

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

На правах рукописи



ЛИХАРЕВА ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ УНИКАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ
ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ**

03.00.04 – БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2005

Работа выполнена в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель:

кандидат химических наук, старший научный сотрудник Михайлова Анна Григорьевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор Цетлин Виктор Ионович

доктор химических наук, старший научный сотрудник Еремеев Николай Леонидович

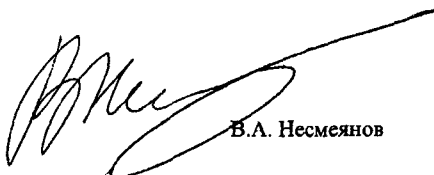
Ведущая организация: Институт молекулярной генетики РАН

Защита диссертации состоится "12" октября 2005 года в 10 часов на заседании Специализированного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу. 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан "12" сентября 2005 года.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
доктор химических наук,
профессор



Б.А. Несмеянов

2007-4

1345

234 8768

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важная роль в организме принадлежит высокоспецифическим протеиназам, которые имеют ограниченное число физиологических субстратов, гидролизующихся по определенной пептидной связи. Примерами подобных фермент-субстратных пар являются ренин и ангиотензин, химозин и казеин, плазменсин (аспартазная протеиназа из малярийного плазмодия) и гемоглобин, тромбин и фибриноген, энтеропептидаза и трипсиноген. В связи с развитием методов генной инженерии большое значение приобретает использование высокоспецифических протеиназ в качестве инструмента для точечного расщепления химерных белков по определенной пептидной последовательности (линкеру), отвечающей специфичности соответствующей протеиназы. Подобные высокоспецифические протеиназы мы назвали "белковыми рестриктазами".

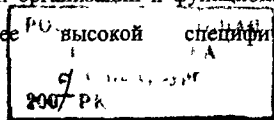
Высокоспецифические протеиназы характеризуются сложной структурной организацией и содержат помимо каталитического и первичного субстрат-связывающего центра, многочисленные домены с определенными функциями. Исключительно важным является изучение регуляции активности таких ферментов и понимание сложного механизма, по которому удаленные друг от друга домены согласованно определяют высокую эффективность и селективность катализа.

Энтеропептидаза (энтерокиназа) (КФ 3.4.21.9) была открыта в 1899 году в лаборатории И.П. Павлова, который особо подчеркнул ее значение для организма [Schepowalnikov, 1902, Pavlov, 1902].

Энтеропептидаза - высокоспецифическая протеиназа процессинга - находится в начале каскада реакций активации проферментов пищеварительного тракта, состоит из двух цепей - тяжелой и легкой, соединенных дисульфидной связью (рис. 1) Энтеропептидаза активирует трипсиноген, отделяя N-концевой активационный пептид, основной детерминантой которого является последовательность $-(Asp)_4Lys$ - специфическая для энтеропептидазного гидролиза. Нарушение нормального течения пищеварительного каскада может приводить к преждевременной активации проферментов в поджелудочной железе, что, в свою очередь, приводит к тяжелейшему заболеванию панкреатиту.

Высокая специфичность энтеропептидазы сделала ее важным инструментом современной биоинженерии.

Цель работы: заключалась в изучении структурной организации и функциональных особенностей энтеропептидазы, как основы ее высокой специфичности.



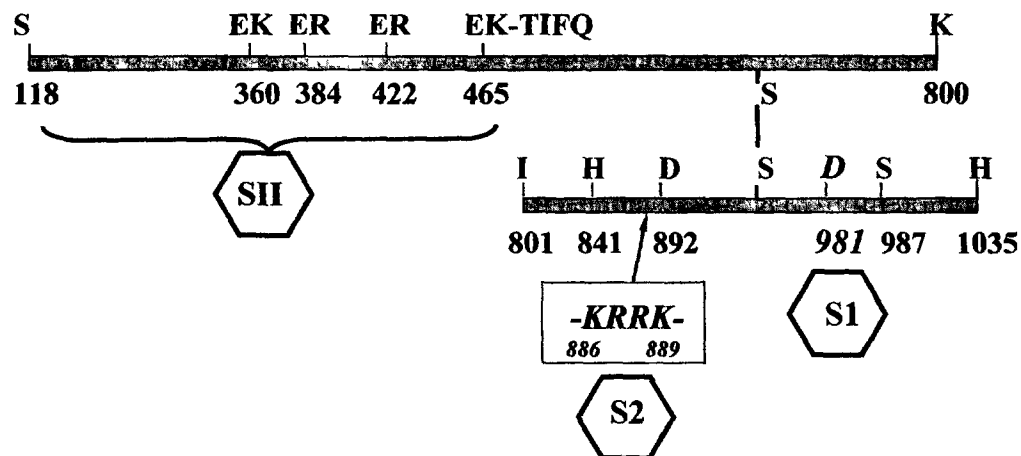


Рис. 1. Схематическая структура энтеропептидазы быка. S1 (Asp981) – первичный субстрат-связывающий центр; S2 (Lys889) – вторичный субстрат-связывающий центр; дополнительный вторичный субстрат-связывающий центр (названный нами SII), расположенный на участке 118-465 тяжелой цепи энтеропептидазы.

В ходе выполнения работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучение неспецифического энтеропептидазного гидролиза на примере ряда синтетических модельных пептидов, содержащих Lys/Arg в положении P1 и менее четырех остатков Asp/Glu в положениях P2-P5.
2. Изучение специфичности энтеропептидазы в сравнении с трипсином.
3. Исследование согласованности и взаимодействия трех субстрат-связывающих центров в ферментативном катализе.
4. Определение лимитирующей стадии гидролиза синтетических субстратов энтеропептидазой.
5. Исследование влияния ионов кальция на гидролиз синтетических субстратов полноразмерной и укороченными формами энтеропептидазы.
6. Выяснение возможной физиологической роли кальций-зависимого автолиза энтеропептидазы.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые проведено систематическое исследование субстратов с укороченным линкером – содержащих в положениях P2-P5 1-3 остатка глутаминовой или аспарагиновой кислоты вместо 4-х у типичного энтеропептидазного субстрата.

Продемонстрировано, что в процессе функционирования энтеропептидаза проявляет строгую иерархию субстрат-связывающих центров. Установлено, что энтеропептидазный гидролиз высокоэффективных субстратов происходит с лимитирующей стадией деацилирования ($k_2 > k_3$). Изучено влияние кальция на гидролиз пептидных субстратов с полной (-D₄K-) и укороченной (-DK- и -EEK-) последовательностью природной энтеропептидазой быка (118-1035), автолизованной энтеропептидазой (466-1035) и легкой цепью этого фермента (784-1035). Результаты демонстрируют возможность регуляции с помощью ионов кальция нежелательного побочного гидролиза при использовании энтеропептидазы (полноразмерного природного фермента) для процессинга химерных белков.

Обнаруженные свойства и особенности “неспецифического” энтеропептидазного гидролиза дают возможность использовать энтеропептидазу в структурных исследованиях для фрагментирования природных белков. При этом, в отличие от трипсинового гидролиза, ведущего к интенсивной деградации молекулы белка, использование энтеропептидазы приведет к крупным пептидным фрагментам, и, более того, как раз после тех остатков Lys или Arg, где трипсиновый гидролиз менее благоприятен из-за наличия отрицательно заряженных аминокислотных остатков в P2-P5-положениях.

