

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

СЕМАШКО Татьяна Александровна

НОВЫЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ СУБСТРАТЫ ЦИСТЕИНОВЫХ ПЕПТИДАЗ
СЕМЕЙСТВА ПАПАИНА

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук



Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории химии белка кафедры химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в отделе белков растений Института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: доктор химических наук, профессор

Филиппова Ирина Юрьевна

кандидат биологических наук

Элпидина Елена Николаевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук

Ротанова Татьяна Васильевна

доктор биологических наук, профессор

Валуева Татьяна Александровна

Ведущая организация: Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН

Защита состоится 14 июня 2011 года в 16.00 часов на заседании Совета Д 501.001.41 по химическим наукам при московском университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, строение 40, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ.

Автореферат разослан мая 2011 года.

Учёный секретарь Совета,
кандидат химических наук



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Пептидгидролазы семейства С1 (папаина) относятся к клану цистеиновых пептидаз, содержащих в активном центре остаток цистеина. Они выявлены в различных группах организмов. Родоначальником этого семейства является растительная пептидаза папаин. Этот фермент, а также близкие к нему цистеиновые пептидазы из тропических фруктов бромелаин и фицин имеют важное практическое значение и используются в пищевой промышленности, фармакологии, научных исследованиях. Большую группу цистеиновых пептидаз семейства С1 составляют цистеиновые лизосомальные катепсины млекопитающих и человека. Цистеиновые катепсины не только осуществляют неселективную лизосомальную деградацию белков, но и принимают участие в более специфических процессах как в нормальных физиологических условиях (активации проферментов, созревании гормонов, презентации антигенов и т.д.), так и при развитии различных патологий (остеопорозе, ревматоидном артрите, атеросклерозе, метастазировании и инвазии раковых опухолей и т.д.). Большой интерес представляют также цистеиновые пептидазы некоторых групп насекомых, у которых катепсин-подобные ферменты выполняют пищеварительную функцию. Сведения об организации и эволюции пищеварительной системы насекомых важны как с фундаментальной точки зрения, так и для разработки экологически безопасных методов борьбы с насекомыми-вредителями.

Идентификация и характеристика цистеиновых пептидаз семейства С1 (папаина) в природном материале требует их селективной детекции. Однако синтетические субстраты, обычно используемые для определения активности этой группы ферментов, больше удовлетворяют специфичности сериновых трипсиноподобных пептидаз. Это снижает как селективность, так и чувствительность корректного определения активности пептидаз семейства папаина. В связи с этим весьма актуальной задачей является разработка селективных и эффективных субстратов для тестирования активности ферментов этого семейства, как в гомогенном состоянии, так и в составе сложных ферментных смесей. Примером таких многокомпонентных систем служит комплекс пищеварительных пептидаз ряда насекомых-вредителей зерновых запасов. Наиболее изученным представителем этой группы насекомых является большой мучной хрущак *Tenebrio molitor*, пищеварительный комплекс которого содержит цистеиновые и сериновые пептидазы. Ключевую роль в протеолизе пищевых белков играют цистеиновые пептидазы. Основными пищевыми белками *T. molitor* являются главные запасные белки семян пшеницы – глиадины, которые в значительных количествах присутствуют и в пищевом рационе человека. Однако употребление в пищу глиадинсодержащих продуктов может вызывать тяжелое аутоиммунное заболевание ЖКТ целиакию (диагностируемое у 2% населения). Отдельные пептиды глиадинов, вызывающие

аутоиммунный ответ у больных целиакией, устойчивы к действию пищеварительных ферментов человека и большинства известных пептидаз. Мы предположили, что способностью гидролизовать токсические пептиды глиадинов могут обладать главные пищеварительные цистеиновые пептидазы этого насекомого-вредителя. На сегодняшний день лекарств от целиакии нет. В связи с этим, одной из целей данной работы являлась идентификация и исследование субстратных свойств цистеиновых пептидаз из *T. molitor*, которые могут иметь весьма важное значение как потенциальные лекарственные средства в лечении целиакии.

Цели и задачи исследования. Основной целью работы являлся дизайн, синтез и применение новых селективных пептидных субстратов для идентификации и характеристики субстратной специфичности цистеиновых пептидаз семейства С1.

В работе решались следующие задачи: (1) дизайн и химико-энзиматический синтез селективных пептидных субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1; (2) определение кинетических параметров гидролиза субстратов цистеиновыми пептидазами различного происхождения; (3) анализ селективности субстратов; (4) использование субстратов для идентификации и характеристики цистеиновых пептидаз в составе сложных ферментных смесей на примере пищеварительного комплекса личинок большого мучного хрущака *T. molitor*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Проведен дизайн и химико-энзиматический синтез хромогенных и флуорогенных субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1. Показано, что полученные соединения являются эффективными и селективными субстратами пептидаз семейства С1 различного происхождения и могут использоваться для детекции активности цистеиновых пептидаз в сложных ферментных смесях. С использованием синтезированных флуорогенных субстратов предложена методика детекции активности цистеиновых пептидаз семейства С1 после нативного электрофореза в ПААГ.

С помощью синтезированных субстратов идентифицированы и охарактеризованы две пищеварительные цистеиновые пептидазы большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*, одна из которых является катепсин В-, а вторая – катепсин L-подобной пептидазой. Эти результаты расширяют представления об организации и эволюции пищеварительной системы насекомых, а также могут быть полезны для разработки экологически безопасных методов борьбы с насекомыми-вредителями.

Показано, что флуорогенные аналоги токсических пептидов глиадинов, вызывающих целиакию, расщепляются катепсин L-подобными пептидазами и не расщепляются катепсин В-подобными пептидазами из разных источников. Полученные данные могут быть использованы для разработки подходов к лечению целиакии.

Публикация и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в реферируемых журналах и 2 статьи в сборниках трудов научных конференций. Результаты работы были представлены на 29 и 30 Европейском Пептидном Симпозиумах (Гданьск, Польша, 2006; Хельсинки, Финляндия, 2008), четвертом и пятом Московских международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007 и 2009), Второй международной конференции “Biocatalysis in Non-Conventional Media” (Москва, 2008), Международной конференции молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов» (Москва, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), 9-ом Молодежном научном форуме и 34-ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (Прага, Чехия, 2009).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, посвященного субстратной специфичности пептидаз семейства С1, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (137 ссылок). Содержит 117 страниц, 29 рисунков и 19 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Дизайн субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

В нашу задачу входило получение пептидных субстратов семейства папаина, которые отвечали бы следующим требованиям: 1) соответствие аминокислотной последовательности субстратов специфичности ферментов; 2) наличие в субстратах таких структурных элементов, которые обеспечивали бы возможность прямого детектирования ферментативной активности. В соответствии с этим структура субстратов может быть выражена общей формулой А-Хаа-Уаа↓В, где А = Glp (пироглутамил), Abz (*o*-аминобензоил); В = рNA (*n*-нитроанилид), АМС (7-амидо-4-метилкумарин) и АФС (7-амидо-4-трифторметилкумарин); Хаа = Phe, Val; Уаа = Ala; место предполагаемого гидролиза субстратов показано стрелкой. Поскольку субстрат-связывающая область цистеиновых катепсинов невелика по размерам, предлагаемые субстраты – короткие ди- и трипептиды. Исходя из анализа имеющихся литературных данных, мы предположили, что в подцентре Р₁ субстратов может находиться небольшой по размеру аминокислотный остаток аланина (Уаа = Ala). В положении Р₂, которое является определяющим для специфичности пептидаз семейства С1, находятся гидрофобные остатки (Хаа = Phe, Val). N-концевая группировка субстратов (А) представлена остатками пироглутаминовой (Glp) и *o*-аминобензойной кислот (Abz). Остаток пироглутаминовой кислоты, являясь более гидрофильным, чем большинство используемых защитных групп, введен для обеспечения растворимости субстратов в водно-органических смесях. Группировка

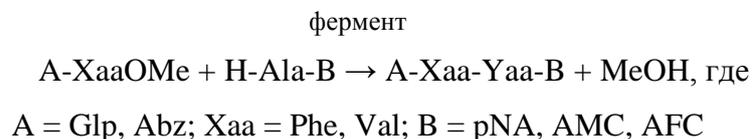
Abz является флуорогенным маркером. В качестве С-концевых остатков (В) использованы хромогенная *n*-нитроанилидная (pNA) и флуорогенные 7-амино-4-метил- и 7-амино-4-трифторметилкумаридные группировки (АМС) и (АFC) соответственно, присутствие которых обеспечивает простоту и высокую чувствительность анализа ферментативной активности по изменению спектральных и флуоресцентных характеристик субстратов в ходе гидролиза. Таким образом, нами были предложены следующие субстраты: Glp-Phe-Ala-pNA (I), Glp-Val-Ala-pNA (II), Abz-Phe-Ala-pNA (III), Glp-Phe-Ala-АМС (IV) и Glp-Phe-Ala-АFC (V).

