вода	417	398	518	607
лиганды	20	56	42	14
В-фактор ( $\text{Å}^2$ )	22.96	40.059	25.270	15.470

В скобках приведены значения для последнего слоя.

$$* R_{\text{mrgd}}-F=2\sum_{\text{hkl}}\langle I_1(\text{hkl})\rangle-\langle I_2(\text{hkl})\rangle/\sum_{\text{hkl}}\langle I_1(\text{hkl})\rangle-\langle I_2(\text{hkl})\rangle$$

### *Ферментативные исследования*

Кинетические параметры гидролиза субстрата PSP дикого типа и модифицированными вариантами определяли, как описано в [187]. Гидролиз р-нитроанилидных субстратов (BAPNA, Z-RR-pNA и Z-KR-pNA) проводили при 25°C и контролировали спектрофотометрически по образованию свободного р-нитроанилина ( $\Delta\epsilon_{405} = 10,400^{\text{M}^{-1}} \times \text{cm}^{-1}$ ) при длине волны 405 нм. Реакцию гидролиза проводили в буфере 0,1 М Трис-НСl, рН 8,0, 2% ДМСО. Эксперименты проводили при разных концентрациях фермента в двух-трех повторах.

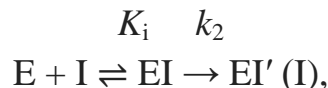
Линейный участок кинетической кривой (не более 10% гидролиза) использовали для определения начальной скорости гидролиза. При расчёте кинетических констант для каждого субстрата делали не менее 10 разведений в диапазоне концентраций 0,02–0,4 мМ. Для всех концентраций субстрата, ошибка не превышала 5–10%. Уравнение Михаэлиса-Ментен использовали для расчёта  $K_{\text{cat}}$  и  $K_{\text{m}}$ , расчёт вели с использованием нелинейной регрессии.

Изучение влияния спермина на начальную скорость гидролиза и изучение влияния ТСК на каталитическую активность PSP проводили с использованием 0,1 мМ BAPNA. Реакции проводили в двух или трехкратных повторах для каждой концентрации спермина или ТСК.

Реакцию алкилирования между PSP (E) и ТСК (I) проводили в объёме 200 мкл. Фермент брали в концентрации 70 нМ, ТСК - 50–260 мкМ. Периодически, аликвоты по 30 мкл использовали для определения остаточной активности фермента.

Кинетические параметры реакции алкилирования между E и I определяли для необратимого ингибирования фермента при условии  $[I] \gg [E]$ , как описано [205] [206,207].

Для каждой концентрации ТСК константа скорости инактивации псевдопервого порядка,  $k'$ , определялась из графиков зависимости  $\ln[E] = -k't + \ln[E_0]$ , где  $[E]$  - концентрация активного фермента в момент времени ( $t$ ), а  $[E_0]$  — начальная или общая концентрация фермента. Реакцию инактивации описывали уравнением:



где  $K_i$  — константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор, а  $k_2$  — константа скорости второго порядка для стадии алкилирования [205–207].

При необратимом ингибировании, константа скорости псевдопервого порядка ( $k'$ ) зависит от концентрации ингибитора согласно уравнению Михаэлиса–Ментен.

$$k' = k_2 [I] / (K_i + [I]) \quad (1)$$

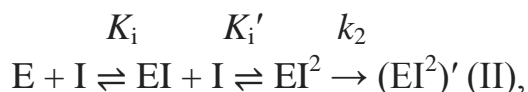
Из графика обратной зависимости кажущейся константы скорости псевдопервого порядка ( $k'$ ) от обратной зависимости концентрации ингибитора ( $[I]$ ):

$$1/k' = (K_i/k_2)(1/[I]) + 1/k_2 \quad (2)$$

были получены кинетические константы ингибирования.

Для PSPmod рассматривалась как классическая теория ингибирования сериновых протеаз одной молекулой специфического хлорметилкетона [205–207], так и случай, когда две молекулы ингибитора связываются с одной молекулой фермента.

В случае, когда фермент связывает не одну, а две молекулы ингибитора, общая схема реакции ингибирования последовательного связывания двух молекул ингибитора имеет вид (II):



где  $K_i'$  — константа диссоциации комплекса с двумя молекулами ингибитора. В этом случае зависимость константы скорости ингибирования псевдопервого порядка ( $k'$ ) от концентрации ингибитора принимает вид, соответствующий не уравнению (1), а уравнению (3):

$$k' = k_2 [I]^2 / (K_i K_i' + K_i' [I] + [I]^2) \quad (3)$$

где константа скорости стадии алкилирования ( $k_2$ ) и константа диссоциации комплекса фермента с одной молекулой ингибитора ( $K_i$ ) соответствуют этим параметрам на схеме (I);  $K_i'$  — константа диссоциации комплекса фермента с двумя молекулами ингибитора. В этом случае на

графике в координатах  $1/k'$  ( $1/[I]$ ) эта зависимость принимает вид полиномиальной кривой 2-й степени, описываемой уравнением (4):

$$1/k' = (K_i K_i' / k_2)(1/[I]^2) + K_i' / k_2 (1/[I]) + 1/k_2 \quad (4)$$

Все три кинетических параметра можно определить из графика соответствующей зависимости.

В зависимости от различной эффективности связывания первой и второй молекул ингибитора с активным центром фермента, соотношения констант равновесия  $K_i$  и  $K_i'$ , а также концентрации ингибитора, уравнения (3) и (4) можно упростить. В частности, если 1-я молекула ингибитора связывается намного эффективнее, чем 2-я, и концентрация ингибитора высока ( $K_i \gg K_i'$ ;  $[I] \gg K_i K_i'$ ), уравнения (3) и (4) принимают вид (5) и (6), которые соответствуют уравнениям (1) и (2), где  $K_i'$  используется вместо  $K_i$ :

$$k' = k_2 [I] / (K_i' + [I])$$

$$1/k' = (K_i' / k_2)(1/[I]) + 1/k_2 \quad (6)$$

Уравнение (6) соответствует прямой линии в координатах  $1/k'$  vs.  $1/[I]$ . При уменьшении концентрации ингибитора должно наблюдаться отклонение экспериментальной кривой от прямой линии.

#### *Спектроскопия кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ диапазоне*

Эксперименты проводили на базе Центра коллективного доступа «Промышленная биотехнология» Федерального исследовательского центра «Основы биотехнологии» РАН. Спектры КД и спектры поглощения белка записывали при 20 °С на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Leatherhead, Surrey, UK) с шириной щели 1 нм в диапазоне длин волн 180–320 нм и шагом 1 нм. Длина оптического пути была 10 мм. Эксперименты проводили в двух повторах. Белок был разведён в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 8,0 до концентрации 1 мг/мл. Концентрацию белка контролировали по коэффициенту экстинкции пептидной связи при 205 нм.

#### *Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСФ)*

Образцы белка (2 мг/мл) готовили в 25 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,83, в двух повторах с добавлением или без добавления 2 мМ спермина. Избыточную теплоемкость денатурации измеряли на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М с капиллярными ячейками объемом 467 мкл. Эксперимент проводили при постоянном давлении 2,2 атм при скорости нагрева 1 град/мин.

### *Определение конформации белка в растворе с помощью МУРР*

Эксперименты МУРР проводились на линии пучка BM29 в ESRF (Гренобль, Франция) с использованием PILATUS3 2M 0n-vas (DECTRIS, Баден, Швейцария). Образцы белка готовили в трех концентрациях (4,5, 9 и 18 мг/мл) в буфере 20 мМ TrisHCl, pH 8,0 и 100 мМ NaCl. МУРР измеряли при 20 °С. Доставка проб и измерения проводились с использованием кварцевого капилляра диаметром 1 мм, входящего в состав автоматизированного блока смены проб BioSAXS. До и после измерения каждого образца измеряли и усредняли соответствующий буфер. Была использована экспериментальная схема: ток пучка — 200 мА, поток —  $2,6 \times 10^{12}$  фотонов/сек, длина волны — 1 Å, расчетный размер пучка — 1 мм × 100 мкм. Всего с каждого образца было снято 10 кадров (1 кадр в секунду).

Для обработки профилей МУРР использовали программное обеспечение для анализа данных ATSAS 3.0.3 [208] и BioXTAS RAW [209]. Радиус вращения ( $R_g$ ) и полное рассеяние вперед под нулевым углом ( $I(0)$ ) рассчитывались с использованием приближения Гинье.

Функция распределения парных расстояний и максимальный размер частиц были рассчитаны с использованием GNOM [210]. Теоретические кривые рассеяния были рассчитаны для ферментов в разных конформациях и сопоставлены с экспериментальными кривыми с помощью программ. FOXS [211] и CRY SOL [212]. Для получения теоретических кривых использовали кристаллические структуры белка в закрытой (7YWP) и промежуточной (7OB1) конформациях и модель открытой конформации, полученной с помощью моделирования по гомологии.

### *Моделирование открытой конформации PSP*

Первоначально, с помощью моделирования по гомологии была получена модель открытой конформации PSP [187]. В качестве шаблона для моделирования была выбрана трехмерная структура TbOpV в открытой конформации (PDB ID 4BP8). Далее полученную модель подвергли МД симуляции. Для структур, сгенерированных в процессе МД симуляции, строили теоретические кривые МУРР и проводили сравнение теоретических с экспериментальными данными МУРР. Таким образом, была выбрана модель, максимально соответствующая экспериментальным данным.

### *Молекулярно динамический эксперимент.*



МД-симуляции были выполнены с использованием программного пакета GROMACS (выпуск 2021.4) [213], скомпилированного с поддержкой CUDA для использования графического процессора (использовался графический процессор RTX 3090) и силового поля Amber ff99SB-ILDN [214]. В качестве исходной структуры для моделирования была взята кристаллическая структура PSP-S532A (7ZJZ), в которой аминокислотный остаток A532 был заменен на S532 (как в PSP дикого типа). Эта замена была произведена с помощью программных средств UCSF Chimera [215]. Белок сольватировали водой типа SPC в периодическом прямоугольном блоке с расстоянием между растворенным веществом и блоком 1,2 нм. Заряд системы нейтрализовали заменой молекул растворителя на  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  ионы до концентрации 0,15 М. Для системы в качестве стандартного протокола моделирования использовалось уравнивание, состоящее из стадии минимизации энергии, а также стабилизации температуры и давления. Температура и давление в системе независимо поддерживались с помощью алгоритмов модифицированного термостата Берендсена [216] и баростата Парринелло-Рахмана [217] при постоянной температуре и давлении 300 К и 1 бар соответственно. Для расчета дальнедействующих электростатических взаимодействий использовали алгоритм Эвальда [218]. Моделирование МД выполнялось в течение 200 нс, а данные собирались каждые 20 пс. Стабильность структуры белка на траектории МД проверяли путем расчета среднеквадратичных отклонений (СКО) для атомов С $\alpha$ , а также путем предсказания содержания вторичной структуры с помощью алгоритма dssp [204,208]. Все параметры для анализа траектории МД рассчитывались с использованием подпрограмм GROMACS.

### *Биоинформатическое исследование*

Базу данных UniProtKB [219] использовали и для поиска аминокислотных последовательностей и таксономических аннотаций, относящихся к коду ЕС: 3.4.21.83. Из массива были исключены последовательности с неопределенной таксономической классификацией. Программу Clustal Omega v.1.2.1 [220] использовали для получения множественных выравниваний. Программы Jalview [221] и Fast Tree с моделью эволюции аминокислот Уилана Голдмана и алгоритмом максимального правдоподобия [222] использовали для визуализации и построения филогенетических деревьев. Программу EMBOSS Cons.[223] использовали для выявления консенсусных последовательностей для каждой таксономической группы.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

#### 3.1 Структурные исследования PSP, её мутантов и комплексов методом РСА.

Кристаллизацию PSP, её мутантов и комплексов проводили на базе ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии НИЦ «Курчатовский институт». При проведении кристаллизационных экспериментов использовали белки PSP – рекомбинантный белок дикого типа, содержащий N-концевой полигистидиновый таг, PSPmod - мутантную PSP, в которой первый шарнирный пептид заменён на сайт расщепления протеазой TEV, каталитически неактивные мутанты PSP и PSPmod, в которых каталитический серин был замещён остатком аланина: PSP-S532A и PSPmod-S532A, а также PSP и PSPmod, несущие активирующую мутацию E125A (PSP-E125A и PSPmod-E125A).

Для получения комплексов использовали белки PSP и PSPmod и известный ковалентный ингибитор сериновых и цистеиновых протеаз ТСК. ТСК представляет собой модифицированный остаток лизина, который тозилрован на N-конце и хлорметилован на С-конце (рисунок 14) ТСК образует ковалентную связь с каталитическим Cys в цистеиновых протеазах и две ковалентные связи с двумя каталитическими остатками Ser и His в сериновых протеазах [224–227]. Кристаллические структуры лизин-специфичной эндопротеиназы из *Lysobacter enzymogenes* (LysC) и ее варианта K30R в комплексах с ТСК хорошо иллюстрируют строение тетраэдрических интермедиатов каталитической реакции [225].

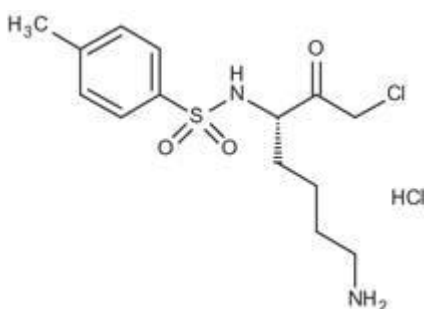


Рисунок 14. N-*p*-тозил-лизилхлорметилкетон (ТСК)

Так как первоначальный кристаллизационный скрининг не выявил условий роста кристаллов, то было решено провести поиск условий, способствующих кристаллизации PSP, методом ДСФ.

### 3.1.1 Поиск условий, способствующих кристаллизации PSP, методом дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Известно, что увеличение стабильности, в том числе термостабильности, белка способствует повышению результативности структурных исследований, в первую очередь, рентгеноструктурного анализа (РСА) [228,229].

Метод ДСФ был разработан для быстрого определения термостабильности белков в разных условиях. В основе метода лежит использование термостабильных флуоресцентных красителей, которые способны неспецифически связываться с гидрофобными участками белка. Когда белок подвергается тепловой денатурации при повышении температуры, происходит разворачивание гидрофобного ядра, и гидрофобные участки становятся доступными молекулам красителя. При этом происходит возрастание квантового выхода флуоресценции, т.к. снимается гашение флуоресценции молекулами воды. Основным преимуществом метода является то, что его применение не требует специализированного оборудования. Кривые тепловой денатурации строят исходя из интенсивностей флуоресценции, измеренной с помощью РВ-амплификатора.

Метод ДСФ [228] был применён нами для подбора условий, способствующих кристаллизации PSP и её производных. Различные условия, в которых определяли термостабильность белка приведены в таблице 7. Таблица 8 и рисунок 15 показывают, при каких условиях и как повышалась термостабильность PSP.

**Таблица 7.** Поиск факторов, стабилизирующих PSP в растворе

Условия, в которых анализировали стабильность PSP методом термофлуор		Результаты
Изменяемые параметры реакционной смеси	Используемые буферы, соли и другие добавки	
рН	5.5 (Citrate Na), 6.5(Cacodylate Na), 7.5 (HEPES), 8.0 и 9.0 (TrisHCl)	-*
Ионная сила	NaCl – 0.1 и 0.75 М	-*
Двухвалентные катионы	CaCl <sub>2</sub> – 0.5 и 1 М, MgSO <sub>4</sub> – 0.5 и 1.5 М	-*
Детергенты	CHAPS – 0.5%, октилглюкопиранозид – 1 и 5%, Тритон X100 – 5%	-*

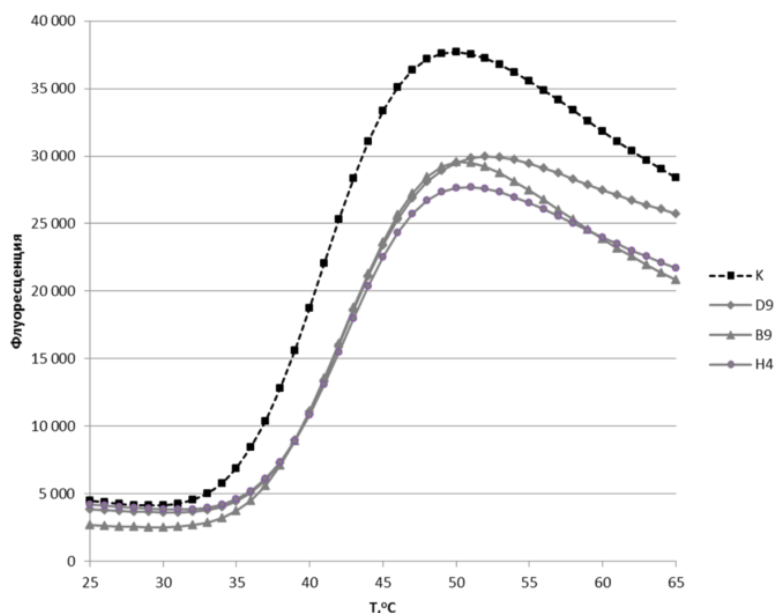
Вязкость раствора	Глицерин – 5 и 10%, сахароза – 50 и 200 мМ	-*
Специальные добавки	Набор Silver Bullet (Hampton Research), 96 условий	+**

\*Термостабильность не увеличивается.

\*\*Термостабильность увеличивается в присутствии полиаминов (табл. 3).

**Таблица 8.** Условия, повышающие термостабильность PSP

Код раствора в наборе Silver Bullets	Состав раствора	$T_{пл}$ PSP, °C
Контроль	Без добавок	$40.08 \pm 0.04$
D9	1,2-Диаминоциклогексана сульфат, 4-нитробензойная кислота, цистаминадигидрохлорид, спермин, ХЕПЕС, pH 6.8	$42.05 \pm 0.05$
H4	1,4-Диаминобутан, 1,8-диаминооктан, кадаверин, цистамина дигидрохлорид, спермидин, спермин, ХЕПЕСрН, 6.8	$42.71 \pm 0.07$
B9	Хлорид гексаамминкобальта(III), салициламид, сульфаниламид, ванилиновая кислота, ХЕПЕС, pH 6.8	$42.37 \pm 0.12$



**Рисунок 15.** Изменение кривой плавления PSP в присутствии низкомолекулярных полиаминов, определенное методом ДСФ. Серые линии – кривые плавления PSP в присутствии растворов D9, H4, B9 из набора Silver Bullets (таблица 8). Черная линия – контрольная кривая плавления PSP. Приведены средние значения по трем независимым экспериментам

Результаты дифференциальной сканирующей флуориметрии показывают, что PSP имеет температуру плавления ( $T_{пл}$ ) в районе 40°C. Это соответствует ранее опубликованным результатам [190,192,230]. В данной работе мы показали, что в присутствии низкомолекулярных полиаминов (спермидин, спермин, цистамин и кадаверин)  $T_{пл}$  увеличивается более чем на 2°C. Повышение термостабильности PSP при добавлении полиаминов возможно связано с нейтрализацией отрицательных зарядов на поверхности белка. Такой же эффект наблюдается в случае нуклеиновых кислот, которые часто кристаллизуют в присутствии полиаминов [231].

В дальнейшем все кристаллизационные эксперименты проводили в присутствии полиамина – спермина (Sp). В результате из семи белков, используемых в кристаллизационных экспериментах для шести были получены кристаллы, пригодные для PCA. Условия кристаллизации белков приведены в таблице 4. Из таблицы 4 следует, что больше всего кристаллов и кристаллических структур было получено для PSPmod и её производных. Одна структура была получена для PSPmod в комплексе с ТСК. Только две кристаллические структуры были получены для PSP и её производных. Из них одна структура была получена для PSP в комплексе с ТСК, а вторая для PSP-S532A в свободной форме. Кристаллы PSP-E125A получить не удалось.

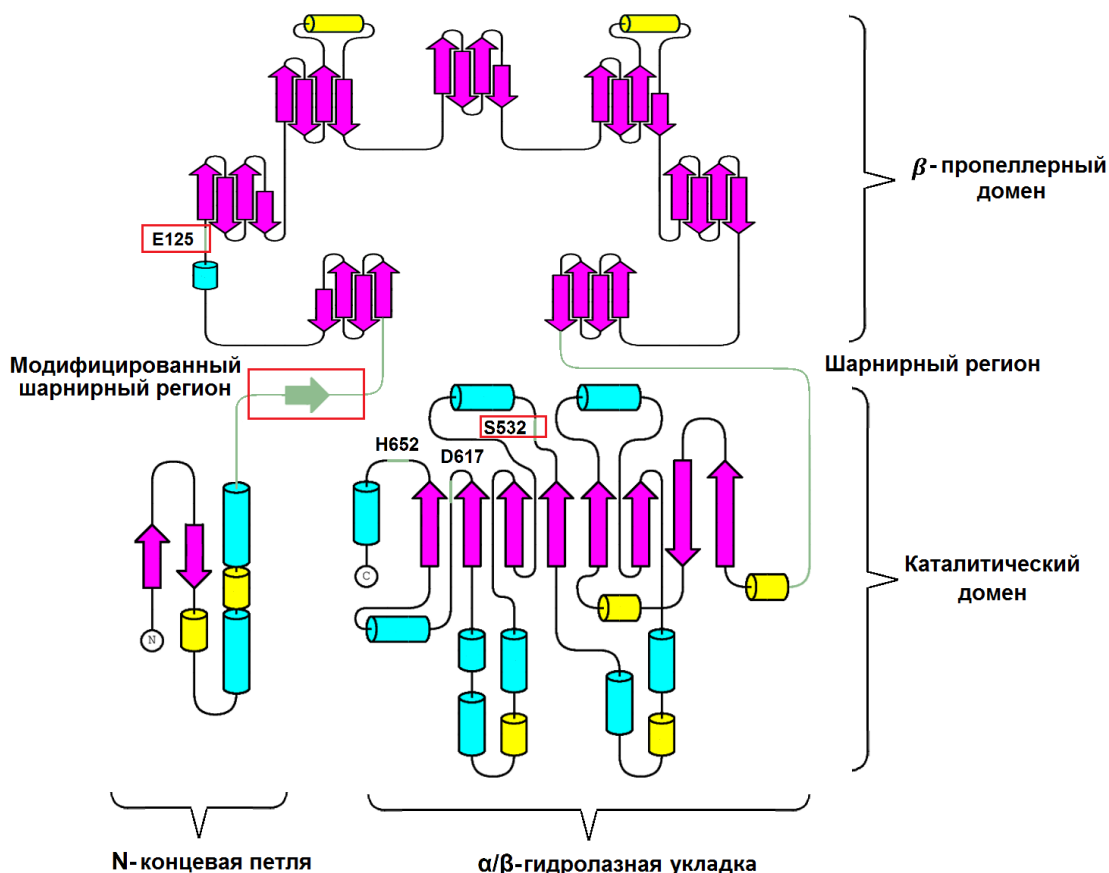
Рентгеноструктурный эксперимент проводили на синхротронных источниках рентгеновского излучения НИЦ «Курчатовский институт» (Москва), Spring8 (Япония) и ESRF (Гренобль, Франция), обработку дифракционных данных, а также решение и уточнение структур проводили, как описано в Материалах и методах (таблицы 5 и 6).

### **3.1.2 Характеристика мутантных вариантов PSP, используемых в рентгеноструктурных экспериментах.**

Как уже было сказано выше, для рентгеноструктурных экспериментов использовали препараты PSP дикого типа и мутантные варианты (таблица 4).

В частности, нами был получен мутант, в котором последовательность первого шарнирного пептида (аминокислоты 71-77, IPQQEHS) была заменена на сайт TEV (ENLYFQ\*S) (рисунок 15). Получение данного мутанта было связано с тем, что химотрипсинолиз PSP в нативных условиях вызывал образование полипептида с молекулярной массой, уменьшенной на 10 кДа (с удалённой N-концевой областью), который был активен не только в отношении p-нитроанилидных субстратов, но и в отношении белкового субстрата азоказеина [193]. Этот продукт ограниченного протеолиза не был стабилен и подвергался дальнейшей деградации. Продукция в *E.coli*

укороченного PSP с удалённой N-концевой петлёй приводила к экспрессии нерастворимого белка, теряющего активность при рефолдинге. Поэтому было решено ввести сайт TEV-протеазы в первый шарнирный пептид методом сайт-направленного мутагенеза.