Апробация работы и публикации. Основные материалы диссертационной работы были представлены на школе-конференции “Горизонты физико-химической биологии” (Пушино-на-Оке, Россия, 2000), XIV зимней международной молодежной научной школе “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, Россия, 2002), V Симпозиуме “Химия протеолитических ферментов” (Москва, Россия, 2002), Всероссийской конференции “Проблемы медицинской энзимологии” (Москва, Россия, 2002), Международной конференции “Biocatalysis - 2002: fundamentals & applications” (Москва, Россия, 2002), 27 Европейском Пептидном Симпозиуме (Сорренто, Италия, 2002), VI и VII чтениях, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва – Пушино-на-Оке, Россия, 2002, 2004), Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Москва, Россия, 2003), XII Международной конференции и дискуссионном научном клубе “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” (Ялта-Гурзуф, Крым, Украина, 2004), 30 Конгресс FEBS – 9 Конференция IUBMB (Будапешт, Венгрия, 2005).

По материалам диссертации опубликовано 18 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах, состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 171 наименований. Диссертация содержит 19 рисунков и 8 таблиц

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 99-04-48362, № 02-04-48553; № 03-04-06472-мас.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

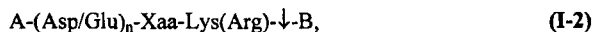
1. СТРУКТУРА И ИЕРАРХИЯ СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ

Первичная и вторичная специфичность энтеропептидазы в сравнении с трипсином

Для анализа первичной и вторичной специфичности энтеропептидазы проведено исследование гидролиза нескольких серий синтетических модельных субстратов, которые можно условно разделить на две группы:



где А и В – защитные группы или различные аминокислотные остатки; n = 1-4;



где А и В – защитные группы или различные аминокислотные остатки; Хаа ≠ Asp, Glu; n = 0-3.

Кинетические константы гидролиза синтетических субстратов энтеропептидазой и трипсином получены с помощью ВЭЖХ-метода, а также параллельно спектрофотометрическим методом для субстратов, содержащих остаток $F(NO_2)^1$ (рис. 2). Использование субстратов, содержащих $F(NO_2)$, для спектрофотометрического определения активности энтеропептидазы предложено впервые.

Показано, что энтеропептидаза обладает способностью с достаточно высокими скоростями гидролизовать субстраты по связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина или аргинина, если в положениях P2-P5 субстрата находится менее четырех отрицательно заряженных аминокислотных остатков (табл. 1)

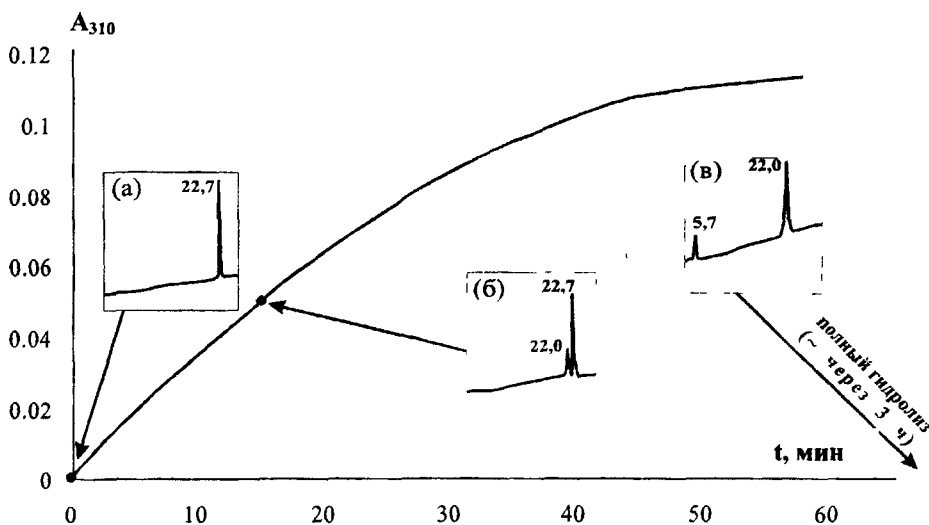


Рис. 2. Кривая гидролиза субстрата $G_5DKF(NO_2)G$ энтеропептидазой при pH 8,0; $37^\circ C$. $[S] = 3,3 \cdot 10^{-4} M$, $[E] = 13 \text{ нМ}$ Во врезках приведены результаты ВЭЖХ гидролиза субстрата $G_5DKF(NO_2)G$ энтеропептидазой (а) в начальный момент времени ($t = 0$); (б) через 15 мин инкубации; (в) через ~ 3 ч инкубации. Колонка Luna C18 ($2 \times 250 \text{ мм}$); градиент ацетонитрила 0-60% в 0,1-ной TFA; скорость элюции 0,3 мл/мин. Во врезках указано время выхода пика (мин).

Первичная специфичность

Исследование первичной специфичности энтеропептидазы проводили на примере гидролиза двух пар Lys- и Arg-пептидов типичных субстратов энтеропептидазы (2 и 3),

¹ Список сокращений: $F(NO_2)$ – остаток *n*-нитро-*L*-фенилаланина; GD_4K-Nfa - β -нафтиламид глицил-тетра-*L*-аспартил-*L*-лизина, *Z*-Lys-S-Bzl - тиобензиловый эфир α -*N*-бензоилуксикарбонил-*L*-лизина.

содержащих четыре остатка Asp в P2-P5 положениях ($n = 4$) и субстратов 10 и 11, для которых $n = 2$ (табл. 1). Для двух последних пептидов не обнаружено какого-либо различия в эффективности энтеропептидазного гидролиза Lys- или Arg-содержащих субстратов (табл. 1). Однако в случае полноразмерных субстратов замена остатка Lys на Arg в P1-положении приводит к двукратному повышению эффективности энтеропептидазного гидролиза. В случае же трипсина эффективность гидролиза аргинин-содержащего субстрата 3 на порядок превышает эффективность гидролиза лизинового субстрата 2, что полностью соответствует литературным данным.

Таким образом, первичная специфичность энтеропептидазы сходна с первичной специфичностью трипсина, однако предпочтение остатка Arg над Lys в положении P1 значительно менее выражено.

Таблица 1. Константы гидролиза ряда субстратов полноразмерной энтеропептидазой быка (ЭП 118-1035) и трипсином (Тр) при pH 8,0; 37°C

№	субстрат	K _m , mM		k _{cat} , мин ⁻¹		k _{cat} /K _m , мМ ⁻¹ мин ⁻¹	
		ЭП	Тр	ЭП	Тр	ЭП	Тр
1	GD ₄ K-F(NO ₂)G*	0,160	10,0	1070	50	6700	5,0
2	APFD ₄ K-IVGG*	35,3	-	1420	-	4020	42
3	APFD ₄ R-IVGG*	14,7	-	1205,5	-	8210	310
4	DR-VYIHPF	3,3	-	24,0	-	7,3	-
5	G ₅ DK-F(NO ₂)G*	0,437	1,95	1040	47,2	2380	24,2
6	LTAE EK-A	4,2	8,9	29,4	74,2	7,0	8,4
7	MLTAE EK-A	-	-	-	-	7,0	-
8	MLTAE EK-AA	4,0	1,7	1510	2900	378	1700
9	LTAE EK-AAV	-	-	-	-	400	-
10	WDDK-G	1,6	-	32,6	-	19,9	-
11	WDDR-G	2,1	-	40,6	-	19,5	-
12	VLSAADK-GNVK-AAWG	1,726	-	524	-	303,6	20000
13	APFD ₃ GK-IVGG*	0,3031		957,85		31,6	150
14	LEEELKP	Не гидролизуются					
15	Ac-LEEELKPLEE						
16	LWMR-FA	-	-	-	-	14	200000
17	TSK-Y		-		-	нет гидролиза	140

*- 50 mM Ca²⁺

Вторичная специфичность

С целью изучения вторичной специфичности энтеропептидазы проводили гидролиз синтетических субстратов, соответствующих формулам (I-1 и I-2) (табл. 1). Были рассмотрены как крайние случаи ($n = 4$ и $n = 0$), так и промежуточный случай ($n < 4$). Для оценки профиля субстратной специфичности энтеропептидазы по сравнению с трипсином, обладающим широкой вторичной специфичностью, введена величина селективности гидролиза каждого субстрата (ЭП /Тр). отношение значений k_{cat}/K_m энтеропептидазного и трипсинового гидролиза (рис. 3).