Возможность всех предложенных соединений являться субстратами цистеиновых пептидаз семейства С1 была проверена с помощью метода молекулярного докинга. На рис. 1 (А–Г) показано возможное связывание предложенных субстратов с молекулами папаина, катепсинов В и L и моделью бромелаина, построенной гомологичным моделированием на основе пространственной структуры химопапаина. На рис 1Д представлены модули энергии связывания полученных комплексов. Было показано, что все вышеперечисленные соединения могут связываться в районе активного центра выбранных пептидаз в конформации, благоприятствующей дальнейшему расщеплению субстратов только по предполагаемой для гидролиза пептидной связи, и, следовательно, являться субстратами исследованных пептидаз.

2. Химико-энзиматический синтез субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

На первом этапе был проведен химический синтез карбоксильных и ряда аминокислот пептидной конденсации. Для получения карбоксильных компонентов – Abz-Phe-ОМе, Glp-Phe-ОМе, Glp-Val-ОМе были разработаны методики, основанные на применении метода активированных эфиров. Синтез аминокислот пептидной конденсации – Ala-pNA и Gln-pNA проводили с Вос-производными аминокислот и *n*-нитроанилином в присутствии POCl₃ с последующим удалением защитных групп.

Заключительной стадией синтеза субстратов являлась ферментативная конденсация компонентов:



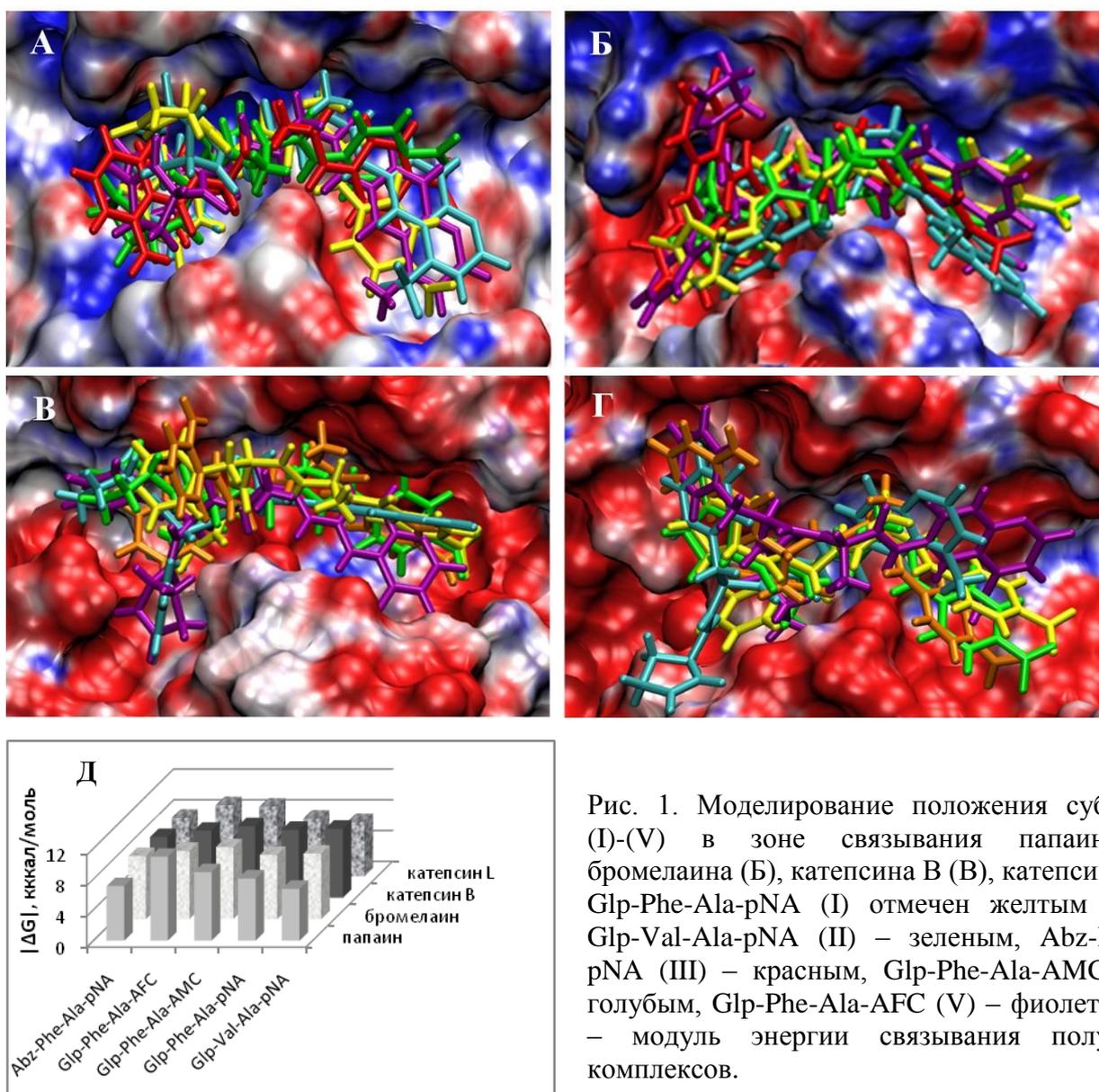


Рис. 1. Моделирование положения субстратов (I)-(V) в зоне связывания папаина (А), бромелаина (Б), катепсина В (В), катепсина L (Г). Glp-Phe-Ala-pNA (I) отмечен желтым цветом, Glp-Val-Ala-pNA (II) – зеленым, Abz-Phe-Ala-pNA (III) – красным, Glp-Phe-Ala-AMC (IV) – голубым, Glp-Phe-Ala-AFC (V) – фиолетовым. Д – модуль энергии связывания полученных комплексов.

Ферментативное образование пептидной связи гарантировало селективность протекания реакции, обеспечивало оптическую чистоту целевых соединений, а также позволило упростить схему синтеза и выделения продуктов. В качестве катализаторов использовались пептидазы α -химотрипсин (ХТР) и субтилизин Карлсберг (СЛ), специфичность которых удовлетворяла структуре синтезируемых субстратов. Возможность проведения ферментативного синтеза субстратов была исследована в двух вариантах: (1) под действием нативных ХТР и СЛ в смеси DMF/водный буфер 50/50 об.%. и (2) с использованием модифицированных ферментов в безводной среде полярных органических растворителей (DMF-MeCN (20/80 об. %)).

В случае проведения синтезов под действием нативных ферментов концентрация исходных соединений составляла 0,13 М, концентрация ферментов – 50 мкМ ([S]:[E] = 2600:1). Смещение равновесия в сторону синтеза определялось ускорением образования ацилфермента

за счет активации карбоксильного компонента, содержащего сложноэфирную группу. Дополнительным фактором смещения равновесия в сторону синтеза являлось выведение продукта из сферы реакции за счет выпадения его в осадок.

Было показано, что под действием нативных пептидаз в водно-органической среде может быть проведен синтез только некоторых субстратов – Glp-Phe-Ala-pNA (I) под действием ХТР и СЛ с выходами 70% и 66% соответственно, Abz-Phe-Ala-pNA (III) под действием ХТР с выходом 70% и Glp-Phe-Ala-AFC (V) под действием ХТР и СЛ с выходами 50% и 18% соответственно.