**Рисунок 15.** Топологическая схема третичной структуры OrV, подготовленная с помощью TOPDRAW [232] с использованием кристаллической структуры PSPmod. В каталитическом и  $\beta$ -пропеллерном доменах области петель показаны черным цветом,  $\alpha$ -спирали - голубым,  $\beta$ -нити - фиолетовым и  $3_{10}$ -спирали - желтым цветом. Шарнирные области между двумя доменами и остатки каталитической триады показаны бледно-зеленым цветом. Нумерация остатков каталитической триады соответствует последовательности PSP. Модифицированные остатки отмечены красным квадратом.

Полученный мутантный белок с модифицированной шарнирной областью (PSPmod) экспрессировали в *E. coli* и очищали до гомогенности. Сайт распознавания TEV был подтвержден масс-спектрометрией Maldi-TOF, однако TEV-протеаза не гидролизовала белок. Предположительно это было связано с сильными взаимодействиями шарнирных пептидов между собой и с соседними участками белка.

Так как первые кристаллы были получены именно для PSPmod и его производных, несущих дополнительные точечные замены, то был проведён

сравнительный анализ физико-химических свойств и ферментативной активности данных ферментов.

Результаты сравнения олигомерного состава (по данным ГФХ), представленности элементов вторичной структуры (по данным КД) и термостабильности (по данным ДСК) PSP и PSPmod представлены на рисунке 16 А–В.

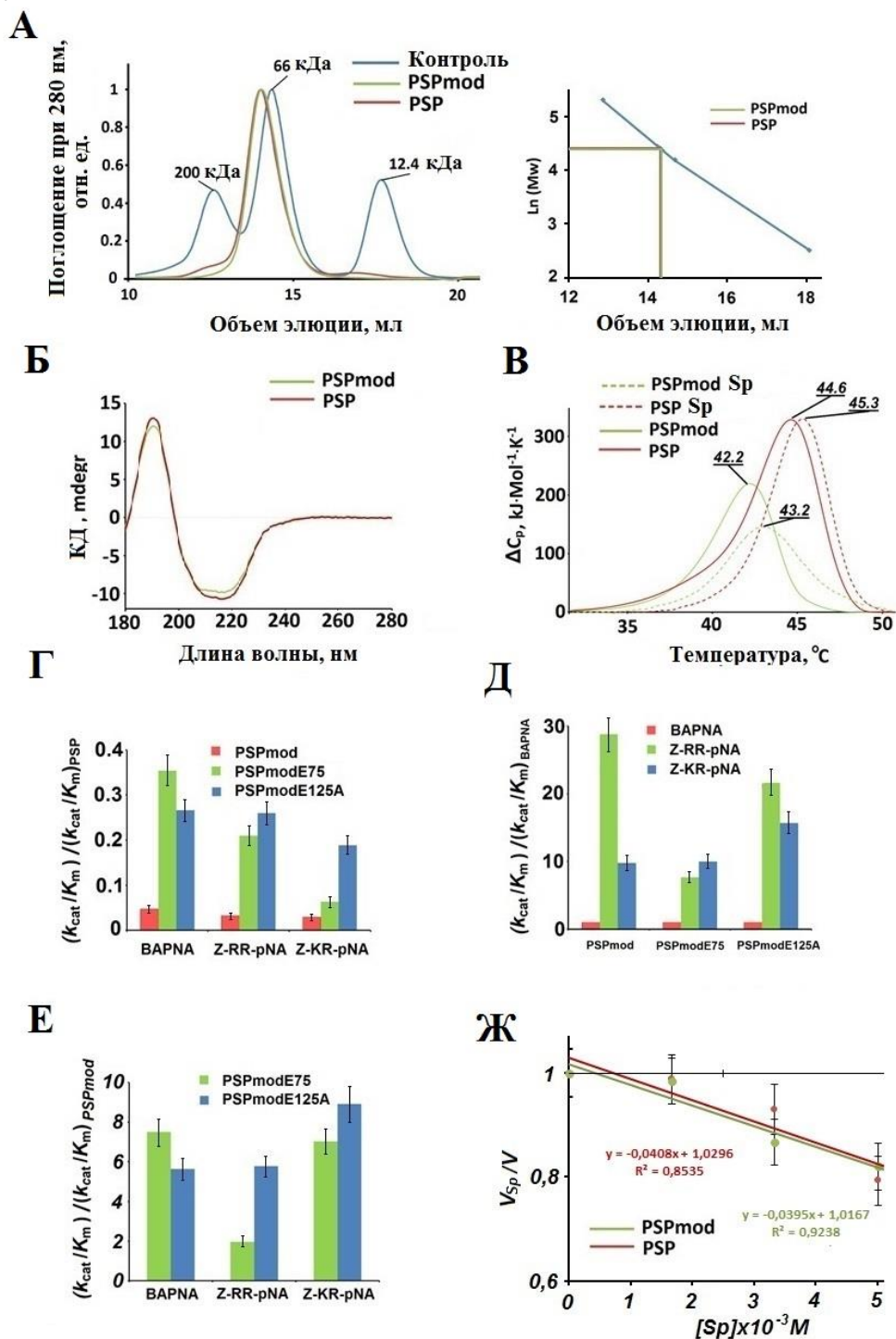


Рисунок 16. Сравнительный анализ физико-химических свойств и ферментативной активности PSPmod. А. Гистограмма ГФХ на колонке Superdex 200 10/300 GL. Белки (2

мг/мл) элюировали 20 мМ Трис-НСl (рН 7,8) и 100 мМ NaCl; Б. Спектры КД, нормированные на значение оптической плотности (0,5 при 205 нм). Спектры поглощения измеряли одновременно с КД. Представлены средние значения 3 измерений; В. Температурная зависимость избыточной теплоемкости денатурации ( $\Delta C_p$ ), измеренная методом ДСК для PSP и PSPmod в присутствии и в отсутствие спермина. Во всех случаях 2,0 мг/мл белка растворяли в 25 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,8) с добавлением 2 мМ Sp, где это указано. Температуры максимумов кривых плавления ( $T_{max}$ ) показаны в верхней части пиков; Г – Е. Кинетические параметры гидролиза ( $k_{cat}/K_m$ ), нормированные, как указано в легенде по оси Y. Соответствующие параметры для PSP дикого типа (Г) и PSPmod (Е) по отношению к указанным субстратам равны 1 и не показаны; Ж. Влияние спермина на начальные скорости гидролиза BAPNA с помощью PSP и PSPmod.

Рисунок 16А показывает, что и белок дикого типа, и модифицированный вариант являются мономерами (молекулярная масса 80 кДа, расчётное значение 76 кДа). Действительно, исходя из литературных данных, функциональными единицами OpV  $\gamma$ -протеобактерий являются мономеры [192,233,234], тогда как TbOpV и LmOpV формируют димеры в растворе [180,186]. Аналогично, нативный и модифицированный белки имели сходные спектры КД (рисунок 16Б).

Тепловую денатурацию PSP и PSPmod изучали методом ДСК при концентрации белка 2,0 мг/мл в 25 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,8). Соответствующие кривые плавления представлены на рисунке 16В. Видно, что положения максимумов кривых плавления ( $T_{max}$ ) PSPmod и PSP отличаются незначительно (на 2 °С), а определённая  $T_{max}$  (44,6 °С для PSP) коррелирует с ранее изученной термической инактивацией фермента [230]. Инкубация при 43°С вызывала обратимую денатурацию PSP, а нагревание до 46°С приводило к необратимой потере активности.

Кроме того была измерена ферментативная активность PSPmod в отношении трёх р-нитроанилидных субстратов: BAPNA (субстрат без остатка в P2-положении, взаимодействующий только с сайтом связывания субстрата S1) и субстраты Z-(R/K)R-pNA, с разными основными остатками в положении P2. Сравнение эффективности гидролиза ( $k_{cat}/K_m$ ) с эффективностью гидролиза PSP дикого типа представлено на рисунке 16Г-Е и в таблице 9.

Видно, что PSPmod проявляет низкую активность по отношению ко всем субстратам, составляющую от 3 до 5% от активности PSP. При этом такие характеристики субстратной специфичности PSP, как повышенная активность по отношению к двухосновным субстратам или предпочтение остатка Arg перед Lys в положении P2, сохраняются.



**Таблица 9.** Кинетические параметры гидролиза трех субстратов исследуемыми ферментами (0,1 М трис-НСl, рН 8,0; 2% ДМСО, 25 °С). Стандартная ошибка не превышает 10%.

Фермент	BAPNA			Z-RR-pNA			Z-KP-pNA		
	$k_{cat}$ мин <sup>-1</sup>	$K_m$ μМ	$k_{cat} / K_m$ $\times 10^{-7}$ М <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ мин <sup>-1</sup>	$K_m$ μМ	$k_{cat} / K_m$ $\times 10^{-7}$ М <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ мин <sup>-1</sup>	$K_m$ μМ	$k_{cat} / K_m$ $\times 10^{-7}$ М <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup>
PSPmod	91,7	188,8	0,049	157,3	11,18	1,41	592,8	124,4	0,477
PSPmod E75	603,1	165,5	0,364	960	34,65	2,77	805,7	24,0	3,36
PSPmod E125A	728,7	265,6	0,274	424,0	5,92	8,15	493,3	11,6	4,25
PSP	791,2	78,1	1,01	2181,2	4,35	50,1	3045,6	20,8	14,6

Мы попробовали найти причину потери активности PSPmod. Модификация шарнирной области включала замену функционально важного остатка E75 на фенилаланин. Анализ молекулярной модели закрытой конформации PSP, а также её поведения при МД симуляции, показал, что E75 является одной из структурных детерминант, стабилизирующих PSP в закрытой конформации [187]. Этот остаток был компонентом междоменного СМ, а мутация E75A приводила к падению активности фермента в отношении р-нитроанилидных субстратов на 82-92% [187]. Обратная мутация по восстановлению глутамата (F75E), наоборот, увеличивала каталитическую активность фермента PSPmodE75 в отношении р-нитроанилидных субстратов по сравнению с PSPmod в 7, 2 и 7 раз (рисунок 16Д), т.е. потеря активности PSP, связанная с модификацией шарнирного региона, частично компенсировалась мутацией F75E (рисунок 16Г).

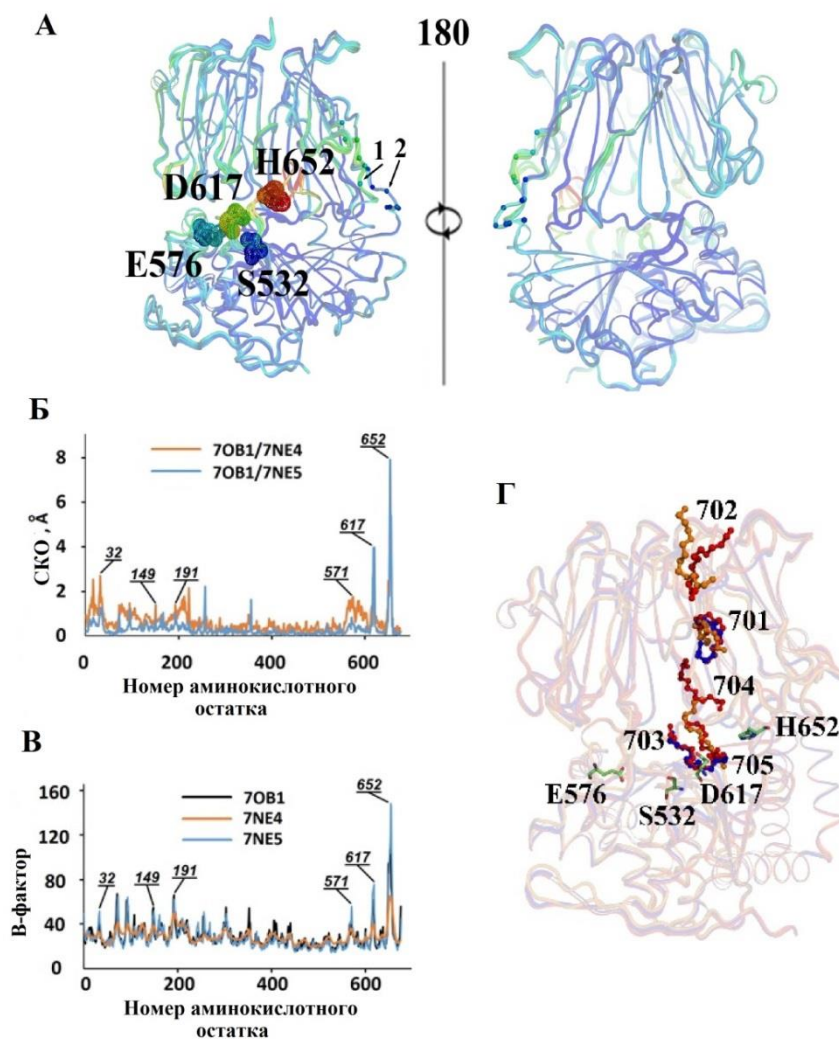
Частичное восстановление каталитической активности PSPmod также наблюдалось после замены на аланин остатка Glu125 из β-пропеллерного домена. В нативном ферменте этот остаток также был компонентом междоменного СМ, причём мутация E125A приводила к увеличению активности PSP в отношении р-нитроанилидных субстратов в 2-8 раз [187]. При введении аналогичной мутации в PSPmod, эффективности гидролиза ( $k_{cat}/K_m$ ) PSPmodE125A возрастала в 6-9 раз (рисунок 16Е). Это увеличение также компенсировало потерю активности PSP, связанную с модификацией шарнирного региона (рисунок 16Г).

Мы также исследовали влияние Sp на термостабильность и каталитическую активность PSP с нативным и модифицированным шарнирным пептидом. При проведении гидролиза BAPNA в присутствии 5 мМ Sp для обоих ферментов наблюдали 20% ингибирование начальной скорости гидролиза (рисунок 16Ж). Методом ДСК было установлено, что в присутствии Sp термостабильность обоих белков (как PSP, так и PSPmod) слегка увеличивается (рисунок 16В). Стабилизирующее влияние Sp на сериновые протеазы уже было описано в литературе [235].

### **3.1.3. Сравнение кристаллических структур PSPmod и её производных между собой и со структурой PSP-S532A.**

Первоначально с использованием источника синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский Институт» были получены структуры PSPmod (PDB ID 7OB1) и её производных, PSPmodE125A (PDB ID 7NE4) и PSPmodS532A (PDB ID 7NE5), которые имели разрешения 2, 2,72 и 1,88 Å, соответственно. Наложение структур 7NE4 и 7NE5 по C $\alpha$ -атомам на структуру 7OB1 показало практическую идентичность укладки PSPmodE125A и PSPmodS532A по сравнению с PSPmod (СКО 0,9 и 0,6 Å) (рисунок 17А). Изменение величин СКО C $\alpha$  атомов вдоль полипептидных цепей, полученные при наложении структур, представлены на рисунке 17Б. Хорошо видно, что вариации укладки в основном связаны с гибкими петлями  $\beta$ -пропеллерных и каталитических доменов, имеющими высокие В-факторы (рисунок 17В).

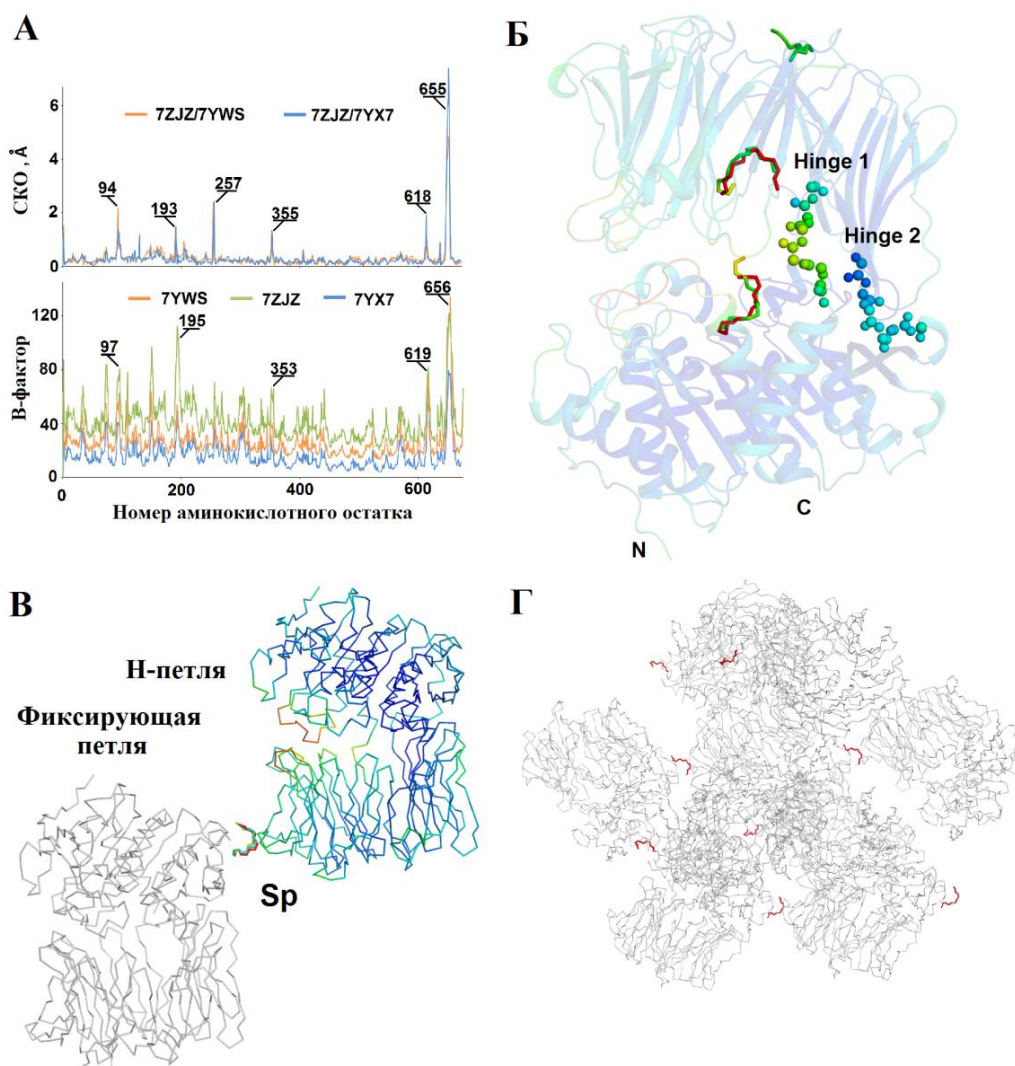
Все структуры содержали разное количество молекул спермина во внутренней полости между доменами и в центральном туннеле  $\beta$ -пропеллера, а именно, пять, три и две молекулы спермина в структурах PSPmod, PSPmodE125A и PSPmodS532A (рисунок 17Г). Максимальное количество молекул спермина, которые получили номера от 701 до 705, наблюдалось в структуре PSPmod. Sp701, обнаруженный во всех трёх структурах, и Sp702, присутствующий также в PSPmodE125A, примыкали к поверхности пропеллерного домена. Sp703, наблюдаемый также в PSPmodS532A, и Sp705, присутствующий также в PSPmodE125A, располагались в междоменной полости со стороны каталитического домена, при этом Sp703 находился в непосредственной близости от каталитического Ser532: расстояние 703C11-Ser532OG составляло 4,11 Å. Уникальный для PSPmod Sp704 располагался между доменами.



**Рисунок 17.** Сравнение структур PSPmod (PDB\_ID 7OB1), PSPmodE125A (PDB\_ID 7NE4) PSPmodS532A (PDB\_ID 7NE5). **А.** Показано наложение структур в двух проекциях. Структуры окрашены в соответствии с B-факторами. Изменение цвета от синего к красному соответствует росту величины B-фактора от низкого до высокого. Выделены остатки каталитической триады и субстрат-связывающего центра S1 PSPmod. Шарнирные пептиды пронумерованы, а их остатки показаны в виде шариков. **Б.** Распределение величин СКО  $\alpha$ -атомов, рассчитанное при попарном наложении структуры PSPmodE125A и PSPmodS532A на PSPmod. **В.** Распределение величин B-фактора для трех кристаллических структур. Остатки с самыми высокими значениями СКО и B-фактора подписаны на **Б** и **В**. **Г.** Расположение молекул спермина в структурах PSPmod (красный цвет), PSPmodE125A (оранжевый цвет) и PSPmodS532A (выделено синий цвет). Молекулы спермина показаны шариками и палочками и пронумерованы в соответствии со структурой PSPmod. Остатки каталитической триады и субстрат-связывающего центра S1 PSPmod показаны в виде зеленых палочек.

Часть полученных кристаллов снимали на японском источнике синхротронного излучения Spring8. Дифракционные данные были собраны для двух кристаллов PSPmod (PDB ID 7YWS и 7YX7) и кристалла PSP-

S532A (PDB ID 7ZJZ). Структуры были решены методом молекулярного замещения и уточнены до разрешения 1,9 Å (PSP-S532A 7ZJZ), 1,7 (PSPmod 7YWS) и 1,72 Å (PSPmod 7YX7). Все три структуры были очень похожи между собой, а также похожи на ранее полученные структуры. Наложение структуры PSP-S532A по C $\alpha$ -атомам на структуры PSPmod 7YWS и 7YX7 показало СКО 0,4 Å. Наложение двух структур PSPmod друг на друга дало СКО 0,3 Å. Аналогичные значения СКО были получены при наложении новых структур на ранее описанную структуру PSPmod (PDB ID 7OB1). На рисунке 18А показаны результаты наложения структур. Видно, что различия между ними сосредоточены в неструктурированных петлях (остатки которых имеют высокие В-факторы), соединяющих стабильные элементы вторичной структуры в обоих доменах. Таким образом, можно было заключить, что изменения шарнирного региона не оказывает сильного влияния на общую топологию молекулы.