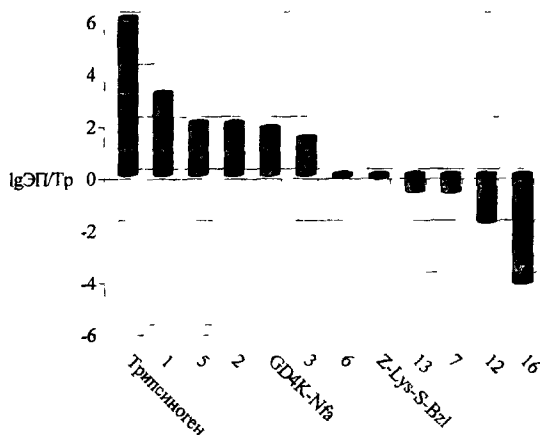


Рис. 3. Селективность гидролиза некоторых субстратов типа A-(Asp/Glu)_n-Lys(Arg)-↓-B энтеропептидазой (ЭП) и трипсином (Тр): отношение значений k_{cat}/K_m энтеропептидазного и трипсинового гидролиза каждого субстрата. Нумерация субстратов как в табл. 1

В результате проведенного исследования показано, что энтеропептидаза, подобно другим сериновым протеиназам, обладает протяженным вторичным центром, взаимодействующим с 6-7 аминокислотными остатками, расположенными по обе стороны от расщепляемой пептидной связи (P3/4-P3'). Однако эти вторичные взаимодействия проявляются лишь в случае субстратов с укороченным линкером, содержащих 1-2 остатка Asp/Glu, предшествующих Lys/Arg гидролизуемой связи; при этом вторичная специфичность энтеропептидазы отличается от вторичной специфичности трипсина (рис. 3). В случае типичных субстратов энтеропептидазы, содержащих четыре отрицательно заряженных остатка Asp/Glu в положениях P2-P5, превалирующим фактором эффективности гидролиза является электростатическое взаимодействие этих остатков с вторичным (S2) субстрат-связывающим центром (Lys889) легкой цепи энтеропептидазы.

Эффективность энтеропептидазы

Для оценки "работоспособности" первичного субстрат-связывающего центра S1 (Asp189) и каталитического центра природной полноразмерной энтеропептидазы (ЭП 118-

1035) использован субстрат Z-Lys-S-Bzl, взаимодействующий лишь с первичным субстрат-связывающим и каталитическим центром фермента. Получены значения кинетических констант гидролиза Z-Lys-S-Bzl при pH 8,0 и 25°C для полноразмерной энтеропептидазы (ЭП 118-1035), легкой цепи фермента с С-концевым фрагментом 784-800 тяжелой цепи (ЭП 784-1035). Показано, что эффективность гидролиза Z-Lys-S-Bzl легкой цепью энтеропептидазы в ≈ 4 раза меньше соответствующей величины для трипсина (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза Z-Lys-S-Bzl полноразмерной энтеропептидазой (ЭП 118-1035), легкой цепью фермента, содержащей С-концевой фрагмент 784-800 тяжелой цепи (ЭП 784-1035) и трипсином

Фермент	$K_m \cdot 10^5, M$	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_m, \text{мкМ}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$
ЭП 118-1035	5,96	6660	111,0
ЭП 784-1035	17,69	6694	37,84
Трипсин	5,60	8280	147,9

Для оценки "работоспособности" *первичного субстрат-связывающего центра S1* и каталитического центра природной полноразмерной энтеропептидазы (ЭП 118-1035) и ее укороченных вариантов по отношению к трипсину мы ввели величину эффективности гидролиза, приняв за 100% эту величину для трипсинового гидролиза Z-Lys-S-Bzl (рис. 4А, Б, В).

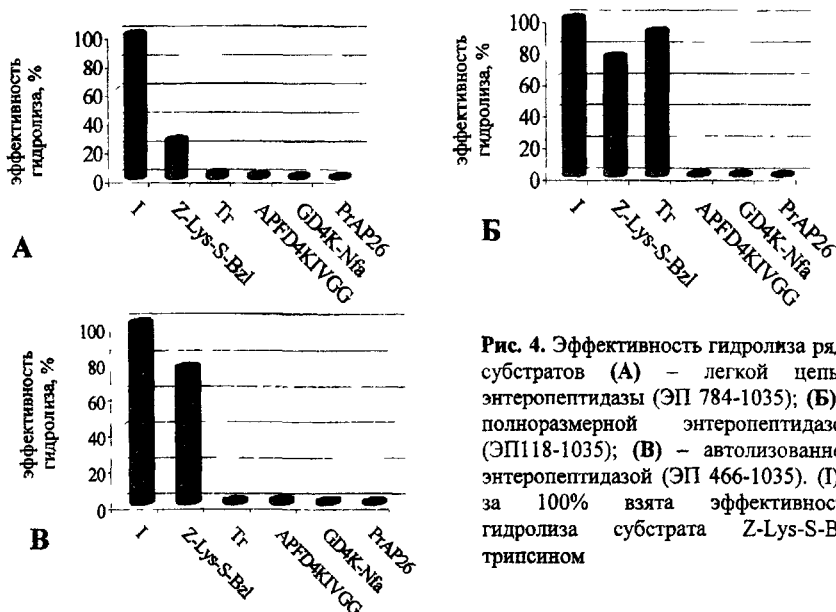


Рис. 4. Эффективность гидролиза ряда субстратов (А) – легкой цепью энтеропептидазы (ЭП 784-1035); (Б) – полноразмерной энтеропептидазой (ЭП 118-1035); (В) – автолизированной энтеропептидазой (ЭП 466-1035). (I) – за 100% взята эффективность гидролиза субстрата Z-Lys-S-Bzl трипсином

Введение остатка Lys889 в легкую цепь энтеропептидазы сделало этот трипсиноподобный фермент высокоспецифичным, однако при этом пострадала работоспособность первичного (S1) трипсинового центра. Добавление же к легкой цепи тяжелой в значительной степени компенсировало это неблагоприятное влияние, что заметно не только при гидролизе природного субстрата, трипсиногена, но также и высокоактивного тиобензилового эфира Z-Lys-SBzl, где наблюдается 3-х кратное повышение эффективности гидролиза полноразмерной энтеропептидазой (рис. 4Б). Эффективность гидролиза Z-Lys-S-Bzl препаратом автолизированной энтеропептидазы (ЭП 466-1035) по нашим данным не отличается от эффективности полноразмерного фермента (ЭП 118-1035 (рис. 4В). То есть в отличие от трипсиногена, на гидролизе Z-Lys-S-Bzl не сказывается отсутствие участка 118-465 тяжелой цепи.