Более универсальным оказалось проведение ферментативного синтеза субстратов в безводной органической среде под действием ХТР и СЛ, иммобилизованных на криогеле поливинилового спирта (КПВС). Реакция проводилась в смеси DMF-MeCN (20/80 об. %), молярные соотношения фермент/субстрат составляли для синтеза с использованием СЛ 1/(3600-5600), ХТР – 1/(800-2200). Сдвиг равновесия в сторону синтеза осуществлялся благодаря недостатку воды в реакционной смеси. В отличие от водной среды, в органических растворителях под действием иммобилизованных ферментов удалось получить все субстраты, однако эффективность синтеза была различна. В исследованных нами условиях синтез субстратов (I) и (III)-(V), содержащих остаток Phe, проходил гораздо лучше под действием иммобилизованного ХТР (выходы целевых соединений варьировались от 11 до 100% (в случае Glp-Phe-Ala-AMC)), в то время как под действием иммобилизованного СЛ выходы не превышали 44% (Glp-Phe-Ala-pNA (I)). Вместе с тем, синтез Glp-Val-Ala-pNA (II) удалось осуществить только с использованием СЛ – в присутствии ХТР образования этого пептида не наблюдалось.

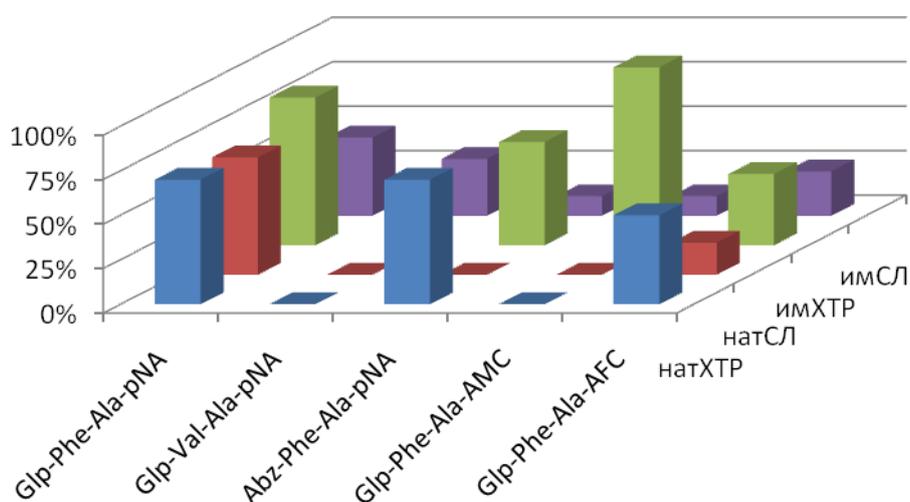


Рис. 2. Ферментативный синтез субстратов (I)-(V) с использованием нативных и иммобилизованных ферментов.

Возможность повторного использования иммобилизованных биокатализаторов была показана на примере синтезов Glp-Phe-Ala-pNA (I) и Glp-Phe-Ala-AMC (IV) под действием ХТР, иммобилизованного на КПВС. Выход пептида (I) был достаточно высоким (70-80%) и практически не менялся даже после 6-кратного использования одного и того же образца биокатализатора. В случае Glp-Phe-Ala-AMC эффективность синтеза была одинаковой на протяжении двух циклов. За 4 ч выход (IV) составил 50 % и достиг количественного за 48 ч.

В целом, эффективность синтеза производных с Phe выше при использовании ХТР, а с Val – при использовании СЛ. Перспективным методом является получение целевых соединений в органических растворителях с использованием иммобилизованных на КПВС ХТР и СЛ, поскольку в этом случае решается проблема растворимости гидрофобных компонентов. Иммобилизация пептидаз в этом случае позволяет повысить устойчивость белков к денатурации и дает возможность повторного использования катализаторов. При проведении пептидного синтеза в водно-органических смесях под действием нативных ХТР и СЛ выход целевых продуктов, как правило, выше, синтез проходит быстрее и с меньшим количеством биокатализатора.

Все синтезированные пептиды представляют собой устойчивые кристаллические соединения. Все соединения охарактеризованы величинами хроматографической подвижности в нескольких системах (ТСХ), временами удерживания (ВЭЖХ), данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии и ЯМР (табл. 1). Получены спектры поглощения *n*-нитроанилидных производных, а также спектры возбуждения и испускания соединений, содержащих флуоресцентные маркерные группировки. Полученные физико-химические характеристики синтезированных соединений (I)-(V) свидетельствуют об их химической гомогенности и спектральной чистоте.

3. Гидролиз субстратов цистеиновыми пептидазами семейства С1

Гидролиз полученных пептидомиметиков (I)-(V) изучали под действием цистеиновых пептидаз семейства С1 – растительных ферментов папаина, бромелаина, фицина, а также лизосомальных катепсинов млекопитающих и человека В и L. Для анализа субстратной специфичности вышеперечисленных пептидаз мы использовали также Z-Ala-Ala-Gln-pNA (VI). Все исследуемые субстраты расщеплялись цистеиновыми пептидазами семейства С1. Однозначность расщепления соединений (I)-(VI) по единственной связи между аминокислотным остатком в P₁-положении и соответствующей маркерной группировкой (pNA, AMC, AFC) была показана на примере гидролиза их папаином методом ВЭЖХ.

Таблица 1. Физико-химические характеристики синтезированных субстратов

Субстрат	АК анализ	ТСХ	ВЭЖХ ³	Мг (рассч./ обнар.)	ЯМР ¹ H, DMSO-D ₆ , δ, м.д.
Abz-Phe- Ala-pNA	Phe:Ala 1,04:1	R _f = 0,32 ¹	23,5 мин	475,1/ 475,1	1,32 д (3H, -CH ₃), 2,91 (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,09 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,39 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,65 м (1H, -CH-CH ₃), 6,20 с (2H, -NH ₂), 6,42 д. д (1H, - <i>n</i> -C ₆ (O)H ₄ -NH ₂), 6,57 д (1H, - <i>o</i> -C ₆ (O)H ₄ -NH ₂), 7,05 д. д (1H, - <i>n</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ =O), 7,1-7,30 м (5H, -CH ₂ -C ₆ H ₅), 7,39 д (1H, - <i>o</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ =O), 7,80 д (2H, - <i>m</i> -C ₆ (-NH)H ₄ -NO ₂), 8,16 д (2H, - <i>o</i> -C ₆ (-NH)H ₄ -NO ₂), 8,16 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,49 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,6 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA)
Glp-Phe- Ala-pNA	Glu:Phe:Ala 1,02: 1:1,05	R _f = 0,86 ¹	19,7 мин	467,2/ 467,2	1,38 д (3H, -CH ₃), 1,73 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,02 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,20 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,81 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,09 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,97 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,44 м (1H, -CH-CH ₃), 4,58 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 7,17-7,27 м – (5H, -C ₆ H ₅), 7,71 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,88 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,08 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,25 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,46 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,61 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA)
Glp-Phe- Ala-AMC	Glu:Phe:Ala 1,08:1:1	R _f = 0,32 ¹	15,9 мин	504,2/ 504,2	1,31 д (3H, -CH ₃ в Ala), 1,73 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,01 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,20 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,39 с (3H, -CH ₃ в AMC), 2,73 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 2,87 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,95 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,44 м (1H, -CH-CH ₃), 4,56 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 6,27 с (1H, -CH-C-CH ₃), 7,27 м – (5H, -C ₆ H ₅), 7,48-7,73 м (2H, -NH- <i>o</i> -C ₉ H ₄ O ₂ F ₃), 7,75 (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,77 (2H, -NH- <i>m</i> -C ₉ H ₄ O ₂ F ₃), 8,07 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,43 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,44 с (1H, -C(O)-NH-CH- в AMC)
Glp-Phe- Ala-AFC	Glu:Phe:Ala 1,4:1:1,2	R _f = 0,53 ¹	23,0 мин	558,2/ 558,3	1,35 д (3H, -CH ₃), 1,71 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 1,99 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,18 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,70 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 2,87 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,93 д. д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,39 м (1H, -CH-CH ₃), 4,54 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 6,89 с (1H, -CH-C-CF ₃), 7,23 м – (5H, -C ₆ H ₅), 7,52-7,69 м (2H, -NH- <i>o</i> -C ₉ H ₄ O ₂ F ₃), 7,88 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,92 (2H, -NH- <i>m</i> -C ₉ H ₄ O ₂ F ₃), 8,03 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,41 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,59 с (1H, -C(O)-NH-CH- в AFC)
Glp-Val- Ala-pNA	Glu:Phe:Ala 1:0,7:1,2	R _f = 0,88 ²	21,0 мин	419,2/ 419,2	0,83 д. д (6H, -CH ₃ в Val), 1,15 м (1H, (CH ₃) ₂ CH-CH-), 1,30 д (3H, -CH ₃ в Ala), 1,87 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,09 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,22 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 4,13 м (1H, -CH-CH(CH ₃) ₂), 4,20 м (1H, -CH-CH ₃), 4,57 (1H, -NH-CH-CH-), 7,83 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 7,91 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Val), 7,93 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,22 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,34 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 10,59 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA)

¹ В системе бензол-ацетон-уксусная кислота (100:25:4) ² В системе *n*-бутанол-вода-пиридин-уксусная кислота (15:12:10:3)

³ 0,1% TFA в линейном градиенте MeCN (1 мл/мин) от 10 до 70% за 30 мин на колонке C₁₈ (4,6x250 мм)

Субстраты (I)-(VI) сравнивались по двум характеристикам: (1) по эффективности гидролиза цистеиновыми пептидазами семейства С1, которая характеризуется скоростью гидролиза и оценивается коэффициентом специфичности ферментативной реакции k_{cat}/K_M и (2) по селективности, т.е. устойчивости субстратов к действию пептидаз других кланов.