**Рисунок 18.** Сравнение структур PSPmod (PDB\_ID 7YWS и 7YX7) и PSP-S532A (PDB\_ID 7ZJZ). **А.** Распределение величин СКО по C $\alpha$  атомам, рассчитанное при попарном совмещении структуры PSP-S532A со структурами PSPmod 7YWS и 7YX7

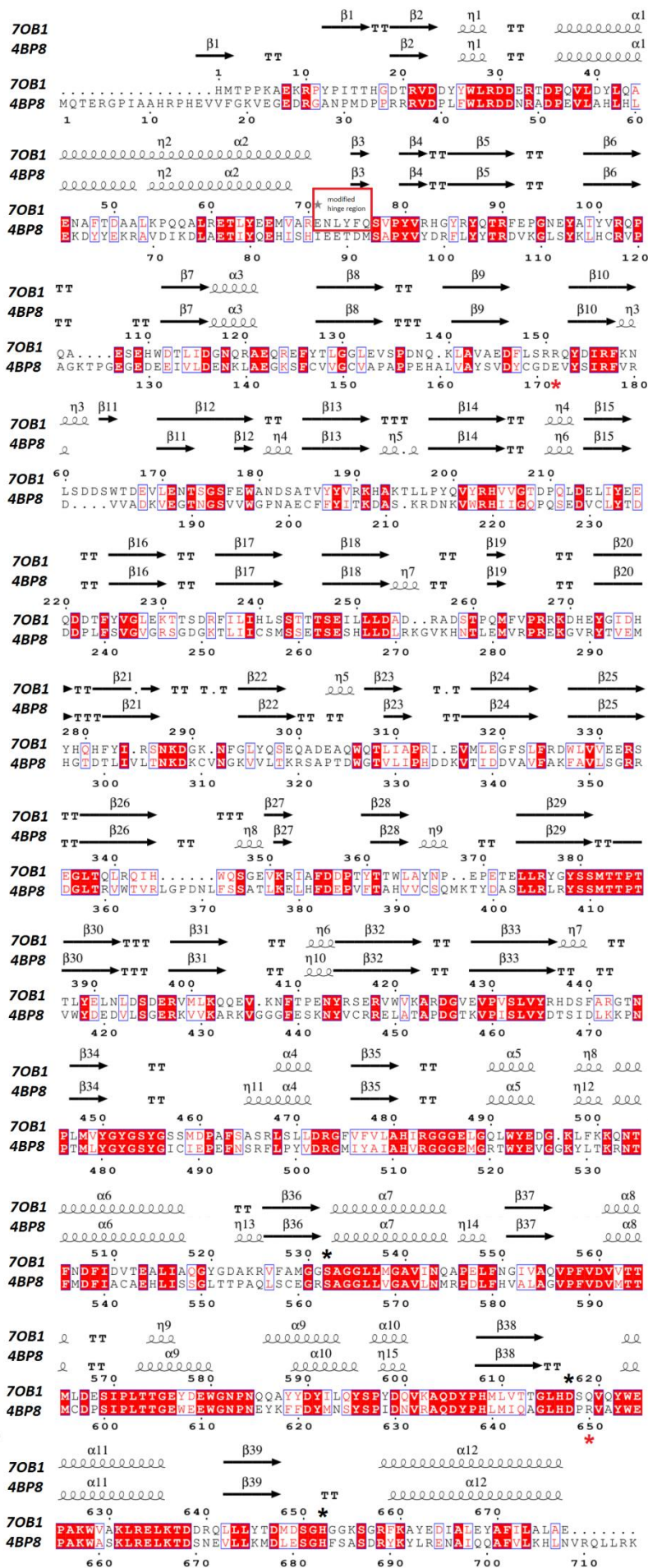
(верх), и распределение величин В-фактора для трех кристаллических структур (низ). Остатки с самыми высокими значениями СКО и В-фактора подписаны. **Б.** Структура PSP-S532A со сперминами в междоменной полости, окрашенная в соответствии с В-факторами. Изменение цвета от синего к красному соответствует росту величины В-фактора от низкого до высокого. Шарнирные пептиды пронумерованы, а их остатки показаны в виде шариков. Красным цветом показаны две молекулы спермина из структуры PSPmod 7YWS, зелёным и жёлтым цветом показаны спермины из структур 7ZJZ и 7YX7 соответственно. **В.** Консервативные молекулы спермина, локализованные вне междоменного пространства, соединяющие каталитический домен одного полипептида (серый цвет) с  $\beta$ -пропеллерным доменом другого полипептида (окраска по В-фактору) во всех трёх структурах, окрашены в зелёный, красный и оранжевый цвета. **Г.** Участие спермина (красный) в формировании кристаллической решетки

Молекулы спермина локализованы в полости между каталитическим и  $\beta$ -пропеллерным доменами только в структурах PSP-S532A и PSPmod (7YWS) (рисунок 18Б). Две молекулы спермина занимали сходные положения: одна близко к внутренней поверхности каталитического домена, а другая на входе во внутреннее пространство  $\beta$ -пропеллера. В структуре PSP-S532A была третья молекула спермина, которая располагалась вблизи верхнего входа во внутреннее пространство  $\beta$ -пропеллера. В междоменном пространстве структуры PSPmod (7YX7) спермин обнаружен не был. Во всех структурах одна молекула спермина на молекулу белка была обнаружена вне междоменной полости, где она участвовал в формировании кристаллической решетки (рисунок 18 В, Г).

### **3.1.4 Общая топология белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A.**

Полипептидная цепь рекомбинантной PSP состоит из 685 аминокислотных остатков, включая девять остатков N-концевого His-тага (MASHNNNNH), который, как правило, отсутствует на электронной плотности, за исключением последнего His из His-тага в некоторых структурах. Как уже было сказано выше, во всех полученных структурах полипептидные цепи были уложены аналогичным образом, образуя двухдоменную укладку, сходную с укладкой протозойных OpB (рисунок 19).



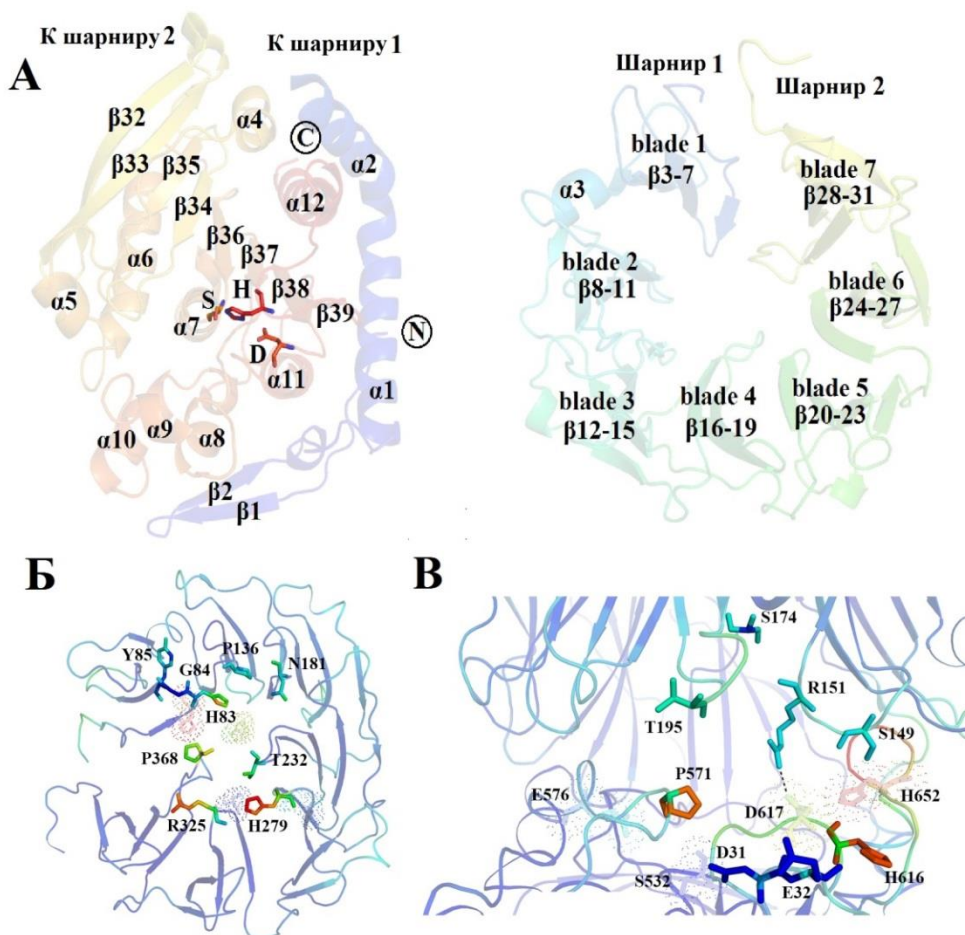


**Рисунок 19.** Множественное выравнивание последовательности и структуры PSPmod (7OB1) и TbOpB (4BP8), выполненное с помощью ESPript (<http://esprpt.ibcp.fr> по состоянию на 5 сентября 2021 г.). Высококонсервативные остатки выделены красным; полуконсервативные окрашены в красный цвет. Остатки каталитической триады и сайта связывания субстрата S1 отмечены черными звездочками; функционально-выжный междоменный солевой мостик (CM1) TbOpB отмечен красными звездочками; модифицированная шарнирная область выделена красным квадратом. Элементы вторичной структуры показаны над выравниванием.

Молекула PSP содержит каталитический домен, который в свою очередь состоит из N-концевой петли (остатки 1–70) и C-концевого  $\alpha/\beta$ -гидролазного домена (остатки 411–676), и семилопастного  $\beta$ -пропеллерного домена (остатки 77–404), в котором первая и последняя лопасти не перекрываются (рисунок 20).

$\alpha/\beta$ -гидролазная укладка содержит центральное ядро из скрученного  $\beta$ -слоя, состоящего из восьми  $\beta$ -тяжей, окруженных восемью  $\alpha$ -спиралями и семью короткими  $\eta$ -спиралями (рисунок 20А(левая панель)). Только два последних  $\beta$ -тяжа скрученного листа антипараллельны, тогда как остальные имеют параллельную ориентацию. N-концевая петля состоит из двухцепочечного антипараллельного  $\beta$ -слоя и двух  $\alpha$ -спиралей с одной короткой  $\eta$ -спиралью между ними. Петля оборачивается вокруг поверхности  $\alpha/\beta$ -гидролазного домена, примыкая к длинной C-концевой  $\alpha$ -спирали.

Поверхности каталитического и пропеллерного доменов, обращенные друг к другу, ограничивают объем междоменной полости, в которой находятся каталитический центр и субстрат-связывающий карман (рисунок 20). В-пропеллерный домен состоит из семи лопастей, каждая из которых включает четыре антипараллельных  $\beta$ -тяжа (рисунок 20А). Эти лопасти образуют бочку с воронкообразным каналом внутри, который проходит между лопастями пропеллера (рисунок 20Б). Периметр канала ограничен аминокислотными остатками гибких петель, соединяющих пары  $\beta$ -тяжей: His83-85 между  $\beta$ 4 и  $\beta$ 5; Pro368 между  $\beta$ 28 и  $\beta$ 29; Pro136 между  $\beta$ 8 и  $\beta$ 9; Asn181 между  $\beta$ 12 и  $\beta$ 13, Thr232 между  $\beta$ 16 и  $\beta$ 17; His279 между  $\beta$ 20 и  $\beta$ 21; Arg325 между  $\beta$ 24 и  $\beta$ 25 (рисунок 20Б). Расстояния между атомами C $\alpha$  аминокислотных остатков по разные стороны канала составляют 12,84, 11,68 и 12,77 Å для Pro368-Pro136, Asp234-His83, Arg82-Asp234 соответственно. Соответствующие расстояния в самой узкой части почти в два раза меньше ширины.



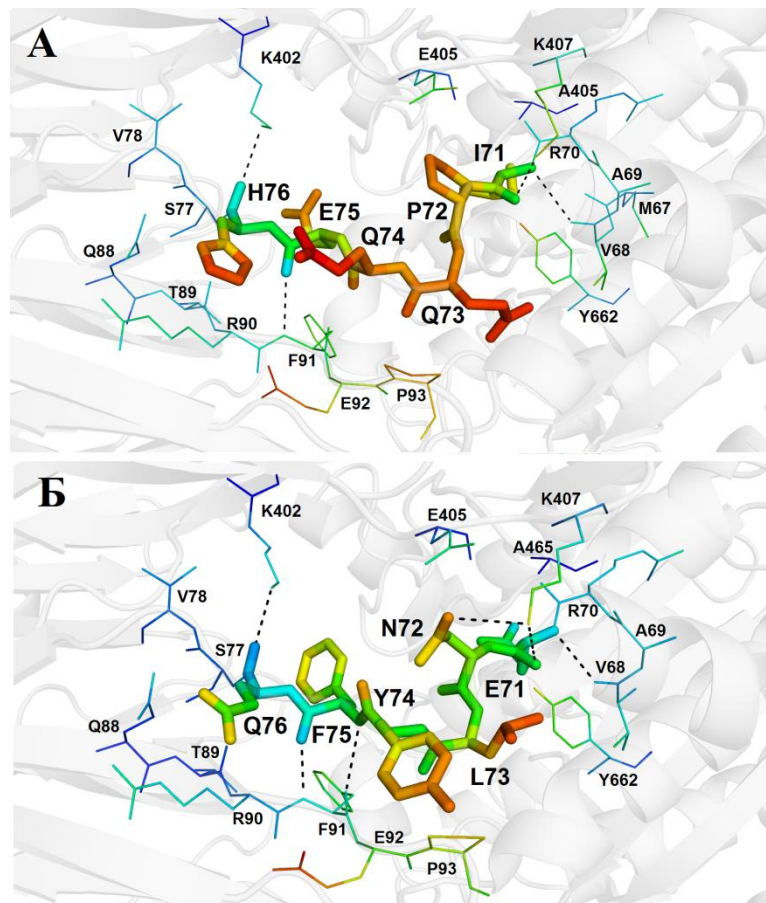
**Рисунок 20.** А. Полупрозрачные изображения структур двух доменов PSPmod: каталитический домен (слева), пропеллерный (справа). Вид изнутри междоменной полости. Цветовая кодировка выполнена в радужном стиле: N-конец выделен синим цветом, а С-конец красным. Подписаны элементы вторичной структуры и два шарнирных пептида. Каталитический домен включает N-концевую петлю (синяя окраска) и  $\alpha/\beta$ -гидролазную укладку (окраска от желтого к красному). Остатки каталитической триады показаны палочками и подписаны. Б. Изображение входа в канал, который соединяет верхнюю часть  $\beta$ -пропеллерного домена с полостью между доменами, и аминокислотные остатки, ограничивающие периметр канала. Изменение цвета с синего на красный отражает сдвиг В-факторов от низкого к высокому. В. Аналогичное представление отверстия в междоменном интерфейсе и аминокислотных остатков, ограничивающих вход в отверстие. Остатки каталитической триады и центр связывания субстрата S1 представлены полупрозрачными пунктирными изображениями. Пунктирная линия показывает взаимодействие между Arg151 и каталитическим Asp617 в PSPmod.

Помимо канала в  $\beta$ -пропеллере, доступ раствора, малых молекул и пептидов в междоменную полость возможен через отверстия между гибкими петлями, расположенными по периметру междоменной полости и формирующими границу раздела (интерфейс) между  $\beta$ -пропеллерным и каталитическим доменами. Самое большое отверстие ограничено остатками Asp31 и Glu32 ( $\eta$ 1), Ser174 ( $\beta$ 12), His616 ( $\alpha$ 10), Ser149 (петля  $\beta$ 9– $\beta$ 10), Pro571



(петля  $\alpha 8$ – $\alpha 9$ ) и Thr 195 (петля  $\beta 13$ – $\beta 14$ ) (рисунок 20B). Расстояния между C $\alpha$ -атомами аминокислотных остатков, определяющие размер отверстия, составляют 10,1, 16,5 и 7,7 Å для Ser149-His616, Ser174-Pro571 и Thr195-Pro571 соответственно. Размер данного отверстия может заметно варьировать в связи с высокой подвижностью окружающих его петель, на которую указывает высокая величина B-фактора (рисунок 18A). Наибольшую подвижность имеет H-петля каталитического домена (остатки 649–658), несущая каталитический His. Из-за своей разупорядоченности, данная петля не полностью локализована на электронной плотности. Со стороны  $\beta$ -пропеллера повышенную гибкость имеет петля, включающая остатки 192–196 (рисунок 18A). В PEP эта петля была названа фиксирующей петлей из-за ее способности перекрывать отверстие в интерфейсе между доменами и таким образом участвовать в селекции субстрата [29,30,33]. В отличие от PEP, в OpB эта петля заметно укорочена [180], и из-за этого она не способна самостоятельно регулировать доступ в междоменное пространство через отверстие в интерфейсе между доменами.

Два шарнирных пептида (№1 и №2) соединяют N-концевую петлю с пропеллерным доменом и пропеллерный домен с  $\alpha/\beta$ -гидролазным доменом. В PSPmod оригинальная последовательность шарнирного пептида №1 заменена на сайт протеазы TEV. Высокое значение B-фактора говорит о подвижности этой области по сравнению со вторым шарнирным пептидом как в структурах OpBmod, так и в структуре OpB-S532A (рисунки 17B и 18A). Сравнение исходного шарнирного пептида (IPQQEH) в структуре PSP-S532A и модифицированного (ENLYFQ) в структуре PSPmod (7YWS) показано на рисунке 21.



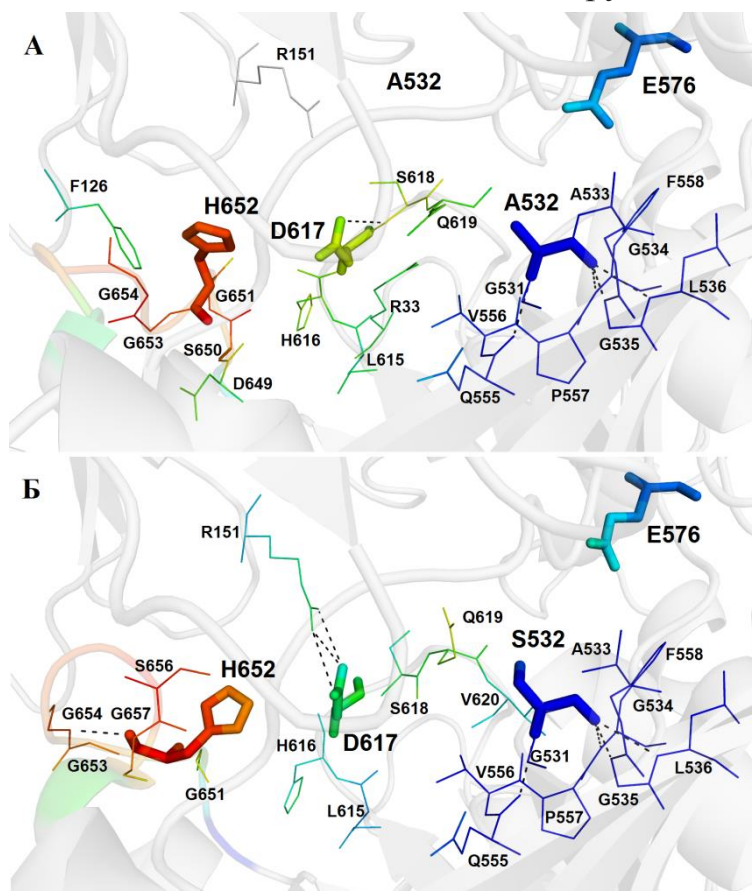
**Рисунок 21.** Сравнение интактной и модифицированной шарнирных областей в структурах PSP-S532A (PDB ID 7ZJZ) и PSPmod (PDB 7YWS). **А.** Аминокислотное окружение в радиусе 4 Å и полярные контакты (пунктирные линии) интактного шарнирного пептида 1. Взаимодействующие остатки показаны палочками и окрашены в соответствии со значениями В-фактора, остатки шарнирного пептида увеличены. **Б.** Аналогичное представление модифицированного шарнирного пептида.

Интактный и модифицированный варианты имеют сходный состав алифатических, заряженных и полярных остатков, но другой порядок распределения зарядов. В обоих случаях (независимо от модификации) основные цепи шарнирных пептидов стабилизированы за счет полярных контактов с прилегающими участками каталитического и  $\beta$ -пропеллерного доменов, а также со вторым шарнирным пептидом, включающими I/E71N-V68O, E/F75O-F91N, H/Q76O-K402NZ, I/E71O-K407NZ. Кроме того, F75 из модифицированного шарнира взаимодействует с F91 как через основные цепи (F75N-F91O), так и через фенильные кольца боковых цепей. Остатки L73 и Y74 из модифицированного шарнира стабилизированы гидрофобными взаимодействиями с остатками каталитического домена P93 и Y662. Эти дополнительные взаимодействия снижают подвижность модифицированного шарнира по сравнению с интактным. Судя по всему это, казалось бы, небольшое уменьшение локальной подвижности, отражается на поведении

всей молекулы, так как мы видим значительное снижение каталитической активности PSPmod по сравнению с PSP.

### 3.1.5. Каталитическая триада в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A

Как и у всех сериновых протеаз, каталитическая триада олигопептидаз сформирована из аминокислотных остатков S, D и H (S532, D617 и H652 в случае PSP) (рисунок 22). Анализ пространственных структур показал, что S532 расположен в центре междоменной полости на короткой петле между нитью  $\beta 36$  и спиралью  $\alpha 7$ ; его боковая цепь обращена к пропеллерному домену. Во всех структурах PSPmod и в структуре PSP-S532A остатки S532 (или A532) одинаково стабилизированы многочисленными контактами своих основных цепей с остатками из ближайшего окружения.



**Рисунок 22.** Аминокислотное окружение каталитической триады в радиусе 4 Å в структурах PSP-S532A (А) и PSPmod (7YWS) (Б). Все остатки показаны палочками и окрашены в соответствии со значениями В-фактора. Остаток E576 субстрат-связывающего центра S1 и остатки каталитической триады увеличены. Полярные контакты показаны пунктирными линиями.

D617 расположен ближе к поверхности фермента, на гибкой петле (остатки 615–623) между нитью  $\beta$ 38 и  $\alpha$ 11-спиралью. Как видно из рисунка 12, в структурах PSP-S532A и PSPmod, каталитические остатки D617 и петли, на которых они расположены (остатки 616–621), имеют разную степень подвижности. В структуре PSPmod (PDB ID 7OB1) положение каталитического D617 стабилизировано за счет взаимодействия его боковой цепи с боковой цепью с R151 из  $\beta$ -пропеллерного домена (расстояния D617OD1/2-R151NH1/2 составляют 3–3,2 Å). Образующийся солевой мостик блокирует вход в междоменную полость через вышеописанное отверстие в интерфейсе между доменами (рисунок 20B). В структуре PSP-S532A боковые цепи R151, так и D617 направлены в противоположные стороны, в результате чего боковая цепь D617 взаимодействует с основной цепью соседнего S618 (расстояния D617OD1-S618N составляли 3,05 Å). В отсутствие фиксирующего солевого мостика, вся петля, несущая D617 (D-петля) становится более подвижной (B-факторы, составляющих её остатков, увеличены), что, видимо, необходимо для эффективной каталитической активации, так как фиксация D617 вследствие формирования солевого мостика с R151 ассоциирована со значительным снижением каталитической активности PSPmod.

Третий остаток каталитической триады, H652, расположен на очень гибкой и длинной H-петле (остатки 648–658) между цепью  $\beta$ 39 и C-концевой спиралью  $\alpha$ 12. В отличие от D617 положение и окружение каталитического H652 примерно одинаковы в ферментах с интактными и модифицированными шарнирными пептидами.

### **3.1.6. Конформация белка в кристаллических структурах PSPmod и PSP-S532A**

Для определения конформации белка в структурах PSPmod и PSP-S532A были определены параметры, характеризующие степень собранности/разобщённости каталитической триады и близости/отдаленности доменов, включая расстояние между остатками каталитической триады и расстояния между центрами масс доменов, а также процент поверхности междоменного интерфейса от общей поверхности белка, процент остатков в междоменном интерфейсе и количество междоменных контактов (таблицы 10 и 11). Для сравнения использовали структуры, полученные для разных конформаций ферментов TbOrB, ArPEP, GmPEP и PfPEP и взятые из базы данных PDB. Из таблицы 10 видно, что

разобшение каталитической триады в открытых конформациях OpB и PEP ассоциировано с заметным увеличением расстояния между каталитическими остатками по сравнению с закрытой конформацией. Например, сдвиг  $\text{Ca}$ -атома каталитического His при переходе TbOpB между двумя конформациями достигает 10 Å. В то же время расстояния между центрами масс доменов в открытых конформациях на 6–8 Å больше, чем в закрытых (или промежуточных), а процент поверхности интерфейса и количество остатков в интерфейсе открытых конформаций в 1,5–2 раза меньше, чем в закрытых или промежуточных.

Аналогичная ситуация наблюдается в структурах производных PSPmod и структуре PSP-S532A (таблица 11).

**Таблица 10.** Сравнительный анализ кристаллической структуры PSPmod и структур TbOpB, ArPEP, GmPEP и PfPEP, закristализованных в разных конформациях.