Вторичный субстрат-связывающий центр S2 легкой цепи энтеропептидазы (Lys889) понижает, по меньшей мере, на четыре порядка активность первичного центра S1 (Asp981) и каталитического центра (триады His841, Ser981 и Asp892), таким образом, что энтеропептидаза не может гидролизовать полипептидную цепь по трипсиновому типу – после всех остатков аргинина и лизина (рис. 3). Лишь при “блокировке” S2-центра отрицательно заряженными остатками Asp/Glu в P2-P5-положениях субстрата активность энтеропептидазы по отношению к таким субстратам резко повышается. Максимальное предпочтение при этом для субстратов с четырьмя отрицательно заряженными остатками, минимальное требование (эффективность ≈ 10 -кратно меньше) – один остаток в P2-положении (рис. 3). Поэтому мы назвали S2-центр центром специфичности – именно он определяет селективность гидролиза полипептидной цепи. Однако максимальное повышение активности даже для субстратов с $n = 4$ – два порядка ($k_{cat}/K_m \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) – не компенсирует общее падение потенциальной эффективности каталитического и S1-центра (четыре порядка). Недостающие два порядка эффективности предоставляет дополнительный субстрат-связывающий центр SII тяжелой цепи фермента, однако, лишь для природного субстрата энтеропептидазы, трипсиногена. Этот центр обеспечивает высокую эффективность специфическому гидролизу природного субстрата (рис. 4). Только в случае своего физиологического субстрата, трипсиногена, энтеропептидаза реализует весь заложенный в ее молекулу запас эффективности гидролиза: значение k_{cat}/K_m для активации трипсиногена составляет $3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, что соответствует стандартной эффективности гидролиза сериновыми протеиназами их полипептидных субстратов. Следовательно, одной из составляющих энтеропептидазного катализа является строгая иерархия вторичных субстрат-связывающих центров: первый (S2) обеспечивает специфичность, второй (SII) – эффективность гидролиза.

Модификация трипсина и трипсиногена для обнаружения доменов субстрата, взаимодействующих с SII-центром энтеропептидазы

Ранее было установлено, что N-концевой участок тяжелой цепи энтеропептидазы содержит дополнительный субстрат-связывающий сайт (названный SII), обеспечивающий повышение эффективности гидролиза физиологичного субстрата энтеропептидазы, трипсиногена, на два порядка по сравнению с искусственными низко- и высокомолекулярными субстратами, содержащими последовательность $-(\text{Asp})_4\text{Lys}-$. Сделана попытка идентификации участков молекулы трипсиногена, участвующих в этом взаимодействии.

ДФФ-трипсин

На первом этапе была поставлена задача, оценить взаимодействует ли SII субстрат-связывающий центр тяжелой цепи энтеропептидазы с участками молекулы трипсиногена, одинаковыми как для самого трипсиногена, так и для трипсина.

Для этого по методу [Robinson et al., 1973] был получен полностью инактивированный диизопропилфторфосфатом (ДФФ) препарат трипсина и проверено влияние этого белка, сохраняющего третичную структуру активного трипсина, на процесс активации трипсиногена энтеропептидазой. Однако даже в присутствии достаточно высоких концентраций ДФФ-трипсина ($2 \cdot 10^{-6}$ – $2 \cdot 10^{-5}$ М) не обнаруживалось какого-либо заметного изменения скорости активации трипсиногена ($4 \cdot 10^{-6}$ М) энтеропептидазой, как в стандартных условиях определения энтеропептидазной активности (рН 5,0), так и при физиологическом значении рН (8,0). Полученные результаты указывают на то, что искомый фрагмент расположен в той части молекулы трипсиногена, которая отлична от молекулы трипсина. Такие участки достаточно точно определены: по данным рентгеноструктурных исследований третичная структура трипсиногена отличается от третичной структуры трипсина в области “активационного домена” - участков 142-152, 184-193 и 216-233 [Fehlhammer et al., 1977]. Поэтому можно предположить, что ответственным за связывание трипсиногена вторичным центром SII является участок “активационного домена” трипсиногена (142-152, 184-193, 216-233).

Ацетилированный трипсиноген

Однако дальнейшие эксперименты поставили под сомнение наше предположение о локализации участка трипсиногена, связывающегося с тяжелой цепью энтеропептидазы. С помощью ацетилирования уксусным ангидридом [Kay et al., 1971] получен препарат трипсиногена (рис. 5), ацетилированный по остатку Lys15, не способный к отделению активационного пептида VD_4K и образованию активного трипсина, как при действии

энтеропептидазы, так и при автоактивации. Ацетил-трипсиноген сохраняет нативную третичную структуру; полученный по такой же методике ацетил-трипсин полностью активен [Kay et al., 1971].

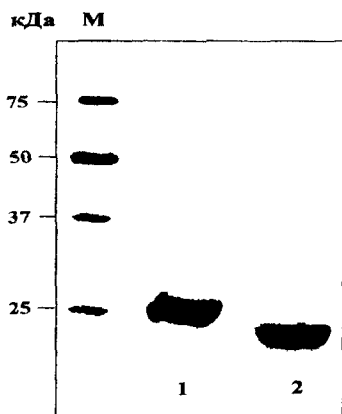


Рис. 5. SDS-электрофорез 1) ацетилированного трипсиногена быка; 2) природного трипсиногена быка. 12% ПААГ, восстанавливающие условия. Приведены молекулярные массы маркеров (М).

Установлено, что ацетил-трипсиноген, лишенный положительно заряженного остатка Р1 и не взаимодействующий с первичным трипсиновым субстрат-связывающим центром энтеропептидазы (Asp981), оказался неспособным к взаимодействию с ферментом, несмотря на присутствие тетрааспартильной последовательности и сохранение третичной структуры [Kay&Kassel, 1971] и, соответственно, фрагмента, отвечающего за связывание нативного трипсиногена с вторичным центром тяжелой цепи энтеропептидазы.

Таким образом, предполагаемая нами иерархия субстрат-связывающих центров энтеропептидазы оказалась более строгой, и взаимодействие обоих вторичных центров с субстратом возможно лишь при одновременном взаимодействии субстрата с первичным центром. Кроме того, по-видимому, для функционирования центра эффективности (SII), по крайней мере, при гидролизе соответствующего белка, необходимо правильное взаимодействие субстрата с центром специфичности (S2).

2. ОСОБЕННОСТИ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗНОГО КАТАЛИЗА

Лимитирующая стадия

До последнего времени на основании классических работ [Bender et al, 1969] было принято общее положение, что в случае гидролиза сложноэфирных субстратов лимитирующей стадией является деацилирование ($k_2 \gg k_3$), а гидролиз амидных и пептидных субстратов происходит с лимитирующей стадией ацилирования ($k_3 \gg k_2$). Однако в последнее время было окончательно опровергнуто представление о том, что лишь в

случае эфиров, в т.ч. тиобензиловых эфиров, $k_{cat} = k_3$, а $K_{m(каж)} = K_S k_3 / k_2$. Высокоэффективные амидные субстраты химотрипсина и трипсина также имеют, как правило, лимитирующую стадию деацилирования, или, по крайней мере, величины констант k_3 и k_2 сравнимы.