3.1. Кинетика гидролиза субстратов цистеиновыми пептидазами семейства С1

Кинетические константы гидролиза синтезированных субстратов цистеиновыми пептидазами представлены на рис. 3. Видно, что флуорогенные субстраты по эффективности гидролиза, определяемой величиной k_{cat}/K_M , на порядок превосходят хромогенные субстраты, причем для всех изученных ферментов, за исключением катепсина L, Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC расщеплялись гораздо лучше, чем Abz-Ala-Phe-pNA. В случае флуорогенных субстратов k_{cat}/K_M была максимальной при гидролизе Abz-Phe-Ala-pNA катепсином L, а в случае хромогенных субстратов – при расщеплении Glp-Phe-Ala-pNA папаином. Наибольшая эффективность гидролиза всех хромогенных субстратов наблюдалась для папаина, а наименьшая – для катепсина L; в случае папаина, фицина и катепсина В наилучшим субстратом являлся Glp-Phe-Ala-pNA; бромелаин с сопоставимой эффективностью гидролизовал также Glp-Val-Ala-pNA; катепсин L лучше всего гидролизовал Z-Ala-Ala-Gln-pNA.

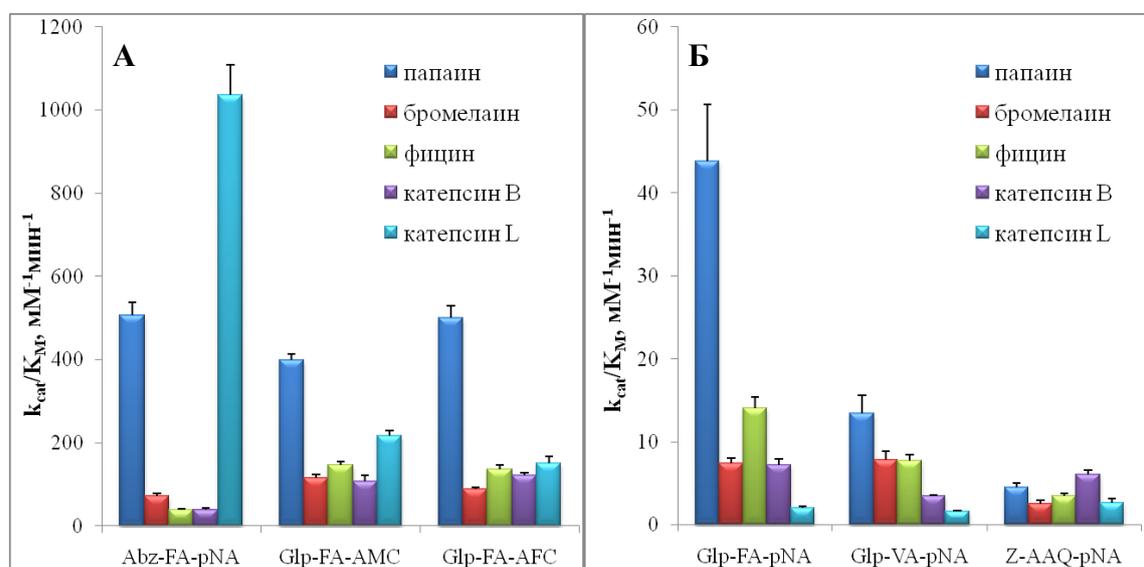


Рис. 3. Эффективность гидролиза флуорогенных (А) и хромогенных (Б) субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1. Условия реакции: рН 5,6, 1 мМ DTT, 2,5% DMF, концентрация пептидаз 20-50 нМ, диапазон концентрации флуорогенных субстратов 1,25-75 мкМ, хромогенных субстратов 25-1000 мкМ.

3.2. Селективность субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

Селективность синтезированных субстратов была исследована с использованием сериновых пептидаз – трипсина, α -химотрипсина, субтилизина Карлсберг; аспартильной – пепсина и металлопептидазы – термолизина. Активность ферментов была измерена в условиях,

оптимальных для работы цистеиновых пептидаз: в слабокислой среде и в присутствии восстановителя дитиотреитола. Полученные данные представлены на рис. 4.

Синтезированные нами флуорогенные субстраты Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC были селективны для цистеиновых пептидаз семейства C1 и не гидролизовались пептидазами других кланов. Субстрат Abz-Phe-Ala-pNA расщеплялся химотрипсином с высокой скоростью и, следовательно, селективным не являлся (рис. 4, А-Б).

Среди хромогенных субстратов селективными являются Glp-Phe-Ala-pNA и Glp-Val-Ala-pNA. Субстрат Z-Ala-Ala-Gln-pNA расщеплялся субтилизином Карлсберг (рис. 4, В-Г).

Была исследована также селективность распространенных коммерческих хромогенных субстратов Z-Phe-Arg-pNA (VII), Z-Arg-Arg-pNA (VIII), Bz-Arg-pNA (IX), которые в настоящее время широко используются для тестирования ферментативной активности цистеиновых пептидаз семейства C1. Z-Phe-Arg-pNA (VII) является специфичным субстратом для всего семейства цистеиновых пептидаз семейства C1, Z-Arg-Arg-pNA (VIII) позволяет разделить по активности катепсины В и L, а Bz-Arg-pNA (IX) является самым распространенным субстратом для определения активности цистеиновых пептидаз семейства C1. Для сравнения проводили гидролиз коммерческих субстратов (VII)-(IX) использованными в работе цистеиновыми пептидазами и перечисленными выше пептидазами других кланов (рис. 4, Д-Е). Z-Phe-Arg-pNA хорошо расщеплялся всеми исследованными цистеиновыми пептидазами, причем наибольшую активность проявлял папаин. Субстрат Z-Arg-Arg-pNA расщеплялся бромелаином и катепсином В, а Bz-Arg-pNA гидролизовался всеми цистеиновыми пептидазами, но с низкой скоростью. Таким образом, все коммерческие субстраты не являются селективными, т.к. с высокой скоростью расщепляются трипсином.