PDB_ID	7OB1	4BP8	4BP9	3IUL	3IVM	5N4F	5N4C	5T88
Конформация	промежуточная	открытая	закрытая	открытая	закрытая	открытая	промежуточная	промежуточная
белок	PSP	TbOpB	ArPEP	GmPEP	PfPEP			
Остатков в кристаллической структуре*	677	712	710	669	682	703	720	618
Выровненных остатков*	677	668	665	605	650	517	659	600
Z-оценка *	61.8	44.0	46.3	42.5	41.1	39.6	41.6	37.8
Совпадение, %*	100	37	38	27	27	22	21	22
СКО, Å*	0	3.8	2.2	4.5	2.8	4.0	2.6	3.0
Расстояние кат. Ser-His $\text{Ca}$ , Å	18.2	18.5	8.3	Н/Д **	8.3	Н/Д **	15.6	23.6
Расстояние кат. S-OG H-NE2, Å	13.9	18.3	3.5	Н/Д **	3.3	Н/Д **	Н/Д ***	17.4
Расстояние кат. Asp-His $\text{Ca}$ , Å	10.6	7.6	4.5	Н/Д **	4.5	Н/Д **	8.4	10.9
Расстояние кат. D-OD2 H-ND1, Å	9.0	11.8	3.1	Н/Д **	2.9	Н/Д **	10.6	7.0
Расстояние между центрами масс	32.3	36.7	30.4	38.7	30.7	39.4	32.0	30.9

PDB_ID	7OB1	4BP8	4BP9	3IUL	3IVM	5N4F	5N4C	5T88
Конформация	промежуточная	открытая	закрытая	открытая	закрытая	открытая	промежуточная	промежуточная
белок	PSP	TbOpB		AppPEP		GmPEP		PfPEP
доменов, Å								
Площадь поверхности интерфейса, кат./проп. домен, % <sup>1</sup>	11.3/9.4	8.4/7.5	14.0/12.3	8.1/7.7	16.9/14.6	7.5/7.0	13.5/11.4	12.2/11.5
Остатки интерфейса, кат./проп. домен, % <sup>2</sup>	16.3/15.9	10.3/10.5	17.4/16.9	12.1/7.7	22.4/19.5	11.0/6.3	19.0/15.2	18.5/15.1
$\Delta^{\ddagger} G$ , ккал/м	-12.9	-8.9	-17.8	-20.8	-23.6	-16.3	-24.3	-23
Водородные связи	11	14	28	7	22	9	25	16
Соляные мосты	4	4	4	-	2	-	1	1

\* — по структурному анализу Dali [204];\*\* — недоступно из-за плохой электронной плотности в области His-петли;\*\*\* — отсутствует в связи с заменой каталитического Ser на Ala;<sup>1</sup> — доля поверхности интерфейса в процентах от общей площади домена;<sup>2</sup> — доля остатков в интерфейсе от общего количества остатков в домене.

**Таблица 11.** Каталитическая триада и расположение доменов в кристаллических структурах PSPmod, PSPmodE125A, PSPmodS532A и PSP-S532A.

PDB_ID/model	Кристаллическая структура					
	7OB1	7NE4	7NE5	7ZJZ	7YWS	7YX7
Белок	PSPmod	PSPmod E125A	PSPmod S532A	PSP-S532A	PSPmod	PSPmod
СКО (Å)	0	0.9	0.6	0.4	0.3	0.2
Расстояние S532-H652, C $\alpha$ (Å)	18.2	18.4	19.4*	17.9	18.2	18.3
Расстояние S532OG-H652NE2 (Å)	13.9	22.5	н/д	н/д *	13.1	13.1
Расстояние Asp617-His652 C $\alpha$ (Å)	10.6	9.7	11.2	7.2	9.4	9.6
Расстояние Asp617-OD2-His652-ND1 (Å)	9.0	12.6	13.9	6.6	6.2	5.3
Расстояние между центрами масс	32.3	31.6	32.0	32.3	32.0	32.2



доменов, (Å)						
Площадь поверхности интерфейса, кат./проп. домен (%) <sup>1</sup>	11.3/9.4	13.0/10.7	11.8/10.0	11.7/9.8	11.9/10.1	11.6/9.9
Остатки интерфейса, кат./проп. домен (%) <sup>2</sup>	16.3/15.9	17.6/16.2	17.0/14.7	15.7/15.3	16.0/16.2	16.6/15.9
$\Delta^1G$ (kcal/M)	-12.9	-16.7	-16.9	-12.7	-10.7	-9.3
Водородные связи	11	17	14	15	11	15
Соляные мосты	4	4	4	2	4	4

\*Для A532-H652

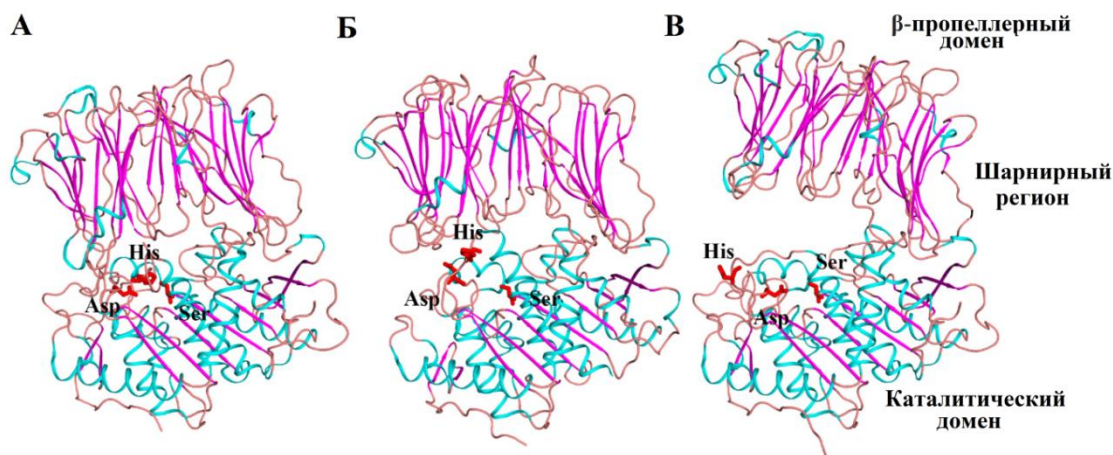
<sup>1</sup> - доля поверхности интерфейса в процентах от общей площади домена.

<sup>2</sup> - доля остатков в интерфейсе от общего количества остатков в домене

<sup>3</sup> - данные получены из [204]

<sup>4</sup> - данные получены из <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P24555>

Таким образом было установлено, что PSPmod и её производные, а также PSP-S532A были закристаллизованы в промежуточной конформации, для которой характерно сближение доменов без сборки каталитической триады (рисунок 23). Ранее данную конформацию наблюдали в кристаллической структуре PfPEP архей [24] и структурах каталитически неактивных макроциклаз грибов GmPEP в комплексах с субстратами макроциклизации [26]. В последнем случае промежуточную конформацию связали с мутацией каталитического остатка.



**Рисунок 23.** Расположение доменов и каталитической триады в закрытом (А), промежуточном (Б) и открытом (В) конформационных состояниях OrV.

Мы заметили, что кристаллизация POP в промежуточных конформациях всегда была ассоциирована с наличием в междоменных полостях субстратоподобных соединений или субстратов (в случае мутированного GmPEP). В PfPEP это были пролилпролиновые лиганды, в PSPmod -

молекулы спермина, которые могли стабилизировать ферменты в переходной конформации.

В этой связи нельзя не отметить, что клеточная цитоплазма, в которой ферменты находятся *in vivo*, имеет достаточно сложный состав, и её компоненты, попадая в междоменную полость POP, могут вызывать аналогичный эффект. Иными словами, конформационный переход, индуцированный спермином или пролилпролином (в случае PfPEP), может повторять естественную стадию функционирования фермента. Двухстадийная каталитическая активация, представляющая собой переход от открытой конформации к закрытой через промежуточную конформацию, в которой закрытие домена предшествует формированию рабочей конфигурации каталитической триады, может быть широко распространена *in vivo*.

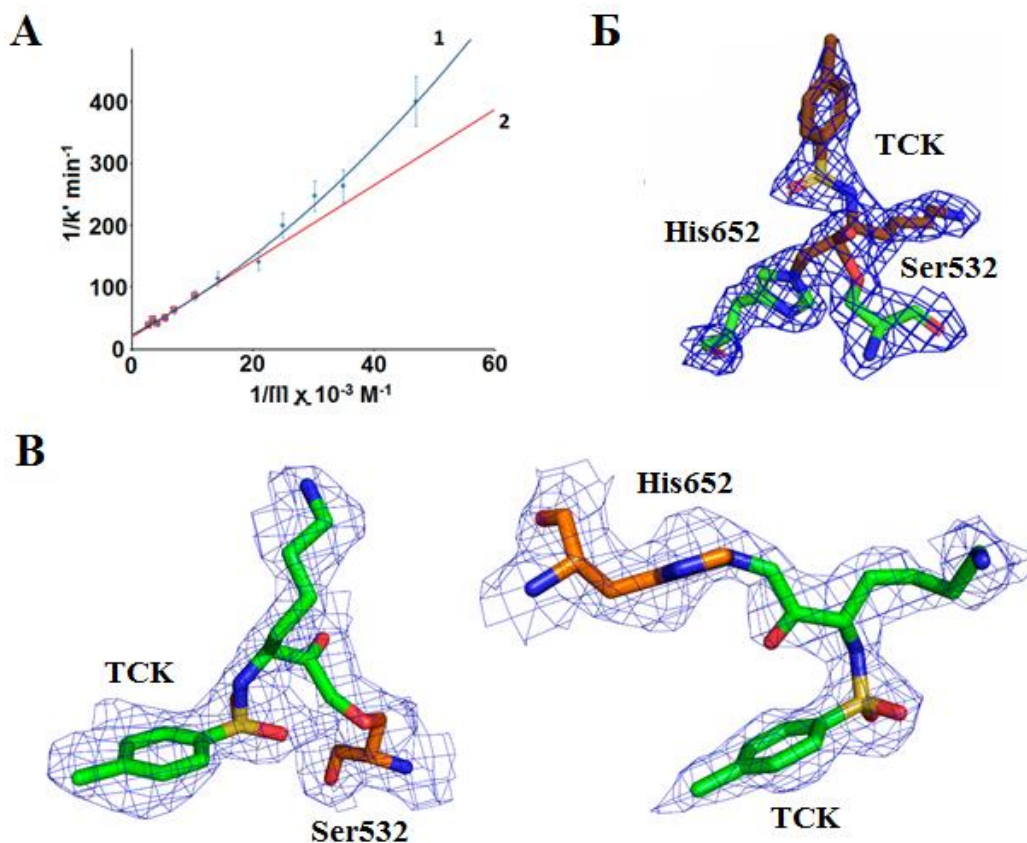
### **3.1.7 Сравнительный анализ кристаллических структур PSP и PSPmod в комплексе с ингибитором $N\alpha$ -p-тозил-лизилхлорметилкетон**

Структурные исследования LmOpV и TbOpV, а также бактериальных PEP, например из *Aeromonas punctate*, показали, что ковалентное связывание ингибиторов - аналогов переходного состояния, таких как антипаин ([ $(S)$ -1-карбоксит-2-фенилэтил]карбамоил-L-аргинил-L-валил-аргинал; AIP) для OpV и Z-L-пролил-пролинал для PEP, фиксирует ферменты в закрытых конформациях [24,180,186]. Поэтому, с целью получения структуры PSP в закрытой конформации было решено кристаллизовать её в комплексе с  $N\alpha$ -p-тозил-лизилхлорметилкетон (ТСК).

Для получения комплексов использовали белки PSP и PSPmod. Ингибирующая активность ТСК в отношении данных ферментов была охарактеризована. В случае PSP кинетические параметры ингибирования соответствовали уравнению Михаэлиса-Ментон, что указывало на связывание одной молекулы ингибитора с молекулой белка.

Ингибирование каталитической активности PSPmod при добавлении увеличивающихся количеств ТСК показано на рисунке 24А. Как видно из рисунка, зависимость обратной величины кажущейся константы скорости псевдопервого порядка ( $k'$ ) от обратной величиной концентрации ингибитора не была линейной и была рассмотрена возможность связывания двух молекул ингибитора.





**Рисунок 24.** Модификация шарнирного региона влияет на связывание ТСК с PSP. **А.** Ингибирование PSPmod (1,25  $\mu\text{M}$ ) ТСК в диапазоне концентраций 21–352  $\mu\text{M}$  (1) и 100–352  $\mu\text{M}$  (2). **Б.** Карта электронной плотности молекулы ТСК (окрашена в коричневый цвет), одновременно связанной с каталитическими остатками S532 и H652 (окрашены в зеленый цвет) в структуре комплекса PSP-ТСК. **В.** Карты электронной плотности двух молекул ТСК (окрашены в зеленый цвет), независимо связанных с каталитическими остатками S532 и H652 (окрашены в оранжевый цвет) в PSPmod.

Были получены кристаллы для комплексов обоих типов. Дифракционные данные с этих кристаллов были собраны на СИ НИЦ «Курчатовский институт» для комплекса PSPmod-ТСК и ESRF (Гренобль, Франция) для комплекса PSP-ТСК.

Структура PSP дикого типа в комплексе с ТСК (PDB ID 7YWP) была уточнена до разрешения 2,2 Å. Структура PSPmod (PDB ID 7NE7) была уточнена до разрешения 2,3 Å. Как и в ранее полученных кристаллах белков в свободной форме кристаллографическая пространственная группа была  $P2_12_12_1$ , а асимметричная ячейка кристаллической решетки содержала мономер белка. В то же время размеры элементарной ячейки кристалла PSP-ТСК (75,529 Å × 89,660 Å × 108,650 Å) были немного меньше, чем у кристаллов PSP\_S532A (70,71 Å × 100,4 Å × 108,67 Å) или у PSPmod-ТСК (73,32 Å × 101,1 Å × 108,76 Å). Уменьшенный объем элементарной ячейки

указывает на повышенную близость доменов, что является признаком закрытой конформации.

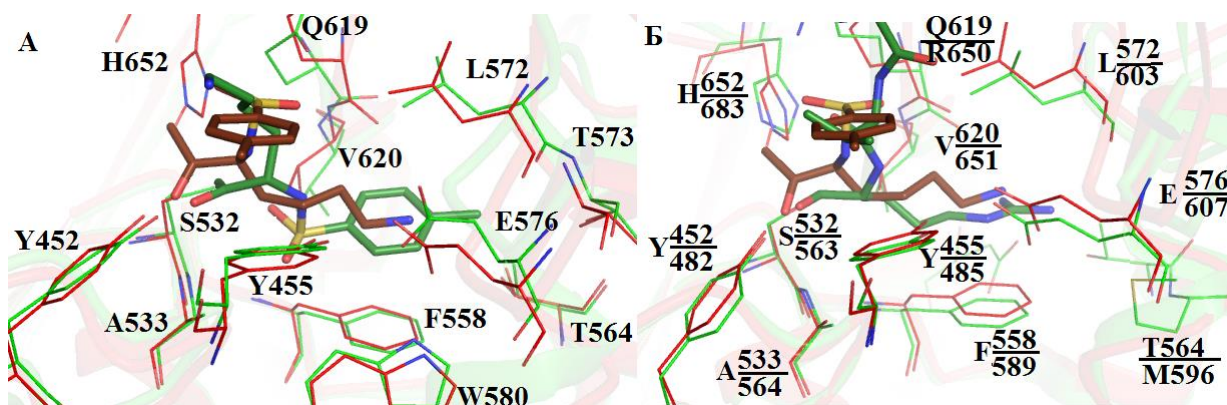
Наложение структур и анализ взаимного расположения доменов и остатков каталитической триады в структурах комплексов PSP-ТСК и PSPmod-ТСК проводили так же, как это было описано выше для свободных белков.

Было установлено, что структура PSP-ТСК действительно представляет собой закрытую конформацию фермента, тогда как в структуре PSPmod-ТСК сохраняется промежуточная конформация. Как и предполагалось по результатам кинетических исследований, PSP связывает одну молекулу ТСК, а PSPmod – две молекулы ТСК (рисунок 24Б, В).

В структуре PSP-ТСК два остатка каталитической триады (S532 и H652) связывают 1 молекулу ТСК. Связь с S532OG образуется через полуацетальный атом углерода ТСК, а метиленовая группа ТСК связывается с H652NE (рисунок 24В). В структуре PSPmod-ТСК обе молекулы ТСК были связаны с S532OG и H652NE2 через метиленовую группу ТСК. Подобный вид связывания был выявлен впервые.

Наблюдаемый комплекс PSP-ТСК представляет собой классический способ взаимодействия между сериновой протеазой и ингибитором хлорметилкетонного типа. Ещё один пример такого же связывания можно наблюдать в структуре лизин-специфической эндопротеиназы из *Lysobacter enzymogenes* в комплексе с ТСК (PDB ID 4NSY) [225].

Сравнение молекул ТСК, связанных с S532, в структурах PSPmod-ТСК и PSP-ТСК показывает, что тозильное ароматическое кольцо и боковая цепь лизина ТСК практически меняются местами, но эта перегруппировка не влияет на аминокислотное окружение ингибиторов (рисунок 25А).



**Рисунок 25.** Аминокислотное окружение ковалентно связанных ингибиторов в структурах PSP-ТСК (PDB ID 7YWP), PSPmod-ТСК (PDB ID 7NE7) и TbOpB-AIP (PDB ID 4BP9). А. Классическое положение S532- и H652-связанного ТСК (коричневый) в субстрат-

связывающем кармане PSP в закрытой конформации (красный) и перевернутое положение S532-связанного TCK (зеленый) в субстрат-связывающем кармане PSPmod в промежуточной конформации (светло-зеленый). **Б.** Совмещение по Ca атомам комплексов PSP-TCK (красный и коричневый) и TbOpB-AIP (светло-зеленый и зеленый). Аминокислотные остатки в ближайшем окружении (4 Å) ингибиторов выделены и подписаны. Верхние метки соответствуют остаткам PSP, нижние - остаткам TbOpB. Показаны только аргинил P1 и валин P2 от AIP.

Сравнение положения TCK в структуре PSP-TCK с положением другого ковалентного ингибитора (AIP) в структуре комплекса TbOpB-AIP (PDB ID 4BP9) позволило подтвердить сходство субстрат-связывающих карманов у протозойного и бактериального фермента (рисунок 25B).

В обоих ферментах за первичную субстратную специфичность (взаимодействие с остатком P1 субстрата) отвечают консервативные остатки глутамата E576 в PSP и E607 в TbOpB, которые взаимодействуют с аминокислотными группами лизина в TCK и гуанидиновыми группами аргинила в AIP. Боковые цепи P1-аргинила в AIP и P1-лизина в TCK совпадают, а положение P2-валина в AIP практически совпадает с положением тозильного кольца TCK.

Кроме того, оба остатка в P1 положениях AIP и TCK стабилизируются посредством контактов с остатками Y455/Y485, V620/V651 и F558/F589 из PSP/TbOpB. Оксианионы тетраэдрических комплексов стабилизированы водородными связями с OH группами остатков Y452/482 и NH-группами основной цепи остатков A533/564 из PSP/TbOpB. Как и комплекс TbOpB-AIP, полученный комплекс PSP-TCK можно рассматривать как аналог переходного тетраэдрического состояния в протеолитической реакции, катализируемой S532. Это позволило адаптировать классическую схему катализа трипсиноподобными протеазами к случаю PSP.

### **3.1.8. Изучение конформации PSP и PSPmod в растворе, а также роли спермина методом МУРР.**

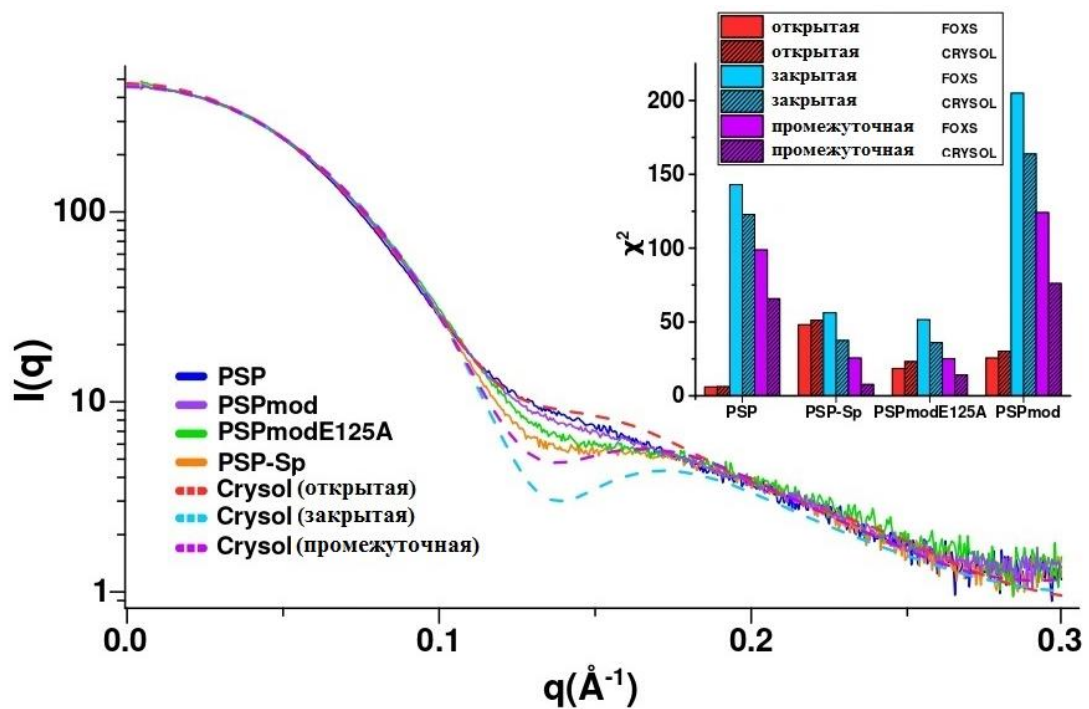
МУРР является методом структурной биологии, используемым для изучения неупорядоченных систем, таких как растворы биологических макромолекул [236]. МУРР позволяет определить структуру низкого разрешения исключительно по кривой рассеяния без привлечения дополнительной информации (*ab initio*). Другой задачей данного метода является выбор предпочтительной конформации белка в растворе из ряда потенциально возможных конформаций, предсказанных методами молекулярного моделирования и молекулярной динамики. Выбор

конформации происходит путем сравнения теоретических кривых МУРР, полученных для разных моделей, с экспериментальными данными.

Данные МУРР были получены для растворов PSP, PSP в присутствии спермина (PSP-Sp), PSPmod и PSPmodE125A (рисунок 27). Чтобы исключить влияние агрегации на профили МУРР, были проведены измерения при различных концентрациях. Были отобраны данные, полученные при концентрации белка 4,5 мг/мл.

Экспериментальные кривые МУРР сравнивали с теоретическими кривыми, рассчитанными для фермента в разных конформациях. Для получения теоретических кривых МУРР использовали кристаллические структуры PSPmod и PSP-S532A, представляющие фермент в промежуточной конформации, кристаллическую структуру PSP в закрытой конформации, описанную в следующей главе, и полученную нами молекулярную модель PSP в открытой конформации [187]. Расчеты проводили с использованием программ FOXS и CRY SOL.

Наилучшее соответствие наблюдалось между экспериментальной кривой МУРР, полученной для PSP, и теоретической кривой, полученной для модели открытой конформации фермента, а также для экспериментальной кривой МУРР, полученной для PSP-Sp и теоретической кривой, полученной для кристаллической структуры 7OB1, представляющей промежуточную конформацию (рисунок 27).