Для определения лимитирующей стадии энтеропептидазного гидролиза применяли метод регистрации первого продукта гидролиза в условиях насыщения фермента субстратом ($[S] \gg K_{m(каж)}$) в присутствии метанола как добавочного нуклеофила.

Однако первые полученные результаты по влиянию MeOH на гидролиз GD_4K-Nfa в 0,1 M Tris-HCl буфере, pH 8,0 оказались неоднозначными (рис. 6)

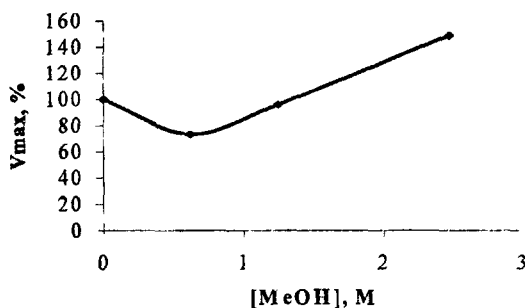


Рис. 6. Влияние MeOH на гидролиз GD_4K-Nfa энтеропептидазой. $[S] = 5,11$ mM; 0,1 M Tris-HCl буфер, pH 8,0.

При малых концентрациях метанола наблюдалось уменьшение скорости гидролиза субстрата. С увеличением концентрации нуклеофила скорость опять увеличивалась, и при $[MeOH] = 2M$ скорость гидролиза превышала контроль (без метанола.) По-видимому, метанол действует двояко: как нуклеофил, линейно увеличивает скорость гидролиза по схеме, соответствующей лимитирующей стадии деацилирования: $V_{max} = [E](k_3 + k_4[N])$. Одновременно добавление метанола приводит к инактивации энтеропептидазы (уменьшению $[E]$). При $[MeOH] < 1M$ процесс инактивации превалирует, однако при увеличении содержания этого нуклеофила начинает возрастать противоположный процесс, и при $[MeOH] \geq 1,5 M$ наблюдается ускорение

Чтобы доказать, что в присутствии метанола действительно происходит инактивация энтеропептидазы, изучено влияние метанола на энтеропептидазный гидролиз субстрата Z-Lys-S-Bzl, который так же, как все сложноэфирные субстраты, гидролизуются с лимитирующей стадией k_3

Для оценки только лишь степени инактивации фермента изучено влияние метанола при $[S] \ll K_m$. В этом случае скорость гидролиза $v_0 = [E][S]k_{cat}/K_{m(каж)} = [E][S]k_2/K_S$ и добавление нуклеофила не должно ее увеличивать. Действительно, оказалось, что при $[S] =$

6,67 мкМ ($[S] \ll K_m$) (рис. 7, кривая 1) в присутствии метанола происходит инактивация энтеропептидазы, возрастающая при увеличении концентрации MeOH.

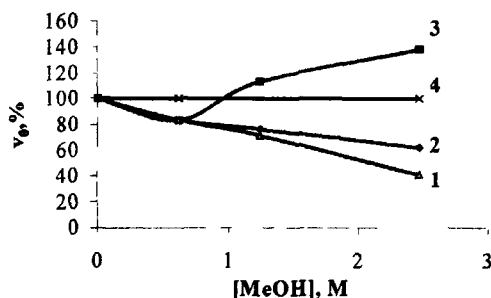


Рис. 7. Влияние MeOH на гидролиз Z-Lys-S-Bzl энтеропептидазой. $[S]$ = (1) - 6,67 мкМ; (2) - 0,667 мМ, (3) - 66,7 мкМ, (4) - 6,67 мкМ + 50 мМ CaCl_2 ; 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 8,0.

Эта инактивация настолько велика, что даже при $[S] = 0,667$ мМ ($[S] = K_m$) также при всех использованных концентрациях MeOH наблюдалось лишь уменьшение скорости гидролиза Z-Lys-S-Bzl (рис. 7, кривая 2) – противоположный эффект активации гидролиза нуклеофилом не может преодолеть этот отрицательный эффект и приводит лишь к меньшей степени уменьшения v_0 по сравнению с кривой 1. При $[S] = 66,7$ мМ ($[S] \gg K_m$) (рис. 7, кривая 3) для субстрата Z-Lys-S-Bzl получена точно такая же зависимость, как для GD4K-Nfa на рис. 4: уменьшение скорости при 0,5 М MeOH и увеличение скорости гидролиза при больших концентрациях метанола (1-2 М). Таким образом, суммарный наблюдаемый эффект действительно равен ускорению за счет действия нуклеофила, пропорциональному концентрации MeOH, минус инактивация при данной концентрации MeOH

Обычно гидролиз Z-Lys-S-Bzl проводят в 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 8,0, без ионов кальция. Однако, как будет показано ниже, 50 мМ CaCl_2 в инкубационной смеси не влияет на скорость гидролиза Z-Lys-S-Bzl при отсутствии метанола, и более того, увеличивает стабильность энтеропептидазы в присутствии метанола. При $[S] = 6,67$ мкМ ($[S] \ll K_m$) в присутствии 50 мМ CaCl_2 инактивации фермента метанолом не происходит, и скорость реакции не зависит от концентрации добавленного нуклеофила, как теоретически и должно происходить (рис. 7, кривая 4)

С учетом проведенных экспериментов, обнаруживших инактивацию энтеропептидазы метанолом и противодействие этому процессу ионов кальция, повторили исследование влияния MeOH на энтеропептидазный гидролиз субстрата GD4K-Nfa в 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 8,0, содержащем 50 мМ CaCl_2 при $[S] = 5$ мМ ($[S] \gg K_m$). Обнаружено увеличение скорости реакции, линейно зависящее от концентрации внесенного метанола (рис. 8, кривая 1).

При $[S] = 21,3 \text{ мкМ}$ ($[S] \ll K_m$) (рис. 8, кривая 2), так же, как в аналогичном случае гидролиза Z-Lys-S-Bzl (рис. 5, кривая 4) скорость реакции не зависит от добавления нуклеофила.

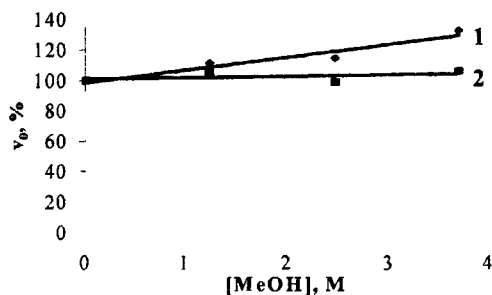


Рис. 8. Влияние MeOH на гидролиз GD₄K-Nfa энтеропептидазой. $[S] =$ (1) - 5 мМ; (2) - 21,3 мкМ; 0,1 М Tris-HCl буфер, pH 8,0, содержащий 50 мМ CaCl₂.