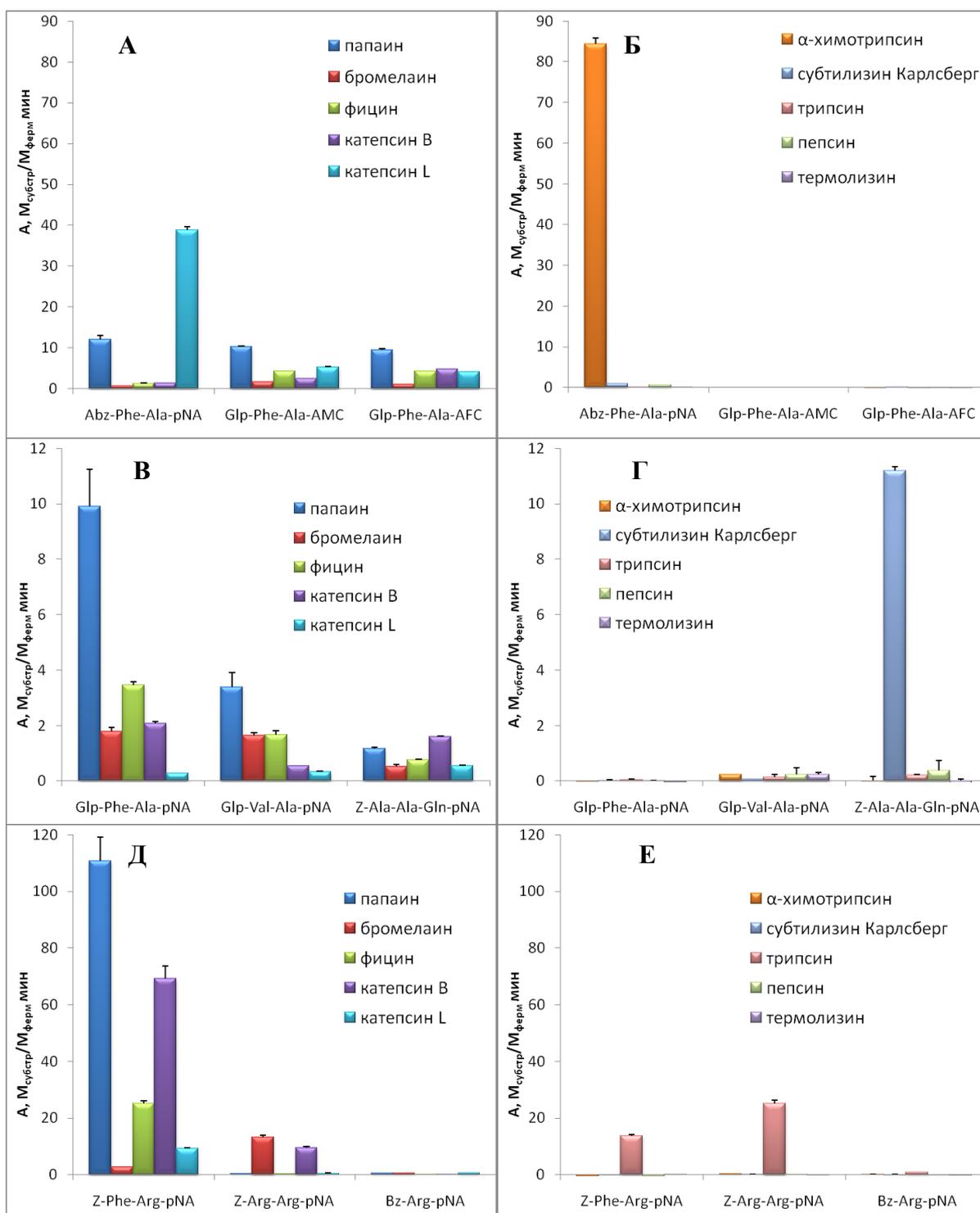


Рис. 4. Активность цистеиновых пептидаз семейства С1 и пептидаз других кланов при гидролизе исследуемых субстратов. Условия реакции: pH 5,6, 1 mM DTT, 2,5% DMF, концентрация пептидаз 20-100 нМ, концентрация флуорогенных субстратов 25 мкМ, хромогенных субстратов 200 мкМ.

3.3. Постэлектрофоретическая детекция активности папаина с использованием синтезированных субстратов

Выявленные преимущества синтезированных флуорогенных субстратов Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC позволили разработать высокочувствительный экспресс-метод

детекции активности цистеиновых пептидаз после нативного электрофореза в ПААГ. Активность пептидаз в геле детектировали визуально под УФ-светом. На рис. 5 представлены результаты детекции папаина в геле (в диапазоне 9 – 174 пмоль) с использованием предложенного подхода в сравнении с другими способами детекции. На полосе А показаны результаты визуализации фермента при окраске геля кумасси, ниже – детекция папаина с использованием хромогенного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA (I). Этот метод обнаружения фермента – непрямой и включает наложение на гель мембраны, пропитанной субстратом, с последующим диазотированием выделяющегося *n*-нитроанилина. На полосах В и Г показаны результаты визуализации папаина с использованием синтезированных нами Glp-Phe-Ala-AMC (IV) и Glp-Phe-Ala-AFC (V). В отличие от использования хромогенного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA, применение флуорогенных соединений (IV) и (V) позволяет детектировать активность непосредственно в геле без проведения дополнительных операций. Преимуществом этого подхода является также повышение чувствительности детекции и возможность безошибочной локализации в геле белковой полосы для дальнейшего анализа.

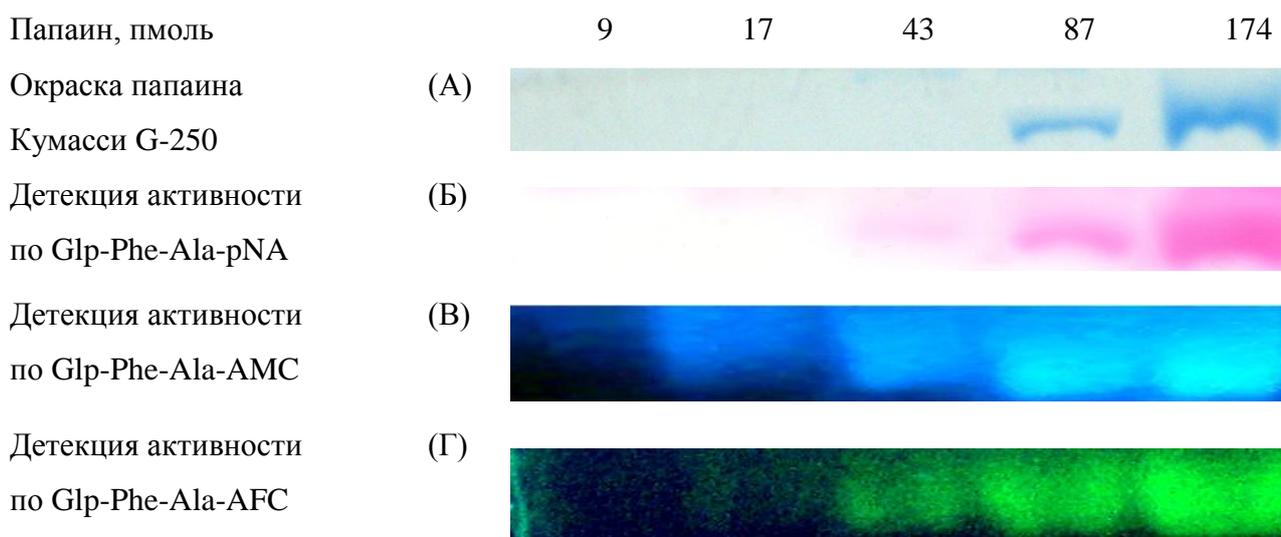


Рис. 5. Различные способы детекции папаина после нативного электрофореза в ПААГ.

4. Идентификация и характеристика цистеиновых пептидаз *Tenebrio molitor*

4.1. Фракционирование пептидаз *Tenebrio molitor*

Синтезированные нами субстраты оказались незаменимы и очень эффективны при исследовании цистеиновых пептидаз личинок жука-вредителя зерновых и крупяных запасов большого мучного хрущака *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Отличительной чертой этих ферментов является их высокая нестабильность, обусловленная как их склонностью к автолизу, так и нахождением в составе многокомпонентного пищеварительного комплекса *T. molitor*. Представление о сложном составе пищеварительного комплекса этого насекомого иллюстрируют результаты хроматографического разделения методом гель-фильтрации

экстракта пищеварительных ферментов (рис. 6). В составе комплекса выявлены цистеиновые пептидазы по субстратам Glp-Phe-Ala-pNA и Z-Ala-Ala-Gln-pNA, трипсиноподобные – по Bz-Arg-pNA, химо трипсиноподобные – по Glp-Ala-Ala-Leu-pNA, пролилкарбокисептидаза по – Z-Ala-Pro-pNA, дипептидилпептидаза IV – по Ala-Pro-pNA, а также ряд других экзопептидаз. В связи с этим использование синтезированных нами селективных субстратов являлось необходимым залогом успеха в детектировании и идентификации цистеиновых пищеварительных пептидаз *T. molitor*. На рис. 7 приведены профили элюции пептидаз, тестированных по синтезированному нами Glp-Phe-Ala-pNA и коммерческому субстрату цистеиновых пептидаз Z-Phe-Arg-pNA в условиях, оптимальных для работы цистеиновых пептидаз (pH 5,6, 1 mM DTT) и трипсиноподобных пептидаз (pH 7,9, без DTT). Видно, что активность по субстрату Glp-Phe-Ala-pNA детектировалась только в условиях, оптимальных для работы цистеиновых пептидаз, в пиках TmCPI и TmCPII. Активность по субстрату Z-Phe-Arg-pNA проявлялась в обоих рассматриваемых условиях, а также в большем количестве фракций, которые соответствовали элюции не только цистеиновых, но и трипсиноподобных пептидаз. Таким образом, только использование предложенных в нашей работе селективных субстратов позволило однозначно выявить активность цистеиновых пептидаз в столь сложной природной смеси, как пищеварительный комплекс личинок *T. molitor*.