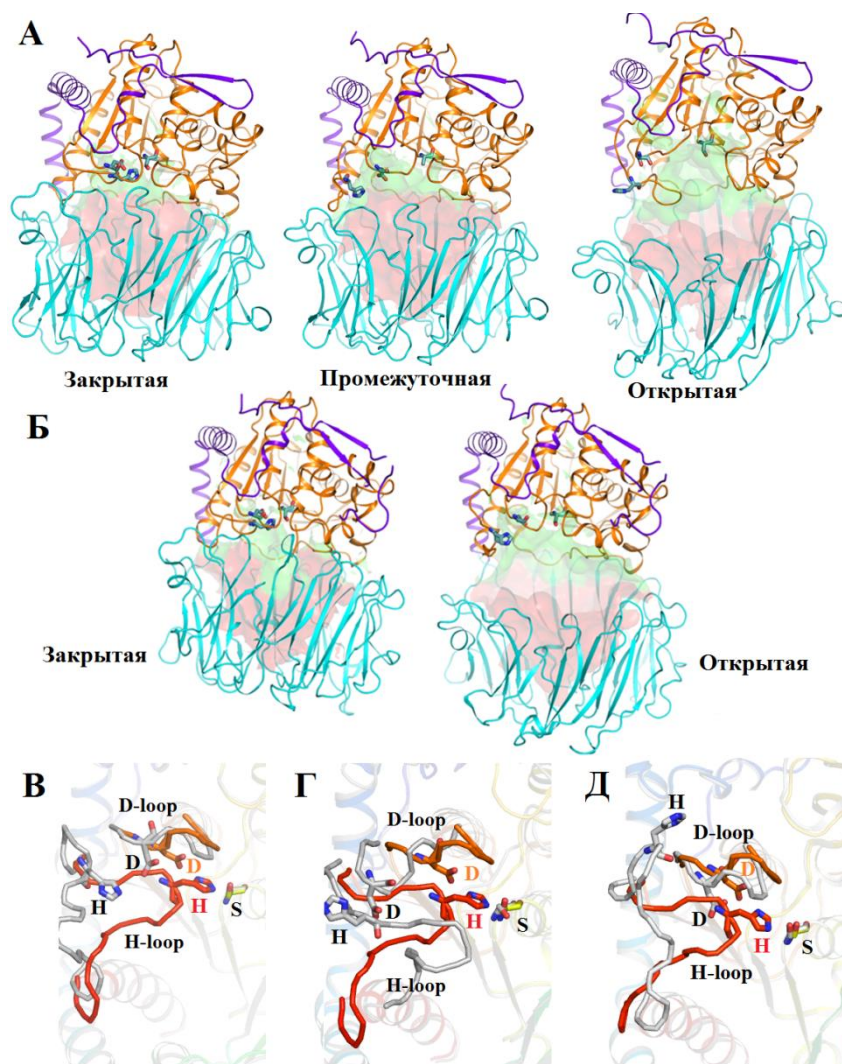
**Рисунок 27.** Экспериментальные профили МУРР (сплошные линии) и теоретические профили (пунктирные линии), рассчитанные с использованием CRY SOL для PSP в открытой и закрытой конформациях и кристаллической структуры PSPmod (PDB ID 7OB1). На вставке показана гистограмма распределения  $\chi^2$  для расчетов FOXS/CRY SOL.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в растворе не существует закрытой конформации, поскольку теоретическая кривая для закрытой конформации не совпадает ни с одним экспериментальным профилем рассеяния. Можно предположить, что основной конформацией PSP в растворе является открытая конформация, одновременно с которой существует минорная фракция промежуточной конформации, структуру которой мы наблюдали в кристаллах. Данные конформации находятся в динамическом равновесии, которое сильно смещается в сторону промежуточной конформации при добавлении в раствор спермина. Увеличение фракции промежуточной конформации также характерно для PSPmod и её производных.

### **3.1.9 Сравнительный структурный анализ PSP и TbOpB в разных конформациях: стабилизация каталитических триад в закрытой конформации у бактериальных и протозойных OpB**

Мы сравнили полученную структуру PSP (из кристалла комплекса PSP-TСК) в закрытой конформации со структурой PSP\_S532A в промежуточной конформации и МУРР-валидированной моделью PSP в открытой конформации (PSP-МУРР), а также со структурами TbOpB простейших (PDB ID 4BP8 и 4BP9 [186] в открытой (безлигандной) и закрытой (связанной с ингибитором) конформациях. Глобальные (междоменные) и локальные (внутридоменные) перестройки, связанные с различными конформациями PSP и TbOpB, показаны на рисунке 28.





**Рисунок 28.** Визуализация основных структурных характеристик PSP и TbOrV в различных конформациях. **А.** Структуры PSP-TCK в закрытой конформации (PDB\_ID 7YWP), PSP\_S532A в промежуточной конформации (PDB\_ID 7ZJZ) и подтвержденная МУРР модель PSP в открытой конформации. N-концевые петли каталитических доменов показаны фиолетовым цветом,  $\beta$ -пропеллерные домены — голубым, а  $\alpha/\beta$ -гидролазные укладки — оранжевым. Остатки каталитической триады показаны изумрудными палочками; молекула ингибитора в структуре 7YWP опущена. Доступные для растворителя области в воронкообразном туннеле  $\beta$ -пропеллера и междоменной полости окрашены в красный и зеленый цвет соответственно. **Б.** Аналогичные представления структур TbOrV (ID PDB 4BP9 и 4BP8) в закрытой и открытой конформациях. **В, Г.** Собранный каталитическая триада в закрытой конформации PSP (радужная окраска), наложенная на разобранную каталитическую триаду (окрашенную серым цветом) в промежуточной (**В**) и открытой (**Г**) конформациях PSP. Каталитические остатки показаны в виде палочек и названы; ковалентно связанный ингибитор опущен. **Д.** Аналогичная суперпозиция собранной и разобранной каталитической триады в закрытой и открытой конформации TbOrV.

Как видно из рисунка, сближение доменов вызывает уменьшение объемов междоменных полостей. Взаимное расположение доменов в

промежуточной конформации PSP не так сильно отличается от такового в закрытой конформации по сравнению с открытой конформацией (рисунок 28А, Б). Сборка/разборка каталитической триады в основном является результатом движения гибкой Н-петли, на которой находится каталитический остаток Н (рисунок 28 В–Д). При этом движении каталитический Н переносится от периферии фермента в центр междоменной полости, где он встраивается между двумя другими остатками каталитической триады. Каталитический D, и несущая его D-петля тоже сдвигается, позволяя каталитическому Н приблизиться к каталитическому S, положение которого не меняется.

В таблице 12 приведён анализ полярных контактов между доменами PSP, формирующимися в разных конформациях. Видно, что только лопасти 1–4 пропеллера (нумерация лопастей соответствует рисунку 20А) меняют свои позиции относительно каталитического домена. Положения лопастей 5–7 практически не меняются, о чем свидетельствует сохранение междоменных СМ и водородных (Н) связей. Более того, в открытой конформации в этой области появляются дополнительные Н-связи, компенсирующие потерю междоменных контактов между каталитическим доменом и лопастями пропеллера 1–4, которые, удаляясь от поверхности каталитического домена увеличивает объем междоменной полости (см. рисунок 28А).

По сравнению с открытой конформацией PSP, разница в объемах междоменной полости в закрытой и промежуточной конформаций PSP незначительна (рисунок 28А), но при этом количество междоменных контактов сильно изменяется (таблица 12). Как уже было отмечено выше, лопасти пропеллера 1 и 4 примыкают к каталитическому домену в обеих конформациях (промежуточной и закрытой). Однако, количество междоменных контактов в промежуточной конформации заметно меньше, чем в закрытой (таблица 12). Лопасти пропеллера 2 и 3 контактируют с каталитическим доменом только в закрытой конформации.

**Таблица 12.** Полярные контакты на границе каталитического и  $\beta$ -пропеллерного доменов в трех конформациях PSP.

Структурный элемент		Закрытая		Промежуточная		Открытая	
$\beta$ -пропеллер	каталитический	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.	Атом1 проп.	Атом 2 кат.	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.
Шарнир 1	$\alpha 2$	I71N	V68O	I71N	V68O		
	Н-петля	P72O	R658NH 2				

Структурный элемент		Закрытая		Промежуточная		Открытая	
$\beta$ -пропеллер	каталитический	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.	Атом1 проп.	Атом 2 кат.	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.
		Q73O	R658NH $\frac{1}{2}$				
$\beta 5/\beta 6$ , Лист 1		E92O	R658NH 1				
		N95O	R658NH 1				
		E96O/O E2	R658N	E96O	R658NH2		
		Y97OH	S656OG	Y97OH	S656N		
				E96O	S656OG		
Лист 1/ Лист 2	Н-петля, $\alpha 12$	E96OE2	F659N				
		E96OE2	K660N				
		E125O	K660NZ				
		<i>E125OE</i> 2	<i>K660NZ</i>				
	Н-петля	E125O	S656OG	A121O	K655NZ		
		Y127N	S656OG	R124O	K655NZ		
$\beta 9/\beta 10$ , Лист 2	$\alpha 11$	S149OG	G651N				
		R150N H1	Q621OE 1				
$\beta 13/\beta 14$ , Лист 3	$\beta 2/\alpha 1$	<i>K194NZ</i>	<i>D31OD2</i>				
Лист 3/ Лист 4	$\alpha 8/\alpha 9$	D222O	T574OG 1				
$\beta 17/\beta 18$ , Лист 4		T244O G1	G575O	T244OG1	D578OD2		
$\beta 21/\beta 22$ , Лист 5	$\beta 35/\alpha 5$					K291O	Q490NE 2
	$\alpha 5/\alpha 6$	<i>K291NZ</i>	<i>E494OE</i> $\frac{1}{2}$	<i>K291NZ</i>	<i>E494OE</i> $\frac{1}{2}$	<i>K291NZ</i>	<i>E494OE</i> 1
	$\beta 3/\alpha 5$	N292O D1	L490N	N292OD1	L490N	N292OD1	L490N
						N292ND2	L488O

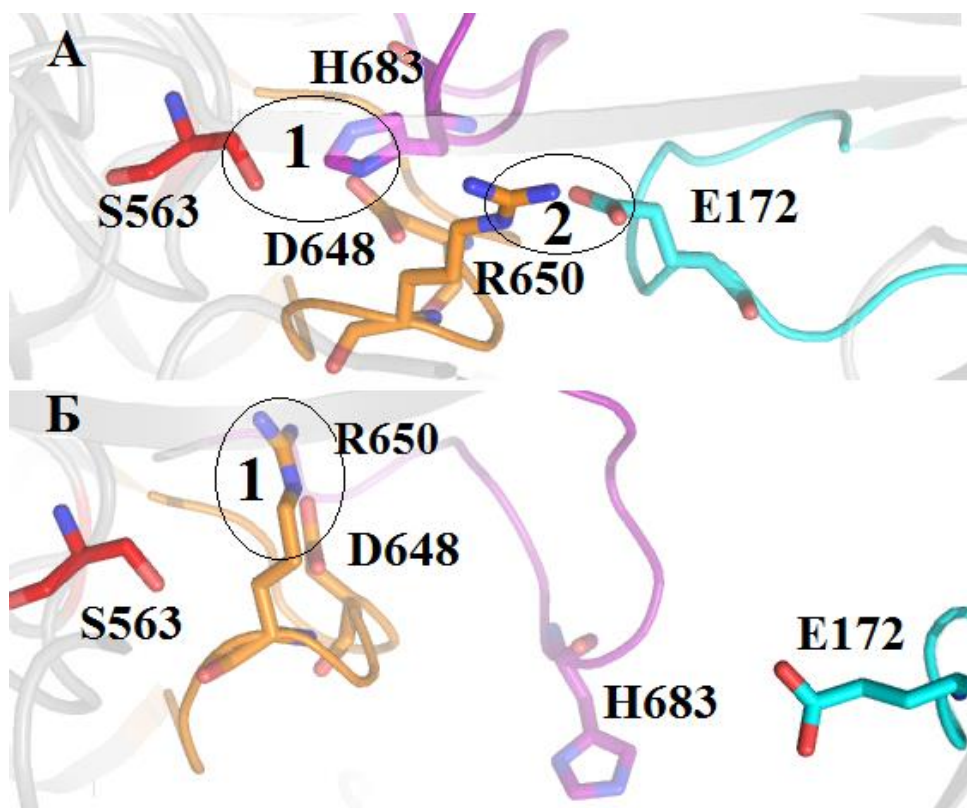


Структурный элемент		Закрытая		Промежуточная		Открытая	
$\beta$ -пропеллер	каталитический	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.	Атом1 проп.	Атом 2 кат.	Атом 1 проп.	Атом 2 кат.
						N292OD1	L491N
$\beta$ 24, Лист 6	$\alpha$ 5	M317S D	Q490N	M317SD	Q490N		
$\beta$ 25/ $\beta$ 26, Лист 6	$\beta$ 34/ $\alpha$ 4					R333NH2	S458OG
		<i>R333NH</i> $\frac{1}{2}$	<i>D460OD</i> $\frac{1}{2}$	<i>R333NH</i> $\frac{1}{2}$	<i>D460OD</i> $\frac{1}{2}$	<i>R333NH</i> $\frac{1}{2}$	<i>D460OD</i> $\frac{1}{2}$
	$\beta$ 35/ $\alpha$ 5					R333NH1	E487O
Лист 6/ Лист 7	$\beta$ 32	G336O	R418NH 2	G336O	R418NH2		
		T359O G1	R418NH 1			D357OD1	S416OG
$\beta$ 29/ $\beta$ 30, Лист 7	$\beta$ 34/ $\alpha$ 4	T361N	P461O	T361N/O G1	P461O	T361N/O G1	P461O
		S380OG	F463N	S380OG	F463N	S380OG	F463N
	$\beta$ 33			M382SD	L433N		
Шарнир 2	$\alpha$ 2	K407N	R70O	K407N	R70O	K407NE	R70O
						N408O	R70NH1
	$\eta$ 6	T410O	N413N	T410O/O G1	N413N/ND 2	T410OG1	E412N

Солевые мосты выделены курсивом. Н-связи между разными атомами одного и того же остатка выделены светло-серым цветом, Н-связи между чередующимися остатками выделены серым цветом.

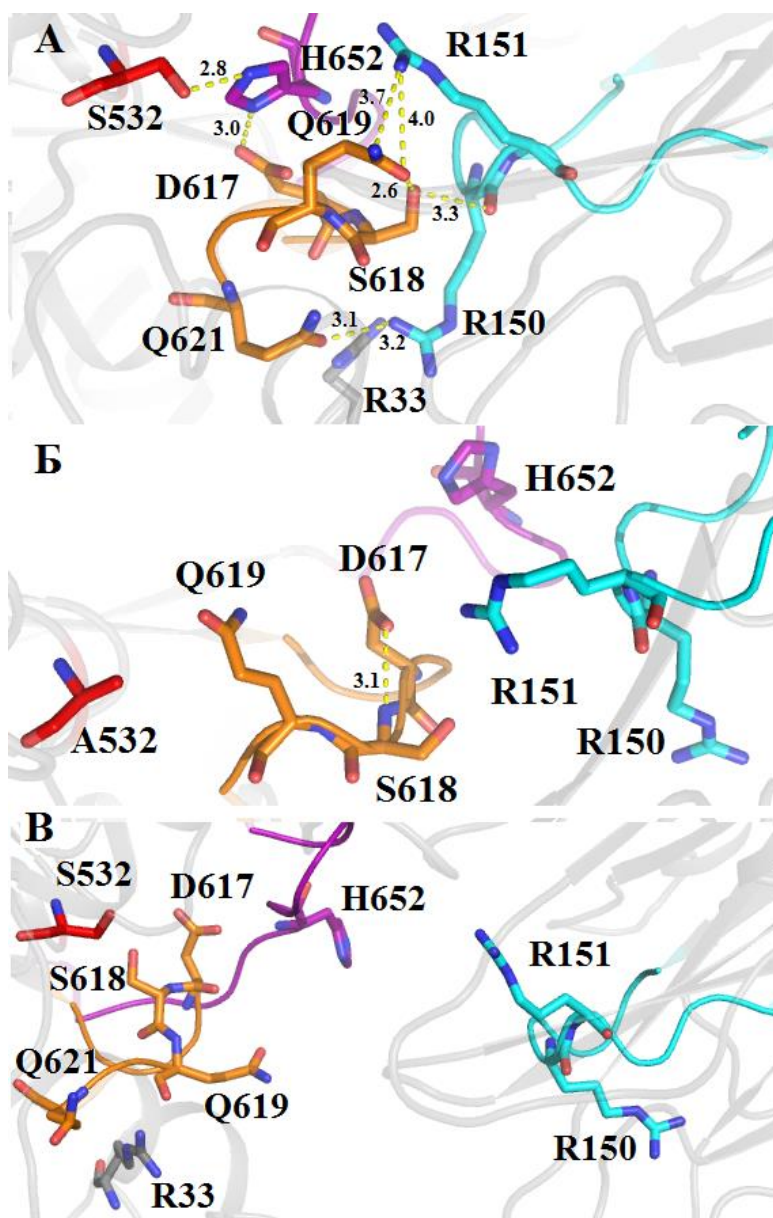
Как уже было показано ранее у обоих ферментов, TbOpV и PSP, ковалентные ингибиторы (AIP и TCK) были связаны с остатками собранной каталитической триады, характерной особенностью которой было расположение каталитического Н между двумя другими каталитическими остатками (рисунок 28 А и В).

В работе [186] на примере TbOpV была сделана попытка соотнести локальные движения в активном центре с глобальной междоменной динамикой.



**Рис. 29.** Собранная и разобранная каталитическая триада в закрытой (А) и открытой (Б) конформации TbOrV. Каталитические остатки S563, H683 и D648 окрашены в красный, пурпурный и золотой цвета соответственно. Ковалентно связанный ингибитор опущен. Соответствующие Н- и D-петли имеют тот же цвет, что и соответствующие каталитические остатки. Циановым цветом окрашена петля β-пропеллера, несущая остаток E172, образующий междоменный SB1 с R650, который стабилизирует каталитическую триаду в закрытой конформации. Взаимодействия, описанные в тексте, обведены и пронумерованы.

В закрытой конформации TbOrV каталитические остатки S563, H683 и D648 находятся в положениях, благоприятных для переноса протона между остатками каталитической триады (от S563OG к H683NE2 и от H683ND1 к карбоксильной группе D648 (см. обведенную область 1 на рисунке 29 А и в таблице 12). Такая локальная конфигурация каталитических остатков стабилизируются междоменным SM1 между остатком E172 из β-пропеллера и остатком R650 из каталитического домена (обведенная область 2 на рисунке 29А). Расстояние от E172OE1-R650NH2 - 3,4 Å. R650 находится в ближайшем окружении каталитического D648. SM1 разрушается при расхождении доменов. Свободный R650 образует SM с каталитическим D648 (обведенная область 1 на рисунке 29Б). Расстояние D648OD2—R650NH2 - 2,9 Å. В результате, каталитический H683 вытесняется из ближайшего окружения S563 на периферию каталитического домена [186].

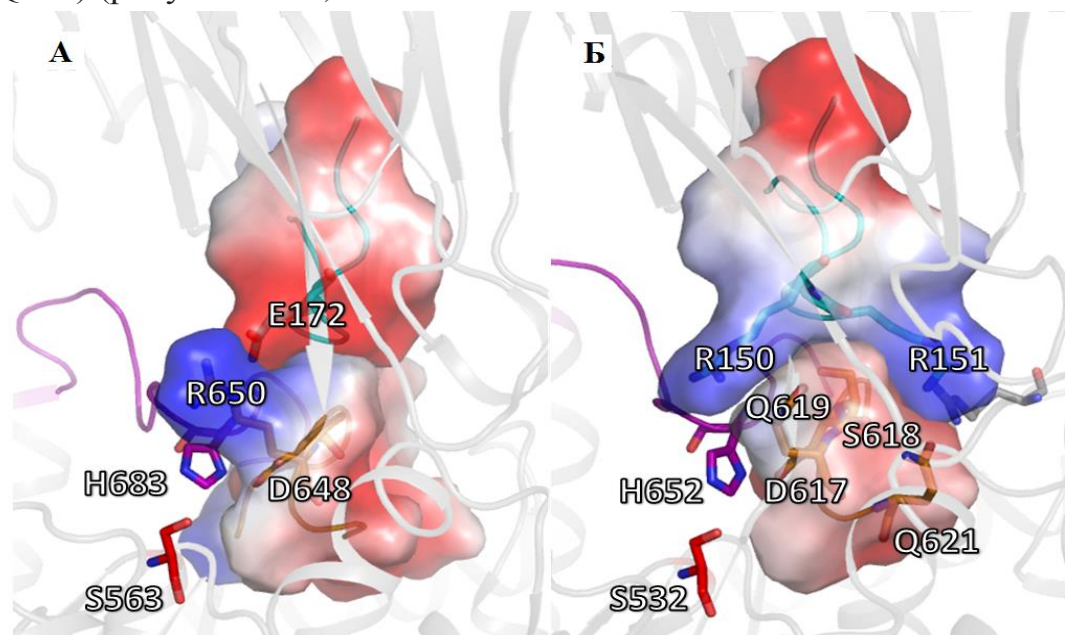


**Рисунок 30.** Собранная и разобранная каталитическая триада в закрытой (А), промежуточной (Б) и открытой (В) конформациях PSP. Каталитические остатки S532, H552 и D617 (вместе с соседними остатками) окрашены в красный, фиолетовый и оранжевый цвета. Ковалентно связанный ингибитор опущен. Пара остатков R150 и R151 и соответствующая петля  $\beta$ -пропеллера окрашены в голубой цвет. Все взаимодействия, описанные в тексте, показаны желтыми пунктирными линиями; расстояния даны в ангстремах.

Остатки, образующие CM1 в TbOrV, консервативны в OrV простейших, в то время как PSP и ряде бактериальных OrV присутствуют консервативные замены (E172 на R151 и R650 на Q619). Поэтому мы провели структурный анализ того, как стабилизируется каталитическая триада в закрытой конформации PSP в отсутствие CM1 (рисунок 30). При этом основное внимание было уделено перестройкам D-петли, т.к. именно они позволяют каталитическому H приблизиться к каталитическому S. Сравнение

промежуточной и закрытой конформации (рисунок 30А и Б) показывает, что Q619 вращается вокруг своего атома CG, поэтому его группы CO и NH2 заменяют друг друга, а боковая цепь D617 вращается почти на 180 градусов вокруг своего атома Ca. В результате боковая цепь Q619 освобождает пространство, которое она занимала в промежуточной конформации, для боковой цепи H652. В этом положении атом NE2 имидазольного кольца H652 приближается к гидроксильной группе S532, а атом ND1 ориентируется в направлении карбоксильной группы D617 (соответствующие расстояния см. в таблице 12).

Рисунок 30А показывает, как стабилизирована собранная каталитическая триада в закрытой конформации PSP. В первую очередь этой стабилизации способствуют H-связи S149OG—G651N (3,1 Å) и R150NH1—Q621OE1 (3,1 Å) между остатками β-пропеллера и остатками каталитического домена из H-петли и начала α11-спирали, граничащей с D-петлей. Кроме того, основная цепь R150 и боковая цепь R151 ориентированы по направлению к боковым цепям остатков D-петли S618 и Q619. Расстояния R151NH1—Q619NE2, S618OG—Q619OE1 и S618OG—R150O составляют 3,7 Å, 2,6 Å и 3,3 Å (рисунок 30А). В результате, остатки R150 и R151 образуют изогнутую положительно-заряженную поверхность, которая оборачивается вокруг холмообразной отрицательно-заряженной поверхности, образованной остатками D-петли и прилегающей части α11-спирали (остатки D617-S619 и Q621) (рисунок 31А).



**Рисунок 31.** Электростатические взаимодействия между D-петлями каталитических доменов и петель, несущей остатки R151/E172 (R/E-петля) β-пропеллерного домена в закрытой конформации PSP (А) и TbOrV (Б). Петли H, D и R/E окрашены в фиолетовый, оранжевый и голубой цвета. Аминокислотные остатки L615—Q621 (PSP) и A644—Y653

(TbOpB) из D-петель, а также D146—D154 (PSP) и D167—S175 (TbOpB) из R/E-петель показаны в виде поверхностей и окрашены в соответствии с электростатическим потенциалом. Положительные и отрицательные заряды отмечены синим и красным цветами. Цветовая шкала в единицах kT/e в диапазоне от -50 до +50.

В промежуточной и открытой конформациях PSP все взаимодействия между D-петлями и R-петлями  $\beta$ -пропеллерного домена нарушены (рисунок 30 Б и В). Боковая цепь Q619 вытесняет имидазольное кольцо H652, и сама H-петля вытесняется из центра междоменной полости. В результате, карбоксильная группа D617 образует H-связь с N основной цепи S618, а O основных цепей D617 и L615 образуют H-связь с гуанидиновой группой R33 из N-концевой петли (рисунок 30 Б, таблица 13). В открытой конформации PSP, происходит окончательное разделение доменов (рисунок 30В).

**Таблица 13.** Полярные контакты, соединяющие D- и H-петли друг с другом и с другими структурными элементами каталитического домена в трех конформациях PSP.