Таким образом, отсюда следует, что гидролиз типичного субстрата энтеропептидазы GD₄K-Nfa происходит с лимитирующей стадией деацилирования

Для подтверждения полученных данных нами был использован другой нуклеофил - 0,01 М - 0,43 М Tris-HCl буфер, pH 8,0 [Hinberg&Laidler, 1972]. При этом в интервале 0,05-0,43 М Tris-HCl pH сохраняется и наблюдается ускорение максимальной скорости гидролиза субстрата, пропорциональное молярности Tris-HCl буфера (рис. 9, кривая 1)

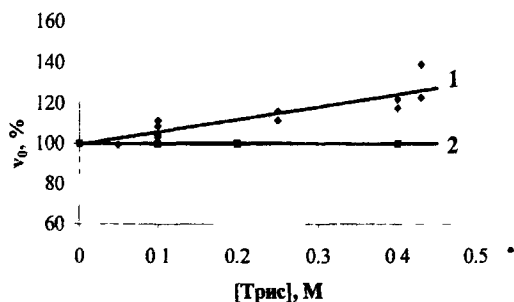


Рис. 9. Влияние концентрации Tris-HCl буфера, pH 8,0, на гидролиз GD₄K-Nfa и пептида 1-15 α-цепи Hb VL₅AA₁DKGNVKA₁₅WG энтеропептидазой. $[GD_4K-Nfa] = 5 \text{ мМ}$ - (1); $[Hb \text{ 1-15}] = 10,8 \text{ мМ}$ - (2)

Использованный подход в определении стадийности катализа проверен на низкоэффективном субстрате энтеропептидазы с укороченным линкером VL₅AA₁DKGNVKA₁₅WG (субстрат 12). С помощью ВЭЖХ регистрировали первый продукт гидролиза GNVKA₁₅WG. При $[S] = 10,8 \text{ мМ}$ ($> K_m$) скорость ($\approx V_{max}$) гидролиза этого пептидного субстрата в 0,1-0,4 М Tris-HCl буферах, pH 8,0, оставалась постоянной независимо от молярности буфера, служившего дополнительным нуклеофилом (рис. 9, кривая 2).

Эффективность гидролиза этого пептида энтеропептидазой ($k_{cat}/K_{m(каж)}$) составляло менее 10% от эффективности гидролиза типичных субстратов энтеропептидазы $GD_4K-F(NO_2)G$ (субстрат 1) и GD_4K-Nfa .

Таким образом, в результате серий экспериментов с использованием в качестве нуклеофилов метанола и Tris-HCl буфера показано, что лимитирующей стадией гидролиза амидных (и пептидных) высокоэффективных субстратов энтеропептидазы, содержащих последовательность $-(Asp)_4Lys-$, является деацилирование: $k_2 > k_3$.

Эффект ионов кальция

Энтеропептидаза является в определенном смысле трипсиновым ферментом, для которого, как известно, ионы кальция играют важную регуляторную роль. Поэтому представлялось интересным изучить влияние ионов кальция на энтеропептидазный катализ. Кроме того существуют противоречивые литературные данные о влиянии ионов кальция на гидролиз различных субстратов энтеропептидазой. Проведено систематическое изучение влияния ионов кальция на гидролиз ряда синтетических субстратов: GD_4K-Nfa , субстратов 1, 5, 6 и 9 природной энтеропептидазой быка (ЭП 118-1035), укороченной в результате автолиза формой фермента (ЭП 466-1035), а также рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы, содержащей семнадцать С-концевых аминокислотных остатков тяжелой цепи (ЭП 784-800) (табл. 3).

Автолизованная форма энтеропептидазы (ЭП 466-1035) была получена обработкой полноразмерного фермента 2 мМ EGTA в 10 мМ HEPES-KOH буфере, pH 6,5, с последующим многократным диализом в Centricon-100 в том же буфере без EGTA для удаления хелатора и доведением значения pH до 8,0 (рис. 10). Полученные результаты (табл. 3) на примере двух субстратов энтеропептидазы, содержащих четыре остатка аспарагиновой кислоты в положениях P2-P5: GD_4K-Nfa и $GD_4K-F(NO_2)G$ (субстрат 1) свидетельствуют, что ион кальция в концентрациях, превышающих 10 мМ, является активатором их гидролиза (примерно в 3 раза).

Однако Ca^{2+} выступает активатором лишь в случае природной, полноразмерной энтеропептидазы быка, содержащей последовательность 118-800, соответствующую тяжелой цепи зрелого фермента. В случае же двух других, укороченных вариантов энтеропептидазы, содержащих лишь С-концевую половину тяжелой цепи (ЭП 466-1035), или же только семнадцать С-концевых аминокислотных остатков тяжелой цепи (ЭП 784-1035), эффект активации не наблюдается. Субстрат 5, содержащий замену трех остатков аспарагиновой кислоты в P3-P5 на остатки глицина, гидролизровался всеми тремя вариантами энтеропептидазы, включая природный полноразмерный фермент, практически с одинаковой эффективностью, как в присутствии, так и в отсутствие ионов кальция.

Таблица 3. Эффективность гидролиза субстратов (k_{cat}/K_m ; $\text{мкМ}^{-1}\cdot\text{мин}^{-1}$) природной энтеропептидазой (ЭП 117-1035), автолизированной энтеропептидазой (ЭП 466-1035) и легкой цепью энтеропептидазы (ЭП 784-1035) в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} ; pH 8,0; 37°C.

Субстрат	ЭП 118-1035						ЭП 466-1035		ЭП 784-1035			
	[Ca^{2+}]						[Ca^{2+}]		[Ca^{2+}]			
	50 мМ			0			50 мМ	0	50 мМ		0	
	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ ·мин ⁻¹
GD ₄ K-Nfa			5,570			1,830	1,660	1,704			1,530	2,040
	1000	0,200	5,000			1,660						
	1698	0,280	6,064*	1290	0,525	2,457**			1494	0,600	2,490***	
	1446	0,220	6,573****									
	1782	0,270	6,600****									
GD ₄ K-F(NO ₂)G (1)	1070	0,160	5,640			1,425	2,290	1,590			1,130	2,270
			6,700								1,280	1,585
G ₅ DK-F(NO ₂)G (5)	1040	0,437	1,870			1,980	1,230	1,380			1,410	1,600
			2,380									2,090
LTAEEK-A (6)			$4,930 \cdot 10^{-3}$	4,20	29,40	$7,00 \cdot 10^{-3}$ [15] $6,48 \cdot 10^{-3}$						
LTAEEK-AAV (9)			0,293			0,400 [15]						
			0,332			0,452						

* 10 мМ Ca^{2+} ; pH 8,4; энтеропептидаза человека [Grant & Hermon-Taylor, 1979].

** 0,1 мМ Ca^{2+} ; pH 8,4; энтеропептидаза человека [Grant & Hermon-Taylor, 1979].

*** 10 мМ Ca^{2+} ; pH 8,4 [Lu et al., 1997].

**** Полноразмерная энтеропептидаза быка (природная); 10 мМ Ca^{2+} ; pH 8,4 [Lu et al., 1997]

***** Полноразмерная энтеропептидаза быка (рекомбинантная) 10 мМ Ca^{2+} ; pH 8,4 [Lu et al., 1997].

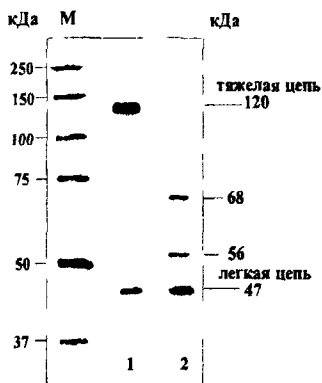


Рис. 10. SDS-электрофорез 1) полноразмерной энтеропептидазы 118-1035; 2) автолизированной энтеропептидазы 466-1035. 10% ПААГ, восстанавливающие условия. Приведены молекулярные массы маркеров (М)

И, наконец, в случае энтеропептидазного гидролиза субстратов 6 и 9, содержащих два остатка аспарагиновой кислоты, наблюдалось 24-30%-ное ингибирование гидролиза 50 мМ CaCl_2 , как и для субстрата 5.