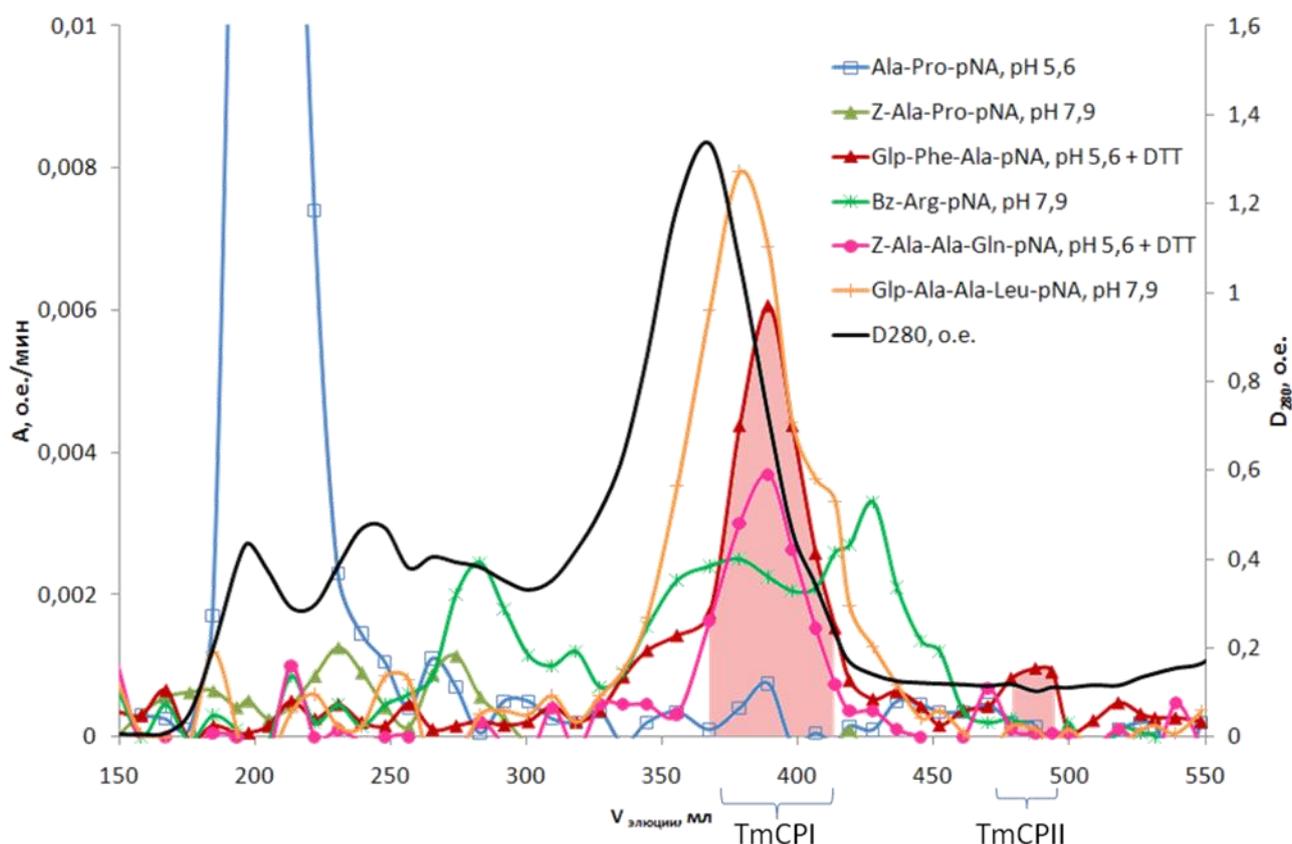


Рис. 6. Фракционирование экстракта пищеварительных пептидаз личинок *T. molitor* на колонке с Sephadex G-100, элюция 0,01 М фосфатным буфером, pH 5,6, содержащим 0,5 М NaCl.

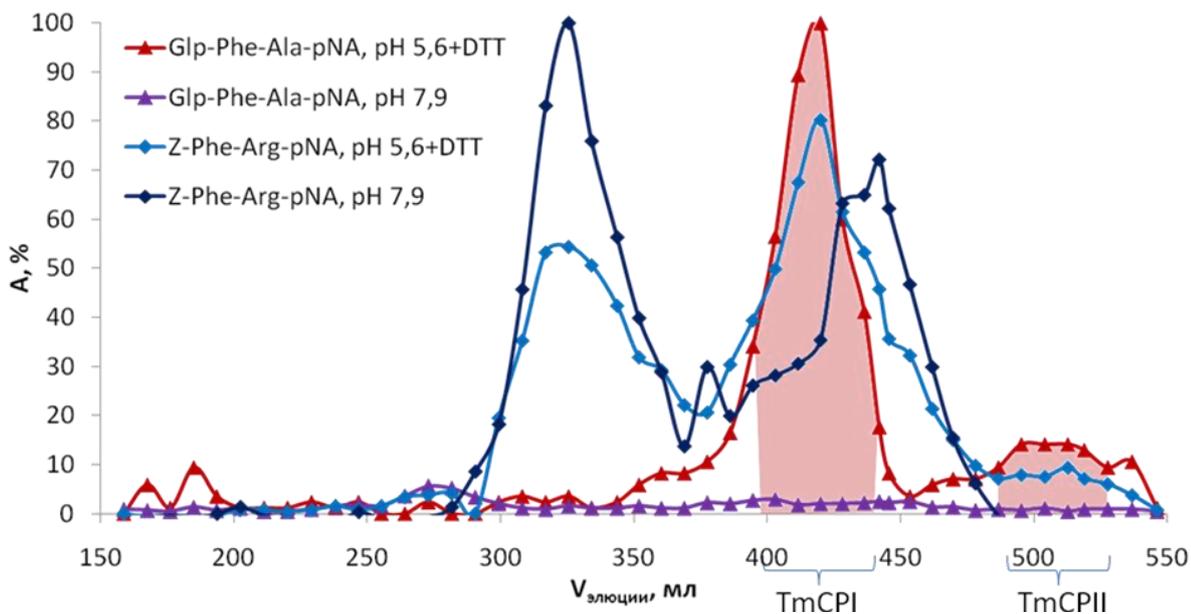


Рис. 7. Использование синтезированного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA в сравнении с коммерческим Z-Phe-Arg-pNA для выявления цистеиновых пептидаз при фракционировании экстракта пищеварительных ферментов личинок *T. molitor* на колонке с Sephadex G-100. Условия эксперимента аналогичны рис. 6.

4.2. Идентификация цистеиновых пептидаз *Tenebrio molitor*

Нами были предприняты многочисленные попытки очистить цистеиновые пептидазы TmCPI и TmCPII с помощью ионообменной и гидрофобной хроматографии, ковалентной хроматографии с пиридилдисульфидным сорбентом, а также аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда соевого ингибитора трипсина. Однако все способы и их различные комбинации оказались неэффективными ввиду значительной потери активности пептидаз и невозможности получить очищенные ферменты. В связи с этим мы разработали методику на основе предложенных нами селективных флуорогенных субстратов, позволившую идентифицировать пептидазы *T. molitor* после всего лишь одной хроматографической стадии очистки. Частично очищенные препараты TmCPI и TmCPII (рис. 6 и 7) подвергали дальнейшему фракционированию посредством нативного электрофореза, после чего непосредственно в геле детектировали активность цистеиновых пептидаз по расщеплению Glp-Phe-Ala-AMC (рис. 8). Флуоресцирующие полосы вырезали из геля и анализировали триптические гидролизаты TmCPI и TmCPII с помощью масс-спектрометрии. Последовательности некоторых из полученных триптических пептидов были определены методом MS/MS. Чистота полученных ферментных препаратов была показана с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Поиск подходящих аминокислотных последовательностей белков был проведен в базах данных NCBI и предоставленной д-ром Брендой Опперт (США) базой кДНК из кишечника личинок *T. molitor*. Таким образом,

препарат TmCPI был идентифицирован как катепсин В-подобная пептидаза *T. molitor* (25 кДа). Препарат TmCPII был идентифицирован как катепсин L-подобная пептидаза (25 кДа), присутствующая в виде близких изоформ, различающихся несколькими аминокислотными заменами. Сравнение последовательностей исследованных цистеиновых пептидаз с другими пептидазами из семейства С1 показано на рис. 9.