Конформации		Закрытая		Промежуточная		Открытая	
Взаимодействующие элементы		Взаимодействующие атомы					
1	2	1	2	1	2	1	2
H-петля	D-петля	M648O	H616NE2			M648O	H616ND1
		S650O	L615N				
		S650O	H616N			G651N	H616O
						D649O	D617H
		<i>H652ND1</i>	<i>D617OD</i> <sub>1/2</sub>			H652N	D617OD1
						G653N	D617OD1
						<i>R658NH</i> <sub>1/2</sub>	<i>D617OD</i> <sub>1/2</sub>
				P658NH1	S618OG		
N-петля, $\beta 2/\alpha 1$				P33NE	L615O		
						R33O	H616NE2
				R33NH2	D617O	R33NH2	Q619O
	$\alpha 11$	P33NH1	Q621OE1	R33NH2	Q621OE1	R33NH2	V620O
$\beta 36/\alpha 7$		S532OG *	H652NE2 *				
$\beta 39$		Y645OH	K655NZ				
$\alpha 12$	H-петля	E663OE2	K655NZ				
		D664OD2	K655N				
						Y662OH	F659O

Контакты внутри петель исключены. Солевые мосты выделены курсивом.

\* В структуре 7YWP атомы ковалентно связаны с ингибитором.

Таким образом, в сборке/разборке каталитической триады TbOpB основную роль играют два остатка, E172 и R650, образующие солевой мостик при сближении доменов друг с другом. В PSP эта функция разделена между остатками из D-петли и примыкающей части  $\alpha 11$ -спирали (S618, Q619 и Q621 соответственно) и парой соседних остатков (R150 и R151) из  $\beta$ -пропеллерного домена. Эти пять остатков образуют две противоположно заряженные комплементарные области на поверхностях  $\beta$ -пропеллерного и каталитического доменов вместо одного междоменного SM1, наблюдаемого в TbOpB (рисунок 31).

Можно заключить, что структуры TbOpB и PSP иллюстрируют два способа стабилизации собранной каталитической триады с помощью разных типов электростатических взаимодействий между D-петлей каталитического домена и противоположной петлей из  $\beta$ -пропеллерного домена. Можно сказать, что в случае PSP стабилизация каталитической триады происходит с участием комплементарных противоположно-заряженных поверхностей с низкой разностью зарядов, а в случае TbOpB - с участием точечного электростатического контакта с высокой разностью зарядов (рисунок 31). Данные способы стабилизации коррелируют с фактом, что в TbOpB оба остатка, образующие SM1, функционально важны [237], а в PSP замена R151 не оказывает заметного влияния на каталитическую активность [238], так как потеря одного из остатков компенсируется оставшимися.



### 3.2. Встречаемость консервативного у протозойных OpV солевого мостика (SM1) в бактериальных OpV

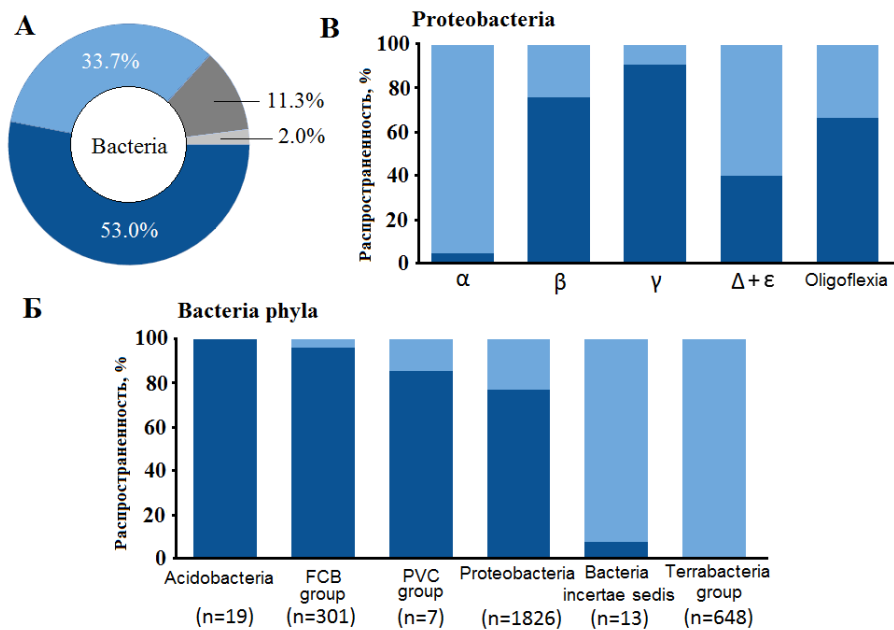
Как уже было сказано ранее, в работе [180] была получена пространственная структура LmOpV в комплексе с ингибитором – аналогом переходного состояния и были описаны 5 солевых мостиков, участвующих в позиционировании доменов OpV в закрытой (активной) конформации. В работе [237] была смоделирована структура TbOpV, в которой были выявлены те же самые SM, а с помощью точечного мутагенеза было установлено, что только три SM важны для функционирования TbOpV. И наконец, в работе [186] были получены структуры TbOpV в закрытой и открытой конформациях и была описана ключевая роль одного из предложенных SM (SM1) в активации фермента (смотри рисунки 29 и 31 и соответствующий текст).

В TbOpV SM1 формируется между R650, находящимся в D-петле каталитического домена и R172, из противоположной петли  $\beta$ -пропеллерного домена. SM1 поддерживает оптимальную для каталитической реакции ориентацию каталитического D648, которая в свою очередь обеспечивает оптимальную ориентацию каталитического H683. Нами было замечено, что в охарактеризованных OpV бактерий остатки R650 и E172, формирующие SM1 в TbOpV, заменены на Q619 и R151, которые не могут сформировать SM. Было решено проверить, насколько широко эти замены распространены в бактериальном царстве.

Аминокислотные последовательности бактериальных OpV (ЕС: 3.4.21.83) были получены из базы данных UniProt (версия 2021\_03). После удаления последовательностей, относящихся к небактериальным, метагеномным и экологическим образцам, в сравнительный анализ был включен отфильтрованный массив из 3243 последовательностей. Полученное множественное выравнивание бактериальных OpV было использовано для поиска SM1 простейших. Очевидно, что для формирования SM1 требуются аминокислотные остатки E (или альтернативный остаток D) и R (или K) в определённых позициях каталитического и пропеллерного доменов. Т.к. остаток K не встречался ни разу, такая комбинация (паттерн) аминокислот была названа E/D-R. В случае PSP, в тех же позициях наблюдалась аминокислотная комбинация R-Q.

Было установлено, что частота встречаемости комбинации E/D-R среди бактериальных OpV составляет 34% (TbOpV-подобная группа), тогда как среди бактериальных OpV преобладает сочетание R-Q в соответствующих позициях (PSP-подобная группа) (рисунок 32). Более 53%

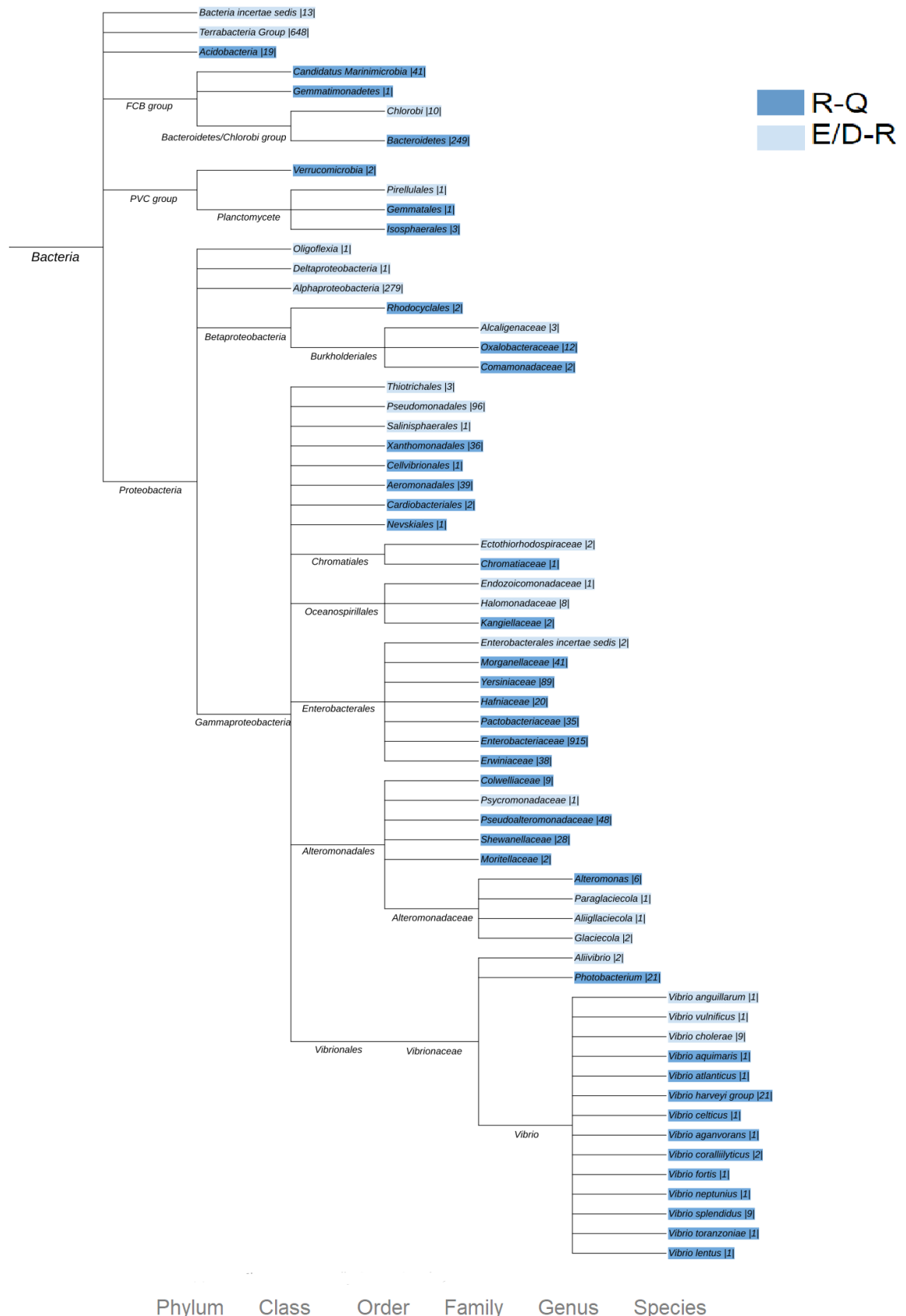
последовательностей OpV попали в группу PSP-подобных. Только 2% последовательностей содержали в соответствующих позициях комбинации, отличные от E/D-R и R-Q, а короткие (менее 500 аминокислотных остатков) последовательности, не охватывающие все рассматриваемые позиции, составили 11% массива. Вышеперечисленные последовательности, составляющие в совокупности 13% массива, были исключены из дальнейшего анализа.



**Рисунок 32.** Частота встречаемости комбинаций аминокислот R-Q и E/D-R в последовательностях бактериальных OpV для всего бактериального царства (А), на уровне отделов (Б) и внутри отдела Proteobacteria (В). Синий цвет соответствует сочетанию аминокислот R-Q, светло-голубой — E/D-R. Темный и светло-серый цвета соответствуют последовательностям с другими комбинациями аминокислот в соответствующих позициях и коротким последовательностям, соответственно. В (Б) Acidobacteria обозначает группу Fibrobacteres/Acidobacteria.

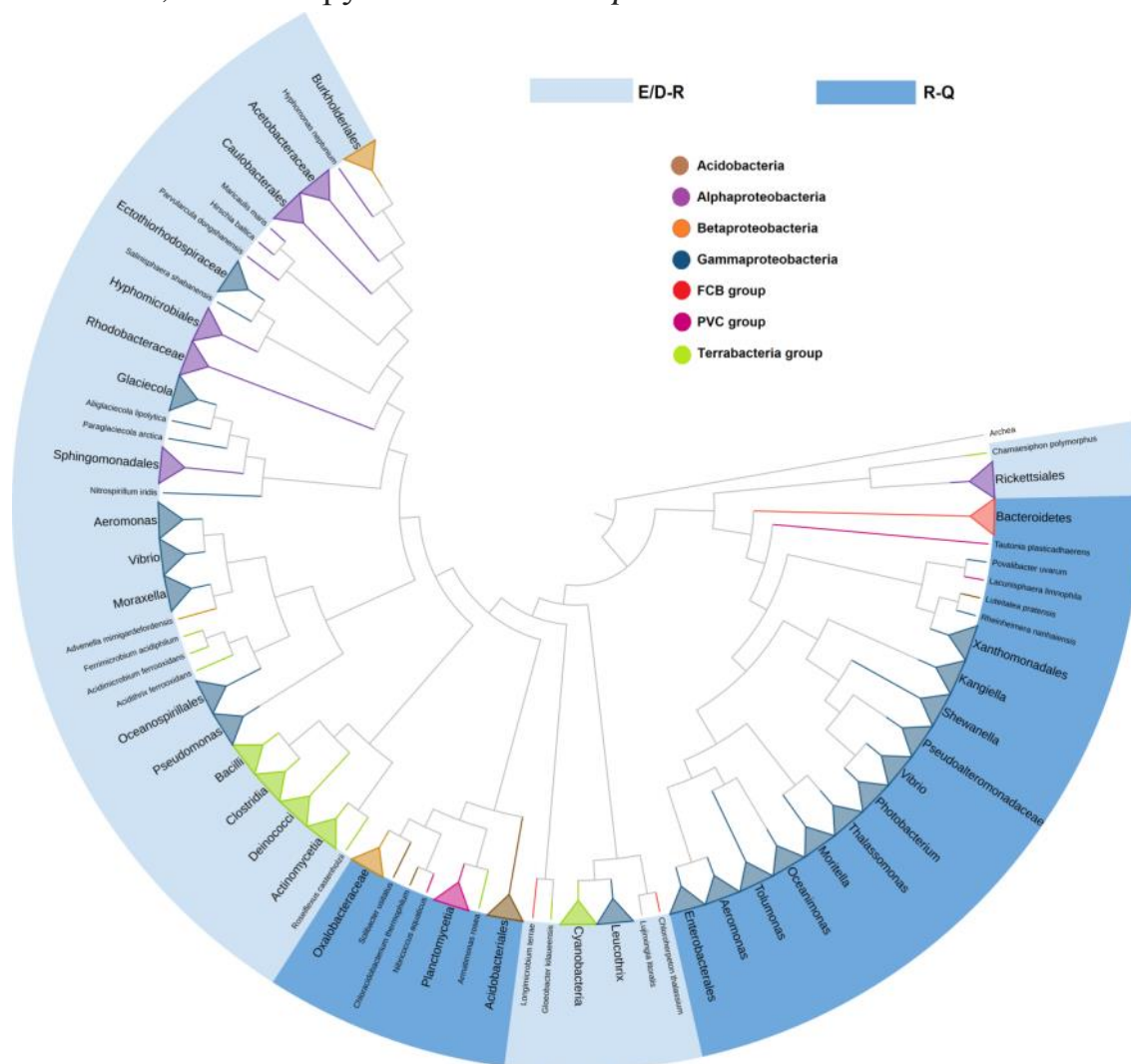
Рисунок 32 Б и В показывает частоту встречаемости аминокислотных паттернов E/D-R и R-Q в различных таксономических группах, составляющих царство бактерий, а также в различных классах группы протеобактерий. PSP-подобные последовательности преобладают в группе Acidobacteria и FCB, TьOpV-подобные - у Terrabacteria superphylum и у Bacteria incertae sedis. У протеобактерий встречаются оба варианта. Паттерн R-Q преобладает у Gammaproteobacteria, а E/D-R - у Alphaproteobacteria. Филогенетическое дерево на рисунке 33 показывает как данные паттерны распределяются на более низких таксономических уровнях.





**Рисунок 33.** Распределение комбинаций аминокислот E/D-R и R-Q по таксономическому дереву. Количество последовательностей в таксономической группе указано в конце каждой ветви. В филогенетическом анализе были использованы 2793 последовательности

Рисунок 34 иллюстрирует распределение паттернов E/D-R и R-Q при филогенетическом анализе 1364 последовательностей бактериальных OpV из наиболее репрезентативных таксономических групп. Анализ выявил два независимых кластера PSP-подобных олигопептидаз. Один кластер включал *Bacteroidetes* и некоторые семейства *Gammaproteobacteria*, второй - *Acidobacteria*, а также группы PVC и *Betaproteobacteria*.

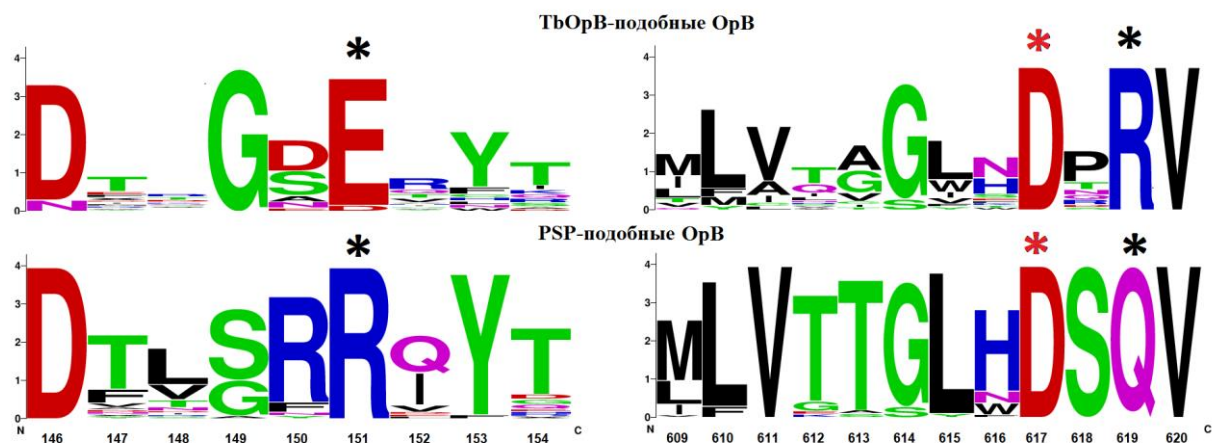


**Рисунок 34.** Два независимых кластера PSP-подобных последовательностей, несущих комбинацию аминокислот R-Q, обнаруженные с помощью филогенетического анализа 1364 последовательностей бактериальных OpV.

В PSP- и TbOpV-подобных группах был проведён поиск дополнительных консервативных аминокислотных различий. Для поиска дополнительных консервативных паттернов были подготовлены консенсусные последовательности для 61 таксономической группы и проведено их множественное выравнивание.

Мы обнаружили, что в PSP и в PSP-подобной группе комбинация R-Q была ассоциирована с высококонсервативными остатками R150 и S618 в

положениях, предшествующих R151 и Q619 соответственно (рисунок 35). Кроме того, остатки T613 и Q621 (нумерация по последовательности PSP), прилегающие к петле, несущей каталитический остаток D617 (D-петля), были высоко консервативны. Консервативных остатков, характерных только для TbOpV-подобной группы, выявлено не было. Нельзя не отметить, что консервативные остатки, выявленные в PSP-подобной группе, как раз и образуют описанные в предыдущей главе противоположно-заряженные комплементарные поверхности, стабилизирующие собранную каталитическую триаду в закрытой конформации PSP (рисунок 31)



**Рисунок 35.** Аминокислотные паттерны, окружающие исходные комбинации E/D-R и R-Q в TbOpV- и PSP-подобных группах. Высота букв пропорциональна частоте появления соответствующего остатка. Остатки, способствующие или препятствующие образованию солевого мостика, отмечены черными звездочками, каталитические D – красными звездочками. Нумерация соответствует последовательности PSP.

### 3.2.1 Стабилизация каталитической триады в моделях PSP- и TbOpV-подобных олигопептидаз B, построенных с помощью программы AlphaFold2

Мы решили проверить, как стабилизируются каталитические триады у случайных представителей бактериальных OpV, принадлежащих либо к PSP-, либо к TbOpV-подобной группе. Для этой цели мы выбрали ферменты из бактериальных патогенов, которые являются возбудителями госпитальных или внутрибольничных инфекций, которые распространяются различными путями среди восприимчивых пациентов в клинической среде. Внутрибольничные возбудители вызывают тяжелую пневмонию или проникают в кровоток, мочевыводящие и желудочно-кишечные тракты. Более того, из-за повышенной множественной лекарственной устойчивости они часто устойчивы к широко используемым антибиотикам, но, как ожидается, будут чувствительны к антимикробным пептидам [239,240].

Внутрибольничные инфекции обычно связаны с шестью высоковирулентными и устойчивыми к антибиотикам бактериями: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* (группа ESKAPE [241], а также с *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* и рядом других.

Последовательности и структуры OpV из *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Maltophilia* и *M. Tuberculosis* были загружены из базы данных UniProt и сопоставлены с таковыми PSP и TbOpV (таблица 14). У грамположительных бактерий *E. Faecium*, *S. Aureus* и *C. difficile*, а также у *A. baumannii* и некоторых патогенных представителей *Enterobacter* OpV не были обнаружены. Все 3D-модели, использованные для сравнительного анализа, были построены с помощью программы AlphaFold2 [242] и представляли ферменты в закрытых конформациях, что позволило оценить способ стабилизации каталитической триады.

**Таблица 14.** Сравнение четырех бактериальных OpV из возбудителей внутрибольничных инфекций, относящихся к PSP- и TbOpV-подобным группам.