Таким образом, для субстрата общего вида $-(\text{Asp})_n\text{Lys}-$ при $n = 0$ как в присутствии, так и в отсутствие Ca^{2+} , и $n = 4$ в присутствии 50 мМ Ca^{2+} обнаружена одинаковая трехкратная разница в эффективности ЭП 118-1035 и ЭП 784-1035. В случае же $n = 1-2$ и всех трех вариантов энтеропептидазы (ЭП 118-1035, ЭП 466-1035 и ЭП 784-1035), а также $n = 4$ и двух укороченных вариантов фермента (ЭП 466-1035 и ЭП 784-1035) наблюдается одинаковый характер влияния ионов кальция: 20-30%-ное ингибирование 50 мМ CaCl_2 .

3. ПЕПТИДНЫЕ СУБСТРАТЫ КАК МОДЕЛИ ПРИРОДНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ. КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫЙ АВТОЛИЗ ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ.

Благодаря высокой специфичности энтеропептидаза широко применяется в генноинженерных исследованиях для процессинга химерных белков, содержащих линкер $-(\text{Asp})_4\text{Lys}-$ между белком-носителем и целевым белком. Однако, как было показано выше, способность энтеропептидазы гидролизовать субстраты, содержащие последовательность $-(\text{Asp/Glu})_n\text{Lys(Arg)}-$, где $n = 1-3$ может привести к нежелательной деградации химерного белка. Несмотря на то, что эффективность "неспецифического гидролиза" не превышает, как мы здесь показали, 10% от эффективности гидролиза специфической последовательности $-(\text{Asp})_4\text{Lys}-$, при длительной инкубации химерного белка с достаточно высокими концентрациями энтеропептидазы такой нежелательный гидролиз был в некоторых случаях обнаружен. Результаты проведенных нами экспериментов позволяют в случае природной двухцепочечной энтеропептидазы регулировать этот нежелательный гидролиз ионы кальция

обладают свойством 3-кратной активации гидролиза связи $-(\text{Asp})_4\text{Lys}-$, однако вызывают 20-30%-ное ингибирование нежелательного гидролиза связей $-(\text{Asp}/\text{Glu})_n-\text{Lys}(\text{Arg})-$, где $n = 1-3$.

Напротив, при широко распространенном в настоящее время использовании рекомбинантной легкой цепи энтеропептидазы для процессинга химерных белков, содержащих энтеропептидазный линкер $-(\text{Asp})_4\text{Lys}-$ между белком-носителем и целевым продуктом, добавление Ca^{2+} не требуется – он ингибирует гидролиз.

С другой стороны, обнаруженные нами свойства и особенности такого “неспецифического” гидролиза дают возможность использовать энтеропептидазу в структурных исследованиях для фрагментирования природных белков. При этом, в отличие от трипсинового гидролиза, ведущего к интенсивной деградации молекулы белка, использование энтеропептидазы приведет к крупным пептидным фрагментам, и, более того, как раз после тех остатков Lys или Arg, где трипсиновый гидролиз менее благоприятен из-за наличия отрицательно заряженных аминокислотных остатков в P2-P5-положениях

Потенциальные и экспериментально обнаруженные центры автолиза энтеропептидазы

Исследованные субстраты – пептиды (4-15), были выбраны по структурным соображениям в качестве модели процесса автолиза энтеропептидазы. Количество и расположение потенциальных центров автолиза тяжелой цепи энтеропептидазы (типа, представленного формулами I-1 и I-2; в положении P2-P5 содержится хотя бы один остаток Asp/Glu) определены по ее первичной структуре. Показано, что потенциальные центры автолиза сконцентрированы, в основном, на N-конце тяжелой цепи фермента. Кроме того, распределение потенциальных сайтов автолиза координирует с известным из литературы подразделением тяжелой цепи на домены, гомологичные различным белкам [Kitamoto et al., 1984]

Первый фрагмент (118-243) содержит семь таких центров, согласующихся с общими формулами (I-1 и I-2); лишь два из них содержат, однако, остаток Glu или Asp в ключевом для возможного автолиза положении P2. Кроме того, фрагмент 199-240 является богатым цистеином доменом, гомологичным различным белкам системы комплемента и рецепторам липопротеинов низкой плотности. Семь цистеиновых остатков расположены в этой области. Безусловно, концентрация остатков цистеина на каком-либо небольшом участке повышает вероятность существования S-S-связей и образования компактной структуры, что, в общем, должно препятствовать автолизу на этом участке молекулы.

Вторая область – это фрагмент 359-465, гомологичный мембранно-связанной металлопротеазе меприну. Из шести потенциальных центров автолиза четыре имеют в P2-положении остаток Glu. Именно в этих четырех центрах экспериментально обнаружен

кальций-зависимый автолиз: -, -NNYEK360-INCN-, -NEWER384-TQGS- -GRRER422-VGLL- и -QNMEK465-TIFQ- [Mikhailova, Rumsh, 2000] Эта средняя часть тяжелой цепи, наиболее подверженная автолизу, содержит всего три остатка цистеина

Полученные данные позволяют также несколько уточнить расположение дисульфидных связей в молекуле энтеропептидазы. По аналогии с другими сериновыми ферментами, предполагается локализация четырех внутренних дисульфидных связей легкой цепи: Cys826-Cys842, Cys926-Cys993, Cys957-Cys972, Cys983-Cys1011, а также междеиничной дисульфидной связи Cys788-Cys912 [Lu et al, 1999]. О локализации остальных, внутренних дисульфидных связей тяжелой цепи, ничего не известно, однако разделение с помощью гель-фильтрации продукта автолиза (466-1035) и нативной молекулы энтеропептидазы (118-1035) свидетельствует, по крайней мере, об отсутствии дисульфидной связи между N- и C-концевыми половинами тяжелой цепи фермента.

C-концевая половина тяжелой цепи (492-800) содержит всего два потенциальных центра гидролиза низкой эффективности (не содержащих остатков Asp/Glu в положении P2), а легкая цепь (801-1035) - шесть потенциальных центра гидролиза, из которых только один содержит остаток Glu в P2-положении. В этих областях молекулы энтеропептидазы автолиз не обнаружен.

Очевидно, что гидролиз в таких местах белковой молекулы может происходить лишь в случае доступности их активному центру энтеропептидазы. Часто химерные белки, даже содержащие полную линкерную последовательность, не гидролизуются этим ферментом или же гидролизуются очень медленно. Доступность соответствующих сайтов для гидролиза определяется укладкой белковой глобулы. Вероятно, обнаруженный автолиз после остатков Lys360 и 465, а также Arg384 и 422 становится возможным из-за разрыхления белковой глобулы после удаления из нее ионов кальция.

Физиологическая роль кальций-зависимого автолиза трипсина и тяжелой цепи энтеропептидазы

В настоящей работе показано, что энтеропептидаза обладает свойством специфически (и в некоторых случаях даже эффективно) гидролизовать *in vitro* наряду со своим уникальным природным субстратом трипсиногеном некоторые биологически активные пептиды, а также, при определенных условиях, собственную тяжелую цепь.