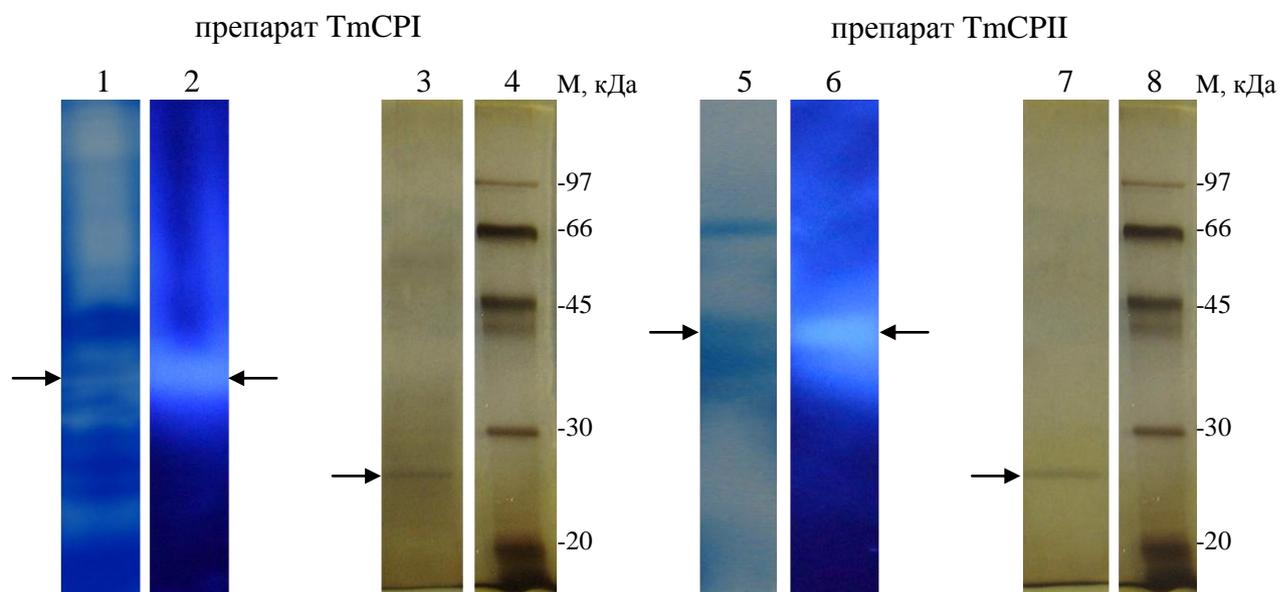


Рис. 8. Электрофоретический анализ TmCPI и TmCPII (показаны стрелками). После нативного электрофореза дорожки 1 и 5 окрашивали Кумасси G-250 для визуализации белка, на дорожках 2 и 6 тестировали активность цистеиновых пептидаз с использованием Glp-Phe-Ala-AMC. На дорожках 3 и 7 представлены результаты электрофореза в денатурирующих условиях фракций TmCPI и TmCPII, изолированных из дорожек 2 и 6, соответственно. Дорожки 4 и 8 – маркеры молекулярной массы. Дорожки 3, 4, 7 и 8 окрашивали серебром.

```

      сигнальный пептид
papain      : MAMIPSIKLLFVAICLFVYMGISFGDFSIYGVYQNDLSTERLIQLFESWMLKHNKIYKNIIDEKIYRFETFKDNLKYIDETNKKN---NSYWLGLNVFADMSNDEFKEKYTG : 110
bromelain  : -----MAWKVQVVFLLFLFCVMWASPSAASADE----PSDPMMKRFEEMWVEYGRVYKDNDEKMRRFQIFKNNVNHIEFTNSRNE---NSYTLGINQFTDMTNNEFLAQYTG : 100
TmCPII-1   : -----MSELGILVLVCLAFATLAL-----PKSLFQEQWSQFKLTHKKSYSPIEETIRRLQIFKDNVAKIAEHNAKFEKGEVITYSKAMNQFGDMSKEEFLAYVNR : 94
TmCPII-2   : -----MKTLL--LVLCLAFATLAL-----PKSLFQEQWSQFKLTHKKSYSPIEETIRRLQIFKDNVAKIAEHNAKFEKGEVITYSKAMNQFGDMSKEEFLAYVNR : 92
TmCPII-3   : -----MNPTEIILAAFCGLIASATLT-----FDHSLAQWTKWKAMHNRLYG-MNEEGWRRAVWEKNMKMIELHNQYREGKHSFTMAMNAFGDMTSEEFQVVMNG : 18
cathepsin_L : -----MNPTLILAAFCGLIASATLT-----FDHSLAQWTKWKAMHNRLYG-MNEEGWRRAVWEKNMKMIELHNQYREGKHSFTMAMNAFGDMTSEEFQVVMNG : 94
cathepsin_B : -----MWQLWASLCCILVLANARS-----RPSFHPLSDELVNYVNRK-----NTTWQAGHNF--YVNDMSYLKRICG : 60
TmCPI      : -----MKCVLLCIVVLAVALSYG-----GVKHLPLSDEFINEINSK-----QTWKAGRNFEDVNPISHVRRLLG : 61

      пропептид
papain      : SIAGNYTTTELSYEEVLNDGDVNPPEYVDWRQKG----AVTPVKNOGSCGSCWAFSAVVVTIEGIIKIRT--GNINEYSEQELLDCCRDS--YGCNGGYPWSALQLVAQY-GIH : 214
bromelain  : GISRPLNIEREPPVVSFDDVDISAVPQSIDWRDYG----AVTSVKNQNPCCGAWAFAAIATVESIYKIKK--GILEPLSEQQVLDCAKG---YGCCKGGWEFRAFEFIIISNKGVA : 204
TmCPII-1   : GKAQKPKHPENLRMPYVS-SKKPLAASVDWRSN----AVSEVKDQGQCGSCWSEFSTTGAVEGQALALQR--GRITSLSEQNLDICSSSYGNAGCDGGWMDSAFYSYIHDYG-IM : 198
TmCPII-2   : GKAQKPKHPENLRMPYVS-SKKPLAASVDWRSN----AVSEVKDQGQCGSCWSEFSTTGAVEGQALALQR--GRITSLSEQNLDICSSSYGNAGCDGGWMDSAFYSYIHDYG-IM : 196
TmCPII-3   : GKAQKPKHPENLRMPYVS-SKKPLAASVDWRSN----AVSEVKDQGQCGSCWSEFSTTGAVEGQALALQR--GRITSLSEQNLDICSSSYGNAGCDGGWMDSAFYSYIHDYG-IM : 122
cathepsin_L : FQNRKPRKGVQEPFLFY-EAP---RSVDWREKG----YVTPVKNOGQCGSCWAFSATGALEGMFRKT--GRITSLSEQNLDICSGPQGNCGNGLMDYAFQYVQDNGGLD : 197
cathepsin_B : TFLGGPKPPQR-VMFTEDLKL---PASFDAREQWPQCPTIK-EIRDQGSCGSCWAFGAVEAISDRICHTNAHVSVSEVSAEDLLTCCGSMCGDCGNGGYPAEAMNFWTRKGLVS : 169
TmCPI      : VLPKANAPKL-PVKTHAVNLDALPESFDAREAWPECTSIIIGEIRDCASCGSCWAFGAVEAMSDRICIHSDASVKVRISAEDLNCC-YDCGDCGNGGWPDLAWSYWSSTGIVT : 173

      EE
papain      : YRNT-----YPYEGVQRYCRSREKGPYAAKTDG-----VRQVQPYNEGALLYSIANQ-PVSVVLEAAGKDFQLYRGGIFVVGPCG--NKVDHAVA : 295
bromelain  : SGAI-----YPYKAAKGTCKTNG-VPNSAYITG-----YARVPRNNESSMMYAVSKQ-PITVAVDAN-ANFQYKSGVFNPCG--TSLNHAVT : 283
TmCPII-1   : SESA-----YPYEAQGDYCRFDS--SQSVTTLTG-----YYDLPSGDENSLADAVGQAGPVAVADA-TDELQFYSGGLFYDQTCNQSDLNHGVL : 280
TmCPII-2   : SESA-----YPYEAQGDYCRFDS--SQSVTTLTG-----YYDLPSGDENSLADAVGQAGPVAVADA-TDELQFYSGGLFYDQTCNQSDLNHGVL : 278
TmCPII-3   : SESA-----YPYEAQDDYCRFDS--SQSVTTLTG-----YYDLPSGDENSLADAVGQAGPVAVADA-TDELQFYSGGLFYDQTCNQSDLNHGVL : 204
cathepsin_L : SEES-----YPYEAETEESCKYNP-KYSVANDTG-----FVDLPK-QEKALMKAVATVGPISVAIDAGHESFLFYKGIYFPCDSEDMDHGVL : 279
cathepsin_B : GGLYESHVGC RPYSIPPCEHEVNGSRPPCTGEGDTPKCSKICEPGYSPTYKQDKHYGNSYSVNSEKDIMEATYKNGPVEGAFSV-YSDFLFYKSGVYQHVYTG-EMMGGHATR : 281
TmCPI      : GGLYGVDGEGCKAYSIKPCDHEVDGNLPGCGDIQRTPACKKSCDSTS DLEYKSDLRRGS-AYSIPKSESQIQTEIMTNGPVEADYIV-YSDFLFYKSGVYQHVYTG-EAEGGAVK : 284

      *
papain      : AVGYGPN-----YILIKNSWGTGWGENGYIRIKRGTGNSYGVCGLYTSSFYFVKN----- : 345
bromelain  : AIGYQDS---NGKKYWIVKNSWGARGEAGYIRMARDVSSSSGICGIAIDSLYPTLESANVEAIKMVSESRSSV : 356
TmCPII-1   : VVGYGSD---NGQDYWILKNSWGSNGEGSYWRQVRNYGNN---CGIATAASYPAL----- : 330
TmCPII-2   : VVGYGSD---NGQDYWILKNSWGSNGEGSYWRQVRNYGNN---CGIATAASYPAL----- : 328
TmCPII-3   : VVGYGSD---NGQDYWILKNSWGSNGEGSYWRQVRNYGNN---CGIATAASYPAL----- : 254
cathepsin_L : VVGYGFESTESDNNKYWLVKNSWGEWGMGGYVKMAKDRRNH---CGIASAASYPTV----- : 333
cathepsin_B : ILGWGVEN---GTPYWLVAANSWNTDWGDNNGFFKILRGQDH---CGIESEVVAGIPRTDQYWEKI----- : 339
TmCPI      : IL----- : 286