Организм	Таксономия <sup>1</sup>	UniProt ID	Идентичность с последовательностью PSP, % <sup>2</sup>	С $\alpha$ -СКО при наложении на структуру PSP, Å <sup>3</sup>	TbOpV или PSP-подобная группа (рисунок)
1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Надтип: Proteobacteria Класс: Gammaproteobacteria Отряд: Enterobacteriales	W1DF1 3	65.63	0.6	PSP-подобный (рисунок 36А)
1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отдел: Proteobacteria Класс: Gammaproteobacteria Отряд: Pseudomonales	Q9I440	42.81	1.3	TbOpV-подобный (рисунок 36Б)
2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Отдел: Proteobacteria Класс: Gammaproteobacteria Отряд: Xanthomonadales	B2FHV 9	50.67	1.1	PSP-подобный (рисунок 36В)
3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Отдел: Terrabacteria	O07178	23.97	2.9	TbOpV-подобный (рисунок 36С)

Организм	Таксономия <sup>1</sup>	UniProt ID	Идентичность с последовательностью PSP, % <sup>2</sup>	Ca-СКО при наложении на структуру PSP, Å <sup>3</sup>	ТbOpB или PSP-подобная группа (рисунок)
					36Г)
4 <i>Trypanosoma Brucei</i> <sup>4</sup>	Царство: Protozoa	O76728	38.10	1.5	рисунок 31Б

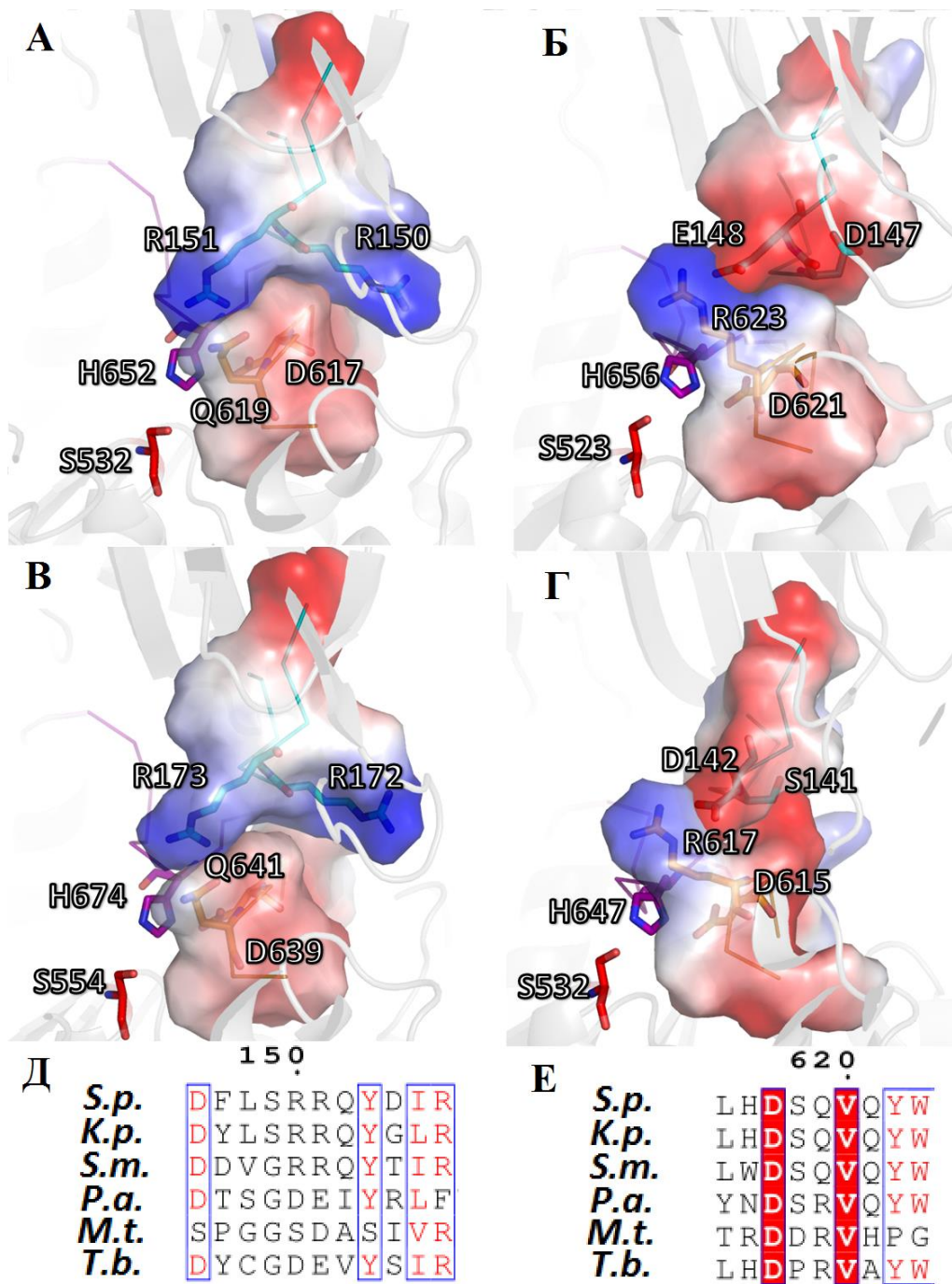
<sup>1</sup> Показаны только таксономические подразделения, важные для отнесения к PSP- и ТbOpB-подобным группам

<sup>2</sup> По данным BLAST

<sup>3</sup> По данным интернет-сервиса Dali.

<sup>4</sup> Включено для сравнения.

Мы обнаружили, что OpB из *K. Pneumonia* и *S. Maltophilia* несут PSP-подобную комбинацию R-Q, которая после наших биоинформатических и структурных исследований была уточнена как паттерн RR-SQ. Как и в PSP (рисунок 31А), этот паттерн RR-SQ вызывал образование комплементарных противоположно заряженных поверхностей между D-петлями и их противоположными партнерскими петлями β-пропеллерных доменов (рисунок 36А, В). В свою очередь, OpB из *P. Aeruginosa* и *M. Tuberculosis* несут ТbOpB-подобные аминокислотные паттерны E/D-R, которые способствуют образованию междоменных СМ (рисунок 36Б, Г).



**Рисунок 36.** Два режима стабилизации каталитических триад в построенных AlphaFold моделях бактериальных OpV из нозокомиальных патогенов. Электростатические взаимодействия между D-петлями каталитических доменов и их противоположными партнерскими R/E-петлями  $\beta$ -пропеллерных доменов показаны для: **А.** *K. pneumoniae* (К.п.), **Б.** *P. Aeruginosa* (P.a.), **В.** *S. Maltophilia* (S.m.), **Г.** *M. Tuberculosis* (M. t.) Петли H, D и R/E окрашены в фиолетовый, оранжевый и голубой цвета соответственно. Аминокислотные остатки 615–621 (К.п.), 619–625 (P.a.), 637–643 (S.m.) и 613–619 (M.t.) из D-петель, а также 146–154 (К.п.), 143–151 (P.a.), 168–176 (S.m.) и 137–145 (M.t.) из R/E-петель показаны в виде поверхностей и окрашены в соответствии с их электростатическим потенциалом. Положительные и отрицательные заряды отмечены синим и красным соответственно. Цветовая шкала в единицах кТ/е в диапазоне от -50 до +50°. **Д, Е.** Сравнение аминокислотных последовательностей R/E- и D-петель соответственно. Высококонсервативные остатки выделены красным цветом, полуконсервативные - окрашены красным. Соответствующие последовательности из PSP (Sp) и TbOpV (Tb) включены для сравнения. Нумерация осуществляется согласно последовательности PSP.



## **ВЫВОДЫ**

- Получены и охарактеризованы мутантные формы PSP. Установлено, что модификация шарнирного региона в ферменте PSPmod отрицательно влияет на каталитическую активность, но способствует кристаллизации фермента. Установлено, что вторым фактором, способствующим кристаллизации PSP, является присутствие полиамина спермина.
- Методом PCA получены пространственные структуры мутантных форм PSP в промежуточной конформации. Методом МУРР показано, что в растворе PSP имеет преимущественно открытую конформацию, а при добавлении спермина фермент принимает промежуточную конформацию.
- Установлено, что модификация шарнирного пептида мало влияет на общую топологию фермента в кристалле, но приводит к появлению междоменного солевого моста, препятствующего сборке каталитической триады.
- Получены пространственные структуры комплексов PSP и PSPmod с ковалентно связанным ингибитором из группы хлорметилкетонов, продемонстрировано два разных способа связывания ингибитора. Структура PSP в комплексе с ингибитором позволила охарактеризовать закрытую (каталитически-активную) конформация фермента и описать тетраэдрическое переходное состояние.
- Установлен новый способ стабилизации каталитической триады в закрытой конформации PSP, отличный от такового у протозойных ферментов (TbOpB и LmOpB). Показано, что по способу стабилизации каталитической триады в закрытой конформации все бактериальные OpB можно разделить на две группы: PSP-подобные и TbOpB-подобные.



## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rawlings N.D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № D1. P. D624–D632.
2. Yadav P. et al. Carboxypeptidase in prolyl oligopeptidase family: Unique enzyme activation and substrate-screening mechanisms // *J Biol Chem.* 2018. Vol. 294, № 1. P. 89–100.
3. Fülöp V., Böcskei Z., Polgár L. Prolyl Oligopeptidase: An Unusual  $\beta$ -Propeller Domain Regulates Proteolysis // *Cell.* Elsevier, 1998. Vol. 94, № 2. P. 161–170.
4. Kiss-Szemán A.J., Harmat V., Menyhárd D.K. Achieving Functionality Through Modular Build-up: Structure and Size Selection of Serine Oligopeptidases // *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol. 20, № 11. P. 1089–1101.
5. Nakajima Y. et al. Dipeptidyl Aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* Exhibits Activity against a Substrate Containing a 4-Hydroxyproline Residue // *J. Bacteriol.* 2008. Vol. 190. P. 7819–7829.
6. Harmat V. et al. Structure and catalysis of acylaminoacyl peptidase: closed and open subunits of a dimer oligopeptidase // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 3. P. 1987–1998.
7. Bhuiyan N.H. et al. Autocatalytic Processing and Substrate Specificity of Arabidopsis Chloroplast Glutamyl Peptidase // *Plant Physiol.* 2020. Vol. 184, № 1. P. 110–129.
8. Yoshimoto T. et al. Prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum*: cloning and sequencing of the enzyme gene // *J Biochem.* 1991. Vol. 110, № 6. P. 873–878.
9. Chevallier S. et al. Characterization of a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium Meningosepticum*. Complete sequence and localization of the active-site serine // *J Biol Chem.* 1992. Vol. 267. P. 8192–8199.
10. Kanatani A. et al. Prolyl Endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: Cloning, Sequencing, and Expression of the Enzyme Gene, and Characterization of the Expressed Enzyme // *J Biochem.* 1993. Vol. 113, № 6. P. 790–796.
11. Harwood V.J., Schreier H.J. Prolyl oligopeptidase from *Pyrococcus furiosus* // *Methods in Enzymology.* Academic Press, 2001. Vol. 330. P. 445–454.
12. Robinson K.A. et al. A gene from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* whose deduced product is homologous to members of the prolyl oligopeptidase family of proteases // *Gene.* 1995. Vol. 152, № 1. P. 103–106.
13. Rennex D. et al. cDNA cloning of porcine brain prolyl endopeptidase and identification of the active-site seryl residue // *Biochemistry.* Vol. 30, № 8. P. 2195–2203.
14. Polgár L. pH-dependent mechanism in the catalysis of prolyl endopeptidase from pig muscle // *Eur J Biochem.* 1991. Vol. 197, № 2. P. 441–447.
15. Ishino T. et al. cDNA Cloning of Mouse Prolyl Endopeptidase and Its Involvement in DNA Synthesis by Swiss 3T3 Cells // *J Biochem.* 1998. Vol. 123, № 3. P. 540–545.
16. Yoshimoto T. et al. Cloning and expression of the cDNA encoding prolyl oligopeptidase (prolyl endopeptidase) from bovine brain // *Biol. Pharm. Bull.* 1997. Vol. 20, № 10. P. 1047–1050.
17. Vanhoof G. et al. Cloning and sequence analysis of the gene encoding human lymphocyte prolyl endopeptidase // *Gene.* 1994. Vol. 149, № 2. P. 363–366.
18. Ohtsuki S. et al. Molecular cloning of cDNA for *Sarcophaga* prolyl endopeptidase and characterization of the recombinant enzyme produced by an *E. coli* expression system // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997. Vol. 27, № 4. P. 337–343.
19. Kiss-Szemán A.J., Harmat V., Menyhárd D.K. Achieving Functionality Through Modular Build-up: Structure and Size Selection of Serine Oligopeptidases // *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol. 20, № 11. P. 1089–1101.
20. Ollis D.L. et al. The alpha/beta hydrolase fold // *Protein Eng.* 1992. Vol. 5, № 3. P. 197–211.

21. Kahyaoglu A. et al. Low Barrier Hydrogen Bond Is Absent in the Catalytic Triads in the Ground State but Is Present in a Transition-state Complex in the Prolyl Oligopeptidase Family of Serine Proteases\* // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 41. P. 25547–25554.
22. Shan L., Mathews I.I., Khosla C. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: Role of interdomain dynamics in catalysis and specificity // *Proc Natl Acad Sci U A.* 2005. Vol. 102, № 10. P. 3599–3604.
23. Li M. et al. Induced-fit Mechanism for Prolyl Endopeptidase // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285. P. 21487–21495.
24. Ellis-Guardiola K. et al. Crystal Structure and Conformational Dynamics of *Pyrococcus furiosus* Prolyl Oligopeptidase // *Biochemistry*. American Chemical Society, 2019. Vol. 58, № 12. P. 1616–1626.
25. Ikehara Y., Ogata S., Misumi Y. [16] Dipeptidyl-peptidase IV from rat liver // *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1994. Vol. 244. P. 215–227.
26. Czekster C.M. et al. Characterization of a dual function macrocyclase enables design and use of efficient macrocyclization substrates: 1 // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
27. Thoma R. et al. Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2003. Vol. 11, № 8. P. 947–959.
28. Haffner C.D. et al. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP) // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. Vol. 18, № 15. P. 4360–4363.
29. Szeltner Z. et al. The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity // *BBA- Proteins Proteomics*. 2013. Vol. 1834, № 1. P. 98–111.
30. Kaszuba K. et al. Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase // *Biochimie*. 2012. Vol. 94, № 6. P. 1398–1411.
31. Fülöp V., Szeltner Z., Polgár L. Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism // *EMBO Rep.* John Wiley & Sons, Ltd, 2000. Vol. 1, № 3. P. 277–281.
32. St-Pierre J.-F. et al. Use of Umbrella Sampling to Calculate the Entrance/Exit Pathway for Z-Pro-Prolinal Inhibitor in Prolyl Oligopeptidase // *J. Chem. Theory Comput.* 2011. Vol. 7. P. 1583.
33. Kaushik S., Sowdhamini R. Structural Analysis of Prolyl Oligopeptidases Using Molecular Docking and Dynamics: Insights into Conformational Changes and Ligand Binding // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 11. P. e26251.
34. Kichik N. et al. 15N Relaxation NMR Studies of Prolyl Oligopeptidase, an 80 kDa Enzyme, Reveal a Pre-existing Equilibrium between Different Conformational States // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 2011. Vol. 12. P. 2737–2739.
35. Szeltner Z. et al. Concerted Structural Changes in the Peptidase and the Propeller Domains of Prolyl Oligopeptidase are Required for Substrate Binding // *J. Mol. Biol.* 2004. Vol. 340, № 3. P. 627–637.
36. Tarrago T. et al. A new side opening on prolyl oligopeptidase revealed by electron microscopy // *FEBS Lett.* 2009. Vol. 583. P. 3344–3348.
37. Miyazono K. et al. Crystal structure and substrate recognition mechanism of the prolyl endopeptidase PEP from *Aspergillus niger* // *Biochem Biophys Res Comm.* 2022. Vol. 591. P. 76–81.
38. Schulz K. et al. A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins // *Process Biochem.* 2018. Vol. 73. P. 47–55.

39. Eugster P.J. et al. Production and characterization of two major *Aspergillus oryzae* secreted prolyl endopeptidases able to efficiently digest proline-rich peptides of gliadin // *Microbiology*. 2015. Vol. 161. P. 2277–2288.
40. Matabaro E. et al. Molecular insight into the enzymatic macrocyclization of multiply backbone N-methylated peptides. *bioRxiv*, 2023. P. 2022.07.21.500988.
41. Luo H. et al. The MSDIN family in amanitin-producing mushrooms and evolution of the prolyl oligopeptidase genes // *IMA Fungus*. 2018. Vol. 9. P. 225–242.
42. Luo H. et al. Peptide Macrocyclization Catalyzed by a Prolyl Oligopeptidase Involved in  $\alpha$ -Amanitin Biosynthesis // *Chem. Biol.* 2014. Vol. 21, № 12. P. 1610–1617.
43. Barbato M.P. Poisoning from accidental ingestion of mushrooms // *Med. J. Aust.* 1993. Vol. 158, № 12. P. 842–847.
44. Ludewig H. et al. Characterization of the Fast and Promiscuous Macrocyclase from Plant PCY1 Enables the Use of Simple Substrates // *ACS Chem. Biol.* American Chemical Society, 2018. Vol. 13, № 3. P. 801–811.
45. Ulmer A.J. et al. CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7 // *Scand. J. Immunol.* 1990. Vol. 31, № 4. P. 429–435.
46. Cunningham D.F., O'Connor B. Proline specific peptidases // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. Vol. 1343, № 2. P. 160–186.
47. Weihofen W.A. et al. Crystal Structure of CD26/Dipeptidyl-peptidase IV in Complex with Adenosine Deaminase Reveals a Highly Amphiphilic Interface \* // *J. Biol. Chem.* Elsevier, 2004. Vol. 279, № 41. P. 43330–43335.
48. Engel M. et al. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism // *PNAS*. 2003. Vol. 100, № 9. P. 5063–5068.
49. Hiramatsu H. et al. The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed  $\beta$ -propeller fold // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. Vol. 302, № 4. P. 849–854.
50. Baharin A., Ting T.-Y., Goh H.-H. Post-Proline Cleaving Enzymes (PPCEs): Classification, Structure, Molecular Properties, and Applications // *Plants*. 2022. Vol. 11, № 10. P. 1330.
51. Li N. et al. Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 151. P. 145–157.
52. Lee H.K. et al. Unique binding mode of Evogliptin with human dipeptidyl peptidase IV // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. Vol. 494, № 3. P. 452–459.
53. Aertgeerts K. et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 20. P. 19441–19444.
54. Hamson E. et al. Understanding Fibroblast Activation Protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. // *Proteomics Clin. Appl.* 2014. Vol. 8.
55. Altmann A., Haberkorn U., Siveke J. The Latest Developments in Imaging of Fibroblast Activation Protein // *J. Nucl. Med. Society of Nuclear Medicine*, 2021. Vol. 62, № 2. P. 160–167.
56. Lee K.N. et al. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein // *Blood*. 2006. Vol. 107, № 4. P. 1397–1404.
57. Park J.E. et al. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 51. P. 36505–36512.
58. Zhang H. et al. Dipeptidyl peptidase 9 subcellular localization and a role in cell adhesion involving focal adhesion kinase and paxillin // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2015. Vol. 1853, № 2. P. 470–480.
59. Meester I.D. Chapter 747 - Dipeptidyl-peptidase 9 // *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)* / ed. Rawlings N.D., Salvesen G. Academic Press, 2013. P. 3384–3389.

60. Silva-Garcia M. et al. Dipeptidyl peptidase 9 triggers BRCA2 degradation by the N-degron pathway to promote DNA-damage repair. *bioRxiv*, 2020. P. 2020.08.24.265033.
61. Zhang H. (Emma) et al. Identification of Novel Dipeptidyl Peptidase 9 Substrates by 2D DIGE // *FEBS J.* 2015. Vol. 282.
62. Justa-Schuch D. et al. DPP9 is a novel component of the N-end rule pathway targeting the tyrosine kinase Syk // *eLife* / ed. Freeman M. 2016. Vol. 5. P. e16370.
63. Varshavsky A. N-degron and C-degron pathways of protein degradation // *PNAS.* 2019. Vol. 116. P. 358–366.
64. Gall M. et al. Targeted Inactivation of Dipeptidyl Peptidase 9 Enzymatic Activity Causes Mouse Neonate Lethality // *PloS One.* 2013. Vol. 8. P. e78378.
65. de Vasconcelos N. et al. DPP8/DPP9 inhibition elicits canonical Nlrp1b inflammasome hallmarks in murine macrophages // *Life Sci. Alliance.* 2019. Vol. 2.
66. Pilla E. et al. A Novel SUMO1-specific Interacting Motif in Dipeptidyl Peptidase 9 (DPP9) That Is Important for Enzymatic Regulation \* // *J. Biol. Chem. Elsevier*, 2012. Vol. 287, № 53. P. 44320–44329.
67. Johnson D.C. et al. DPP8/DPP9 inhibitor-induced pyroptosis for treatment of acute myeloid leukemia // *Nat. Med.* 2018. Vol. 24, № 8. P. 1151–1156.
68. Ross B. et al. Structures and mechanism of dipeptidyl peptidases 8 and 9, important players in cellular homeostasis and cancer // *PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. Vol. 115, № 7. P. E1437–E1445.
69. Jones W.M., Manning L.R., Manning J.M. Enzymic cleavage of the blocked amino terminal residues of peptides // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 139, № 1. P. 244–250.
70. Jones W.M., Manning J.M. Acylpeptide hydrolase activity from erythrocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. Vol. 126, № 2. P. 933–940.
71. Tsunasawa S., Narita K., Ogata K. Purification and properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1975. Vol. 77, № 1? P. 89–102.
72. Gade W., Brown J.L. Purification and partial characterization of alpha-N-acylpeptide hydrolase from bovine liver. // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253, № 14. P. 5012–5018.
73. Yamauchi Y. et al. Identification and biochemical characterization of plant acylamino acid-releasing enzyme // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2003. Vol. 134, № 2. P. 251–257.
74. Kiss-Szemán A.J. et al. A carbapenem antibiotic inhibiting a mammalian serine protease: structure of the acylaminoacyl peptidase–meropenem complex // *Chem. Sci.* Vol. 13, № 48. P. 14264–14276.
75. Kiss-Szemán A.J. et al. Cryo-EM structure of acylpeptide hydrolase reveals substrate selection by multimerization and a multi-state serine-protease triad // *Chem. Sci.* Vol. 13, № 24. P. 7132–7142.
76. Scaloni A. et al. Human acylpeptide hydrolase. Studies on its thiol groups and mechanism of action // *J Biol Chem.* 1994. Vol. 269, № 21. P. 15076–15084.
77. Yang G. et al. Glu88 in the non-catalytic domain of acylpeptide hydrolase plays dual roles: charge neutralization for enzymatic activity and formation of salt bridge for thermodynamic stability // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1794, № 1. P. 94–102.
78. Menyhárd D. et al. Catalytically distinct states captured in a crystal lattice: the substrate-bound and scavenger states of acylaminoacyl peptidase and their implications for functionality // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2015. Vol. 71. P. 461–472.
79. Laing W.A., Christeller J.T. A Plant Chloroplast Glutamyl Proteinase // *Plant Physiol.* 1997. Vol. 114, № 2. P. 715–722.
80. Yamauchi Y. et al. A high molecular weight glutamyl endopeptidase and its endogenous inhibitors from cucumber leaves // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2001. Vol. 130, № 2. P. 257–261.
81. Betts M., Russell R. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. P. 311–342. DOI: 10.1002/9780470059180.ch13.

82. Wu G. et al. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition // *Amino Acids*. 2011. Vol. 40, № 4. P. 1053–1063.
83. Shewry P.R., Halford N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization // *J Exp Bot*. 2002. Vol. 53, № 307. P. 947–958.
84. Dunaevsky Y.E. et al. Human proline specific peptidases: A comprehensive analysis // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj*. 2020. Vol. 1864, № 9. P. 129636.
85. Терещенкова В.Ф. et al. Получение и очистка рекомбинантной дипептидилпептидазы 4 *Tenebrio molitor* // *Прикладная Биохимия И Микробиология*. 2019. Vol. 55, № 3. P. 231–236.
86. Белозерский М.А. et al. Свойства постпролинрасщепляющих ферментов из *Tenebrio Molitor* // *Биоорганическая Химия*. 2008. Vol. 34, № 3.
87. López-Otín C., Matrisian L.M. Emerging roles of proteases in tumour suppression // *Nat. Rev. Cancer*. 2007. Vol. 7, № 10. P. 800–808.
88. Myöhänen T. et al. Distribution of Immunoreactive Prolyl Oligopeptidase in Human and Rat Brain // *Neurochem. Res*. 2007. Vol. 32. P. 1365–1374.
89. Triposkiadis F. et al. Obesity, inflammation, and heart failure: links and misconceptions // *Heart Fail. Rev*. 2021. Vol. 27.
90. Hatanaka T. et al. Extracellular Production and Characterization of *Streptomyces* X-prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase // *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2011. Vol. 164, № 4. P. 475–486.
91. Lebeau R. et al. Peripheral proteomic changes after electroconvulsive seizures in a rodent model of non-response to chronic fluoxetine // *Front. Pharmacol*. 2022. Vol. 13. P. 993449.
92. Osorio C. et al. Development of wheat genotypes expressing a glutamine-specific endoprotease from barley and a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* or *Pyrococcus furiosus* as a potential remedy to celiac disease // *Funct. Integr. Genomics*. 2019. Vol. 19.
93. Tenorio-Laranga J. et al. Prolyl oligopeptidase is inhibited in relapsing-remitting multiple sclerosis // *J. Neuroinflammation*. 2010. Vol. 7. P. 23.
94. Portugal B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Prolyl Oligopeptidase Induces In vitro Secretion of Proinflammatory Cytokines by Peritoneal Macrophages // *Front. Microbiol*. 2017. Vol. 8. P. 1.
95. Maes M. et al. Lower serum activity of prolyl endopeptidase in anorexia and bulimia nervosa // *Psychoneuroendocrinology*. 2001. Vol. 26. P. 17–26.
96. Frenssen F. et al. Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are associated with externalizing and aggressive behaviors in normal and autistic adolescents // *Life Sci*. 2015. Vol. 136.
97. Kiss A.L. et al. The Acylaminoacyl Peptidase from *Aeropyrum pernix* K1 Thought to Be an Exopeptidase Displays Endopeptidase Activity // *J. Mol. Biol*. 2007. Vol. 368, № 2. P. 509–520.
98. Momeni N. et al. Alterations of prolyl endopeptidase activity in the plasma of children with autistic spectrum disorders // *BMC Psychiatry*. 2005. Vol. 5, № 1. P. 27.
99. Yu J. et al. Characterization and rational design for substrate specificity of a prolyl endopeptidase from *Stenotrophomonas maltophilia* // *Enzyme Microb. Technol*. 2020. Vol. 138. P. 109548.
100. Zolotov N. et al. Therapeutic Effect of Novel Cyanopyrrolidine-Based Prolyl Oligopeptidase Inhibitors in Rat Models of Amnesia // *Front. Chem*. 2021. Vol. 9.
101. Tenorio-Laranga J., T. Mannisto P., Arturo Garcia-Horsman J. Hunting for Peptide Substrates of Prolyl Oligopeptidase: Classical Versus Non-Classical Bioactive Peptides // *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets*. 2011. Vol. 10, № 3. P. 319–326.
102. Breen G. et al. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients // *Bipolar Disord*. 2004. Vol. 6, № 2. P. 156–161.