Полученные в ходе проведения работы данные о разном профиле селективности энтеропептидазы и трипсина при гидролизе систематического ряда пептидов общей формулы (I-1) и (I-2) являются точным энзимологическим обоснованием возникновения в ходе эволюции позвоночных N-концевых активационных пептидов, содержащих последовательность -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys [Roach et al, 1997, Chen et al., 2003]

Действительно, такие изменения в структуре канонического активационного пептида, как замена остатка Lys на Arg, или того или иного остатка Asp на незаряженный аминокислотный остаток (особенно в P2-положении) неизменно приводят к повышению эффективности трипсинового гидролиза, что повышает вероятность автоактивации соответствующих трипсиногенов, и, в свою очередь, возможность преждевременной активации их в ацинарных клетках поджелудочной железы. Это неизбежно увеличивает риск возникновения панкреатита.

Изучение особенностей кальций-зависимого автолиза энтеропептидазы позволило провести аналогию этого процесса с автолизом трипсина. Схожесть процессов автолиза этих тесно взаимосвязанных ферментов в среде с пониженным содержанием Ca^{2+} позволяет предположить, что существует общий защитный механизм, регулирующий таким образом нежелательную преждевременную активацию трипсиногена в ацинарных клетках поджелудочной железы, приводящую к панкреатиту.

Выводы

1. Исследован гидролиз ряда серий синтетических модельных субстратов и показано, что энтеропептидаза обладает способностью гидролизовать субстраты по связям, образованным карбоксильными группами остатков лизина или аргинина, если в положениях P2-P5 субстрата находится менее четырех отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

2. Показано, что энтеропептидаза обладает прогнанным вторичным центром, взаимодействующим с 6-7 аминокислотными остатками, расположенными по обе стороны от расщепляемой пептидной связи (P3/4-P3').

3. Установлено, что уникальные свойства энтеропептидазы обусловлены существованием трех субстрат-связывающих центров. При этом один из вторичных центров (S2) обуславливает специфичность, а другой вторичный центр (SII) – эффективность энтеропептидазного гидролиза. Одной из важных составляющих энтеропептидазного катализа является строгая иерархия субстрат-связывающих центров: взаимодействие обоих вторичных центров с субстратом возможно лишь при одновременном взаимодействии субстрата с первичным центром.

4. Исследован гидролиз синтетических субстратов энтеропептидазы и показано, что полноразмерные субстраты ($n = 4$) гидролизуются энтеропептидазой с лимитирующей стадией деацилирования ($k_2 > k_3$).

5. Показано, что ионы кальция активируют гидролиз полноразмерной энтеропептидазой субстратов с $n = 4$, ингибируя, одновременно, гидролиз субстратов с $1 \leq n$.

< 4, что имеет важное значение для применения энтеропептидазы в процессинге химерных белков.

6. Высказано предположение о возможной физиологической роли кальций-зависимого автолиза энтеропептидазы как составной части общего защитного механизма от преждевременной активации трипсиногена, приводящей к панкреатиту

Основные материалы диссертации представлены в следующих работах:

- 1 Likhareva V.V., Mikhailova A.G., Vaskovsky B.V., Garanin S.K., Rumsh L.D. Synthetic model and bioactive peptides as potential substrates for enteropeptidase. Letters in peptide science, 2002, v. 9, p. 71-76;
- 2 Лихарева В.В., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Гидролиз энтеропептидазой неспецифических (модельных) пептидных последовательностей и возможная физиологическая роль этого явления. Вопросы мед химии, 2002, т. 48 (6), с. 561-569;
- 3 Лихарева В.В., Васьковский Б.В., Шепель Н.Э., Гаранин С.К., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Новые субстраты энтеропептидазы I Биологически активные гепта-нонапептиды. Биоорг. химия, 2003, т. 29 (2), с. 129-134;
- 4 Likhareva V.V., Mikhailova A.G., Vaskovsky B.V., Garanin S.K., Rumsh L.D. Bioactive peptides as potential substrates for enteropeptidase. Peptides 2002: Proceeding of the twenty-seventh European Peptide Symposium. Sorrento, Italy, 2002, p. 796;
- 5 Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Васьковский Б.В., Гаранин С.К., Оноприенко Л.В., Прудченко И.А., Чикин Л.Д., Румш Л.Д. Исследование вторичной специфичности энтеропептидазы в сравнении с трипсином. Биохимия, 2004, т. 69, с. 1118-1128;
- 6 Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Прудченко И.А., Румш Л.Д. Эффект ионов кальция на энтеропептидазный катализ. Биохимия, 2005, т. 70 (10), с. 1367-1375;
- 7 Лихарева В.В., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Высокоспецифические ферменты как продукт эволюции: от трипсина к энтеропептидазе. Тезисы докладов школы-конференции "Горизонты физико-химической биологии". Пушкино-на-Оке, 2000, т. 2, с. 46;
- 8 Лихарева В.В., Васьковский Б.В., Гаранин С.К., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Исследование нетипичных субстратов энтеропептидазы Тезисы докладов VI чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова. Москва, 2002, с. 18;
- 9 Mikhailova A.G., Likhareva V.V., Rumsh L.D. Means of realization of absolute specificity and efficiency of proteases International conference "Biocatalysis – 2002: fundamentals & applications". Russia, Moscow, 2002, Abstracts, - p. 27,

10. Лихарева В.В., Шепель Н.Э. Новые субстраты энтеропептидазы. Тезисы докладов XIV зимней международной молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 2002, с. 37;
11. Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Румш Л.Д. Пути реализации абсолютной специфичности и эффективности протеиназ. Труды Всероссийской конференции "Проблемы медицинской энзимологии" "Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия" Международный симпозиум" Москва, 2002, с. 161,
12. Likhareva V.V., Mikhailova A.G., Rumsh L.D., Garanin S.K., Vaskovsky B.V. Bioactive peptides as potential substrates for enteropeptidase. 27th European peptide symposium. Sorrento, Italy, 2002, Abstracts, - p. 167,
13. Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Румш Л.Д. Пути реализации абсолютной специфичности и эффективности протеиназ. V симпозиум "Химия протеолитических ферментов", Москва, 2002, с. 16
14. Лихарева В.В., Васильковский Б.В., Гаранин С.К., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Исследование нетипичных субстратов энтеропептидазы V симпозиум "Химия протеолитических ферментов", Москва, 2002, с. 65;
15. Лихарева В.В., Михайлова А.Г., Васильковский Б.В., Гаранин С.К., Румш Л.Д. Изучение субстратной специфичности энтеропептидазы на примере синтетических модельных пептидов. Тезисы докладов Российского симпозиума по химии и биологии пептидов. Москва, 2003, с. 33;
16. Лихарева В.В., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Поиск специфических ингибиторов энтеропептидазы путем химической модификации трипсина и трипсиногена Тезисы докладов VII чтений, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова Москва, 2004, с. 77;
17. Лихарева В.В., Михайлова А.Г., Румш Л.Д. Изучение специфичности энтеропептидазы на примере химически модифицированных трипсина и трипсиногена Тезисы докладов XII Международной конференции и дискуссионного научного клуба "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии" Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2004, с. 74;
18. A.G. Mikhailova, V.V. Likhareva, L.D. Rumsh, N. Teich Regulation of enteropeptidase activity by calcium ions. 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference Budapest, Hungary, 2005, Abstracts, - p. 171.

Принято к исполнению 08/09/2005
Исполнено 09/09/2005

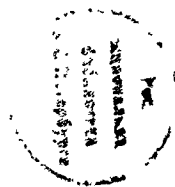
Заказ № 1029
Тираж: 75 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(095) 975-78-56
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2007-4

1345



27 ОЯ 2005