103. Valdivia A. et al. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia // *Regul. Pept.* 2004. Vol. 122, № 2. P. 79–84.
104. Insel T.R. Oxytocin — A neuropeptide for affiliation: Evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies // *Psychoneuroendocrinology.* 1992. Vol. 17, № 1. P. 3–35.
105. Triposkiadis F. et al. The Counter Regulatory Axis of the Lung Renin-Angiotensin System in Severe COVID-19: Physiopathology and Clinical Implications // *Heart Lung Circ.* 2020. Vol. 30, № 6. P. 786–794.
106. van Houwelingen, A. H., et al. Induction of lung emphysema is prevented by L-arginine-threonine-arginine // *FASEB J.* 2008. P. 3403–3408.
107. Patel, D.F., Snelgrove R.J. The multifaceted roles of the matrikine Pro-Gly-Pro in pulmonary health and disease | European Respiratory Society // *Eur. Respir. Rev.* 2018. Vol. 27. P. 180017.
108. Singh A.-K. et al. Quercetin and Coumarin Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV and Exhibits Antioxidant Properties: In Silico, In Vitro, Ex Vivo: 2 // *Biomolecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute,* 2020. Vol. 10, № 2. P. 207.
109. Deacon C. Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes // *Front. Endocrinol.* 2019. Vol. 10. P. 80.
110. Prokai-Tatrai K. et al. Brain Delivery of Thyrotropin-Releasing Hormone via a Novel Prodrug Approach // *Pharmaceutics.* 2019. Vol. 11. P. 349.
111. Nongonierma A.B., FitzGerald R.J. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides // *J. Funct. Foods.* 2013. Vol. 5, № 4. P. 1909–1917.
112. Ramírez Fuentes L., Richard C., Chen L. Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein // *J. Funct. Foods.* 2021. Vol. 87. P. 104829.
113. Liang Z. et al. 3D-QSAR, in vitro assay and MD simulations studies on the design, bioactivities and different inhibitory modes of the novel DPP-IV inhibitory peptides // *J. Mol. Struct.* 2023. Vol. 1283. P. 135271.
114. Kamada S. et al. Functional inhibition of cancer stemness-related protein DPP4 rescues tyrosine kinase inhibitor resistance in renal cell carcinoma: 22 // *Oncogene. Nature Publishing Group,* 2021. Vol. 40, № 22. P. 3899–3913.
115. Varona A. et al. Expression and activity profiles of DPP IV/CD26 and NEP/CD10 glycoproteins in the human renal cancer are tumor-type dependent // *BMC Cancer.* 2010. Vol. 10. P. 193.
116. Egger C. et al. Effects of the Fibroblast Activation Protein Inhibitor, PT100, in a murine Model of pulmonary Fibrosis | Request PDF // *Eur J Pharmacol.* 2017. Vol. 809. P. 0014–2999.
117. Chandan K.N. et al. Global fibroblast activation throughout the left ventricle but localized fibrosis after myocardial infarction | *Scientific Reports* // *Sci Rep.* 2017. Vol. 7. P. 10801.
118. Rettig W.J. et al. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin // *Cancer Res.* 1993. Vol. 53, № 14. P. 3327–3335.
119. Park J., Cho J., Song E.J. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment // *Arch. Pharm. Res.* 2020. Vol. 43, № 11. P. 1144–1161.
120. Martínez-Jiménez F. et al. A compendium of mutational cancer driver genes // *Nat. Rev. Cancer.* 2020. Vol. 20, № 10. P. 555–572.
121. Tan L. et al. Acylpeptide hydrolase is a novel regulator of KRAS plasma membrane localization and function // *J. Cell Sci.* 2019. Vol. 132, № 15. P. jcs232132.
122. Zeng Z. et al. Acylpeptide hydrolase is a component of the cellular response to DNA damage // *DNA Repair.* 2017. Vol. 58. P. 52–61.

123. Bastos I. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells // *Biochem. J.* 2005. Vol. 388. P. 29–38.
124. Feng H. et al. The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 2242.
125. Troeberg L. et al. Proteases from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, characterisation and interactions with host regulatory molecules // *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 238, № 3. P. 728–736.
126. Motta F.N. et al. Oligopeptidase B, a missing enzyme in mammals and a potential drug target for trypanosomatid diseases // *Biochimie.* 2019. Vol. 167. P. 207–216.
127. Leishmaniasis [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis> (accessed: 24.05.2023).
128. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease> (accessed: 24.05.2023).
129. Tardieux I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells // *Cell.* 1992. Vol. 71, № 7. P. 1117–1130.
130. Rodríguez A. et al. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport // *J. Cell Biol.* 1996. Vol. 134, № 2. P. 349–362.
131. Burleigh B.A. et al. A Cytosolic Serine Endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* Is Required for the Generation of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Mammalian Cells // *J Cell Biol.* 1997. Vol. 136, № 3. P. 609–620.
132. Rodríguez A. et al. A trypanosome-soluble factor induces IP<sub>3</sub> formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells // *J. Cell Biol.* 1995. Vol. 129, № 5. P. 1263–1273.
133. Burleigh B.A., Andrews N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49. P. 175–200.
134. Fernandes L.C. et al. Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B // *Microbes Infect.* 2005. Vol. 7, № 3. P. 375–384.
135. Illenberger, Daria et al. Specificity and Structural Requirements of Phospholipase C- $\beta$  Stimulation by Rho GTPases Versus G Protein  $\beta\gamma$  Dimers // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 5. P. 3006–3014.
136. Caler E.V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* // *EMBO J.* 1998. Vol. 17, № 17. P. 4975–4986.
137. Caler E.V. et al. Dual Role of Signaling Pathways Leading to Ca<sup>2+</sup> and Cyclic AMP Elevation in Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. 2000. Vol. 68. P. 6602–6610.
138. Spivak-Kroizman T. et al. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation // *Cell.* 1994. Vol. 79, № 6. P. 1015–1024.
139. Burleigh B.A., Andrews N.W. A 120-kDa Alkaline Peptidase from *Trypanosoma cruzi* Is Involved in the Generation of a Novel Ca<sup>2+</sup>-signaling Factor for Mammalian Cells (\*) // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270, № 10. P. 5172–5180.
140. Jezyk M. et al. Crystal structure of Rac1 bound to its effector phospholipase C-2 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 13. P. 1135–1140.
141. Goossens F. et al. The Purification, Characterization and Analysis of Primary and Secondary-Structure of Prolyl Oligopeptidase from Human Lymphocytes - Goossens - 1995 - *European Journal of Biochemistry* - Wiley Online Library // *Eur J Biochem.* 1995. Vol. 233, № 2. P. 432–441.
142. Okenu Daniel M.N. et al. Purification and characterisation of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei* // *Parasitol. Res.* 1999. Vol. 85. P. 424–428.



143. Tetaert D. et al. Unusual cleavage of peptidic hormones generated by trypanosome enzymes released in infested rat serum // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1993. Vol. 41, № 2. P. 147–152.
144. Bastos I.M.D. et al. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice // *Microbes Infect.* 2010. Vol. 12, № 6. P. 457–466.
145. Rojas F. et al. Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing // *Cell.* 2019. Vol. 176, № 1. P. 306-317.e16.
146. Morty R.E. et al. Trypanosome-derived oligopeptidase B is released into the plasma of infected rodents, where it persists and retains full catalytic activity // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 69, № 4. P. 2757–2761.
147. Geiger A. et al. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma* // *BMC Microbiol.* 2010. Vol. 10. P. 20.
148. Kangethe R. et al. *Trypanosoma brucei brucei* oligopeptidase B null mutants display increased prolyl oligopeptidase-like activity // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011. Vol. 182. P. 7–16.
149. Moss C.X. et al. An essential signal peptide peptidase identified in an RNAi screen of serine peptidases of *Trypanosoma brucei* // *PloS One.* 2015. Vol. 10, № 3. P. e0123241.
150. Desquesnes M. et al. *Trypanosoma evansi* and *surra*: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects // *BioMed Res. Int.* 2013. Vol. 2013. P. 194176.
151. Morty R.E. et al. Oligopeptidase B from *Trypanosoma evansi*. A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 12. P. 10925–10937.
152. Gaur R.S. et al. Classico-molecular targeting of oligopeptidase B, cysteine protease and variable surface glycoprotein (VSG) genes of *Trypanosoma evansi* // *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 2017. Vol. 41, № 1. P. 51–54.
153. Barbosa, G., Marana, S., Stolf, B. Characterization of *Leishmania (L.) amazonensis* oligopeptidase B and its role in macrophage infection | *Parasitology* | Cambridge Core // *Parasitology.* Vol. 149, № 11. P. 1411–1418.
154. Swenerton R.K. et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 1. P. 429–440.
155. Gamboa D. et al. Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis* // *Parasitology.* 2007. Vol. 134. P. 1689–1698.
156. Munday J.C. et al. Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011. Vol. 175, № 1. P. 49–57.
157. Silverman J.M. et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani* // *Genome Biol.* 2008. Vol. 9, № 2. P. R35.
158. Silverman J.M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages // *J. Cell Sci.* 2010. Vol. 123, № Pt 6. P. 842–852.
159. Teixeira P.C. et al. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, trypanredoxin peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice // *PLoS Negl Trop Dis.* 2015. Vol. 9, № 2. P. e0003411.
160. Pacaud M., Richaud C. Protease II from *Escherichia coli*. Purification and characterization // *J. Biol. Chem.* 1975. Vol. 250, № 19. P. 7771–7779.
161. Kanatani A. et al. Protease II from *Escherichia coli*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme // *J Biochem.* 1991. Vol. 110, № 3. P. 315–320.
162. Polgár L. A potential processing enzyme in prokaryotes: Oligopeptidase B, a new type of serine peptidase // *PROTEINS Struct. Funct. Genet.* 1997. Vol. 28. P. 375–379.

163. Bongertz V., Hungerer K.D. Trypanosoma cruzi: isolation and characterization of a protease // Exp. Parasitol. 1978. Vol. 45, № 1. P. 8–18.
164. de Matos Guedes H.L. et al. Oligopeptidase B from Leishmania amazonensis: molecular cloning, gene expression analysis and molecular model // Parasitol. Res. 2007. Vol. 101, № 4. P. 865–875.
165. Matheson N., Schmidt J., Travis J. Isolation and properties of an angiotensin II-cleaving peptidase from mesquite pollen // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995. Vol. 12, № 4. P. 441–448.
166. Bagarozzi D., Potempa J., Travis J. Purification and Characterization of an Arginine-specific Peptidase from Ragweed ( Ambrosia artemisiifolia ) Pollen // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1998. Vol. 18. P. 363–369.
167. Guo Z.-J., Lamb C., Dixon R.A. A serine protease from suspension-cultured soybean cells // Phytochemistry. 1998. Vol. 47, № 4. P. 547–553.
168. Franzén O. et al. Comparative genomic analysis of human infective Trypanosoma cruzi lineages with the bat-restricted subspecies T. cruzi marinkellei // BMC Genomics. 2012. Vol. 13. P. 531.
169. Haag J., 'hUigin C., Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. | Semantic Scholar // Mol. Biochem. Parasitol. 1998. Vol. 91, № 1. P. 37–49.
170. Barrett A., Rawlings N. Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family // Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 1992. Vol. 373. P. 353-360,.
171. de Matos Guedes H.L. et al. Oligopeptidase B2 from Leishmania amazonensis with an unusual C-terminal extension // Acta Parasitol. 2008. Vol. 53. P. 197–204.
172. Bayona J.C. et al. SUMOylation Pathway in Trypanosoma cruzi: Functional Characterization and Proteomic Analysis of Target Proteins Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport // Mol. Cell. Proteomics. 2011. Vol. 10, № 12. P. M110.007369.
173. Morty R.E. et al. Purification and characterisation of a trypsin-like serine oligopeptidase from Trypanosoma congolense // Mol. Biochem. Parasitol. 1999. Vol. 102, № 1. P. 145–155.
174. Mattiuzzo M. et al. Proteolytic activity of Escherichia coli oligopeptidase B against proline-rich antimicrobial peptides // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 24, № 2. P. 160–167.
175. Coetzer T.H.T., Goldring J.P.D., Huson L.E.J. Oligopeptidase B: A processing peptidase involved in pathogenesis // Biochimie. 2008. Vol. 90, № 2. P. 336–344.
176. Santana J.M. et al. Purification and characterization of a new 120 kDa alkaline proteinase of Trypanosoma cruzi // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. Vol. 187, № 3. P. 1466–1473.
177. Morty R.E. et al. Oligopeptidase B from Trypanosoma brucei, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 37. P. 26149–26156.
178. Motta F.N. et al. The Trypanosoma cruzi virulence factor oligopeptidase B (OPBTc) assembles into an active and stable dimer // PloS One. 2012. Vol. 7, № 1. P. e30431.
179. Mohd Ismail N.I. et al. A critical role for highly conserved Glu(610) residue of oligopeptidase B from Trypanosoma brucei in thermal stability // J. Biochem. (Tokyo). 2010. Vol. 147, № 2. P. 201–211.
180. McLuskey K. et al. Crystal Structure of Leishmania major Oligopeptidase B Gives Insight into the Enzymatic Properties of a Trypanosomatid Virulence Factor \* // J. Biol. Chem. Elsevier, 2010. Vol. 285, № 50. P. 39249–39259.
181. Morty R.E. et al. Identification of the reactive cysteine residues in oligopeptidase B from Trypanosoma brucei // FEBS Lett. 2005. Vol. 579, № 10. P. 2191–2196.

182. Silva-Lopez R.E. et al. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes // *Parasitol. Res.* 2007. Vol. 101, № 6. P. 1627–1635.
183. Souza-Silva F. et al. Epoxy- $\alpha$ -lapachone has in vitro and in vivo anti-leishmania (*Leishmania*) *amazonensis* effects and inhibits serine proteinase activity in this parasite // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. Vol. 59, № 4. P. 1910–1918.
184. Tsuji A. et al. Protamine: a unique and potent inhibitor of oligopeptidase B // *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 2006. Vol. 12, № 1. P. 65–71.
185. Gérczei T., Keserü G.M., Náray-Szabó G. Construction of a 3D model of oligopeptidase B, a potential processing enzyme in prokaryotes // *J. Mol. Graph. Model.* 2000. Vol. 18, № 1. P. 7–17, 57–58.
186. Canning P. et al. Crystal Structures of *Trypanosoma brucei* Oligopeptidase B Broaden the Paradigm of Catalytic Regulation in Prolyl Oligopeptidase Family Enzymes // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, № 11. P. e79349.
187. Mikhailova A.G. et al. Activity modulation of the oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* by site-directed mutagenesis of amino acid residues surrounding catalytic triad histidine // *Biochimie.* 2017. Vol. 139. P. 125–136.
188. Михайлова А.Г. et al. Новая психрофильная трипсиноподобная протеиназа из *Serratia proteamaculans* // *Биохимия.* 2006. Vol. 71, № 5. P. 697–706.
189. Хайруллин Р.Ф. и др. Олигопептидаза В из *serratia proteamaculans*. I. Определение первичной структуры, выделение и очистка природного и рекомбинантного фермента // *Биохимия.* 2009. Vol. 74, № 10. P. 1427–1437.
190. Михайлова А.Г. et al. Олигопептидаза В из *Serratia proteamaculans*. II. Энзиматическая характеристика - субстратный анализ, влияние ионов кальция, pH и температурная зависимость // *Биохимия.* 2011. Vol. 76, № 4. P. 590–602.
191. Михайлова А.Г. и др. Олигопептидаза В из *serratia proteamaculans*. Ч. III. Ингибиторный анализ. Особенности взаимодействия с ингибиторами металлопротеиназ // *Биохимия.* 2012. Vol. 77, № 3. P. 384–391.
192. Mikhailova A.G. et al. Cloning, sequencing, expression, and characterization of thermostability of oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*, a novel psychrophilic protease // *Protein Expr. Purif.* 2014. Vol. 93. P. 63–76.
193. Михайлова А.Г. et al. Укороченные варианты олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с измененной активностью // *Биохимия.* 2015. Vol. 80, № 11. P. 1741–1755.
194. Агапова Ю.К. et al. Изучение связывания субстратов с двумя положительно заряженными аминокислотными остатками олигопептидазой В из *Serratia proteamaculans* методом молекулярной динамики // *Кристаллография.* 2019. Vol. 64, № 5. P. 747–753.
195. Makarova O., Kamberov E., Margolis B. Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step // *BioTechniques.* 2000. Vol. 29, № 5. P. 970–972.
196. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
197. Walsh K.A., Wilcox P.E. [3] Serine proteases // *Methods in Enzymology.* Academic Press, 1970. Vol. 19. P. 31–41.
198. Huynh K., Partch C.L. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2015. Vol. 79. P. 28.9.1-28.9.14.
199. Long F. et al. BALBES: a molecular-replacement pipeline: 1 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography,* 2008. Vol. 64, № 1. P. 125–132.
200. Murshudov G.N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures: 4 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography,* 2011. Vol. 67, № 4. P. 355–367.

201. Emsley P. et al. Features and development of Coot: 4 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.
202. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 372, № 3. P. 774–797.
203. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994. Vol. 50, № Pt 5. P. 760–763.
204. Holm L. Using Dali for Protein Structure Comparison // *Structural Bioinformatics: Methods and Protocols* / ed. Gáspári Z. New York, NY: Springer US, 2020. P. 29–42.
205. Kitz R., Wilson I.B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase // *J. Biol. Chem.* 1962. Vol. 237. P. 3245–3249.
206. Lu D. et al. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide11 Edited by R. Huber // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 292, № 2. P. 361–373.
207. Collen D. et al. Kinetic properties of tripeptide lysyl chloromethyl ketone and lysyl p-nitroanilide derivatives towards trypsin-like serine proteinases // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* 1980. Vol. 615, № 1. P. 158–166.
208. Manalastas-Cantos K. et al. ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis: 1 // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2021. Vol. 54, № 1. P. 343–355.
209. Hopkins J.B., Gillilan R.E., Skou S. BioXTAS RAW: improvements to a free open-source program for small-angle X-ray scattering data reduction and analysis: 5 // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2017. Vol. 50, № 5. P. 1545–1553.
210. Svergun D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria: 4 // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1992. Vol. 25, № 4. P. 495–503.
211. Schneidman-Duhovny D. et al. Accurate SAXS profile computation and its assessment by contrast variation experiments // *Biophys. J.* 2013. Vol. 105, № 4. P. 962–974.
212. Svergun D., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates: 6 // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.
213. Abraham M.J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* Elsevier, 2015. Vol. 1. P. 19–25.
214. Lindorff-Larsen K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2010. Vol. 78, № 8. P. 1950–1958.
215. Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25, № 13. P. 1605–1612.
216. Berendsen H.J.C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 81. P. 3684–3690.
217. Parrinello M., Rahman A. Strain fluctuations and elastic constants // *J. Chem. Phys.* 1982. Vol. 76. P. 2662–2666.
218. York D.M., Darden T.A., Pedersen L.G. The effect of long-range electrostatic interactions in simulations of macromolecular crystals: A comparison of the Ewald and truncated list methods // *J. Chem. Phys.* American Institute of Physics Publishing LLC, 1993. Vol. 99, № 10. P. 8345–8348.
219. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 // *Nucleic Acids Res.* 2021. Vol. 49, № D1. P. D480–D489.
220. Sievers F., Higgins D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences // *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 2018. Vol. 27, № 1. P. 135–145.
221. Waterhouse A.M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2009. Vol. 25, № 9. P. 1189–1191.

222. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments // *PloS One*. 2010. Vol. 5, № 3. P. e9490.
223. Madeira F. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 // *Nucleic Acids Res.* 2022. Vol. 50, № W1. P. W276–W279.
224. Frydrych I., Mlejnek P. Serine protease inhibitors N-alpha-tosyl-L-lysiny-chloromethylketone (TLCK) and N-tosyl-L-phenylalaniny-chloromethylketone (TPCK) are potent inhibitors of activated caspase proteases // *J. Cell. Biochem.* 2008. Vol. 103, № 5. P. 1646–1656.
225. Asztalos P. et al. Atomic resolution structure of a lysine-specific endoproteinase from *Lysobacter enzymogenes* suggests a hydroxyl group bound to the oxyanion hole: 7 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2014. Vol. 70, № 7. P. 1832–1843.
226. Drenth J., Kalk K.H., Swen H.M. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain // *Biochemistry*. 1976. Vol. 15, № 17. P. 3731–3738.
227. Azarkan M. et al. Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and in vitro study of their cytotoxicity // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 19570.
228. Ericsson U.B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies // *Anal. Biochem.* 2006. Vol. 357, № 2. P. 289–298.
229. Kozak S. et al. Optimization of protein samples for NMR using thermal shift assays // *J. Biomol. NMR.* 2016. Vol. 64, № 4. P. 281–289.
230. Ovchinnikova M.V. et al. Reversible Cyclic Thermal Inactivation of Oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans*: 2 // *Acta Naturae*. 2018. Vol. 10, № 2. P. 65–70.
231. Russo Krauss I. et al. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization: 6 // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2013. Vol. 14, № 6. P. 11643–11691.
232. Bond C.S. TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons // *Bioinformatics*. 2003. Vol. 19, № 2. P. 311–312.
233. Yan J.-B. et al. High-level expression and purification of *Escherichia coli* oligopeptidase B // *Protein Expr. Purif.* 2006. Vol. 47, № 2. P. 645–650.
234. Morty R.E., Fülöp V., Andrews N.W. Substrate recognition properties of oligopeptidase B from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *J. Bacteriol.* 2002. Vol. 184, № 12. P. 3329–3337.
235. Farhadian S., Shareghi B., Saboury A.A. Exploring the thermal stability and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin in the presence of spermine // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2017. Vol. 35, № 2. P. 435–448.
236. Svergun D.I. Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering / D.I. Svergun and L.A. Feigin; edited by George W. Taylor. New York: Plenum Press, 1987.
237. Fukumoto J. et al. Possible role of inter-domain salt bridges in oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*: critical role of Glu172 of non-catalytic  $\beta$ -propeller domain in catalytic activity and Glu490 of catalytic domain in stability of OPB // *J. Biochem. (Tokyo)*. 2013. Vol. 154, № 5. P. 465–473.
238. Petrenko D. et al. Molecular dynamics complemented by site-directed mutagenesis reveals significant difference between the interdomain salt bridge networks stabilizing oligopeptidases B from bacteria and protozoa in their active conformations // *J Biomol Struct Dyn.* 2019. Vol. 38. P. 1–19.
239. Mancuso G. et al. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens: 10 // *Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2021. Vol. 10, № 10. P. 1310.
240. Shamova O.V. et al. Minibactenecins ChBac7.N $\alpha$  and ChBac7. N $\beta$  - Antimicrobial Peptides from Leukocytes of the Goat *Capra hircus*.: 3 // *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8, № 3. P. 136–146.

241. Mulani M.S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review // *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10.
242. Jumper J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold: 7873 // *Nature*. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 596, № 7873. P. 583–589.