```

Рис. 9. Сравнение последовательностей исследованных цистеиновых пептидаз с идентифицированными пептидазами *T. molitor*. Красным отмечены пептиды, найденные методом пептидного фингерпринта с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, подчеркнуты пептиды, последовательность которых определена методом MS/MS. Аннотированные элементы (сигнальный пептид и пропептид с консервативными ERFNIN и GNFD-мотивами – по аналогии с папаином, остатки Q, C, H и N активного центра обозначены «*»), NH в дополнительной петле катепсинов B обозначены «EE», аминокислотные остатки в S₂-положении связывания субстрата обозначены «2») отмечены зеленым.

4.3. Субстратная специфичность цистеиновых пептидаз *T. molitor*

Субстратную специфичность идентифицированных пептидаз *T. molitor* изучали с использованием синтезированных (I)-(VI) и коммерческих (VII)-(IX) субстратов. Активность TmCPI и TmCPII была определена с учетом титрования активных центров ферментов специфическим необратимым ингибитором E-64 (L-транс-эпоксисукцинил-лейциламидо(4-гуанидино) бутаном) и измерена в присутствии ингибиторов сериновых пептидаз PMSF (фенилметилсульфонилфторида) и STI (соевого ингибитора трипсина Куница). Обе пептидазы расщепляли все исследуемые субстраты, но с разной эффективностью (рис. 8). Наибольшую активность пептидазы проявляли при гидролизе субстрата Z-Phe-Arg-pNA. С удовлетворительной скоростью расщеплялись хромогенный субстрат Glp-Phe-Ala-pNA и его флуорогенные аналоги Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC. Катепсин B-подобная пептидаза, как и ее гомолог из млекопитающих, также хорошо расщепляла Z-Arg-Arg-pNA. Специфичность катепсин L-подобной пептидазы из *Tenebrio molitor* не коррелирует со специфичностью катепсина L млекопитающих (см. рис. 4).

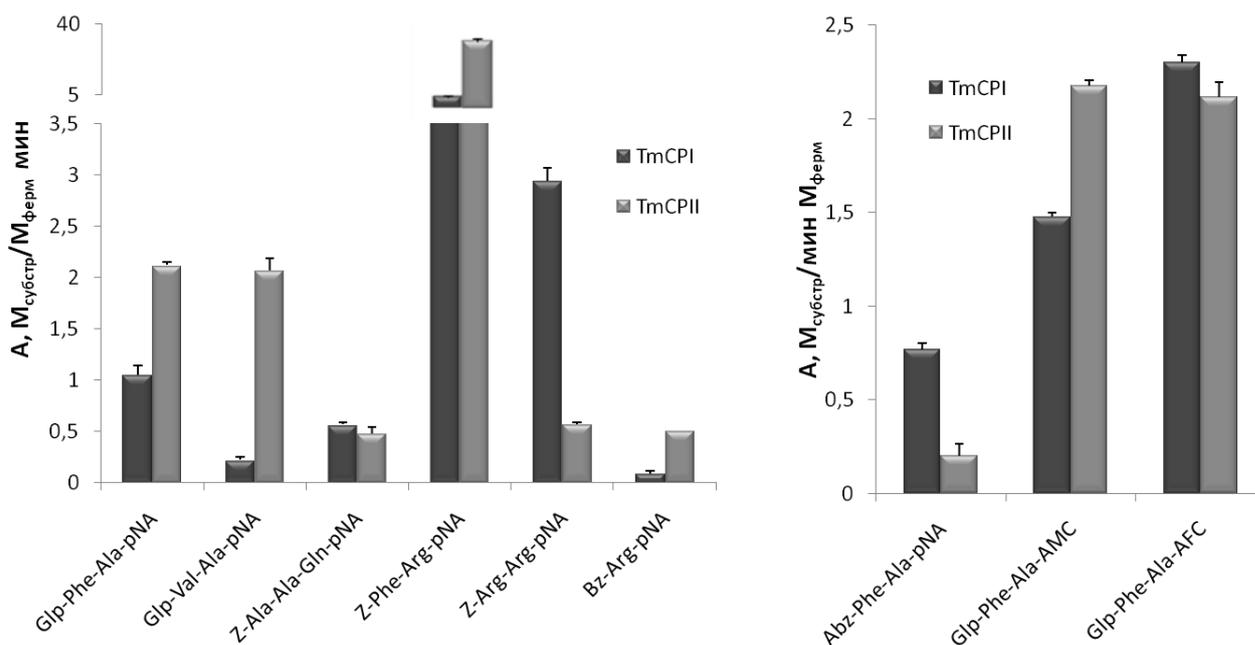


Рис. 10. Субстратная специфичность цистеиновых пептидаз *T. molitor*. Условия реакции: pH 5,6, 1 мМ DTT, 2,5% DMF, концентрация хромогенных субстратов 200 мкМ, флуорогенных субстратов 25 мкМ.

4.4. Гидролиз аналогов токсических пептидов глиадинов катепсинами из различных источников

В работе были использованы флуорогенные аналоги токсических пептидов глиадинов Abz-LPYRQQLPQ-EDDnp (X) и Abz-QPQQPFPQ-EDDnp (XI), любезно предоставленные д-ром Луисом Джулиано (Бразилия). Это пептидомиметики с

внутримолекулярным тушением флуоресценции (Abz – флуорофор, EDDnp (этилендиамин 2,4-динитрофенил) – тушитель флуоресценции). Поскольку цистеиновые пептидазы TmCPI и TmCPII способны расщеплять пептидные связи после остатка Gln в субстрате Z-Ala-Ala-Gln-pNA (см. рис. 10), нами было предположено, что они могут расщеплять и токсические пептиды глиадинов. Активность цистеиновых пептидаз *T. molitor* по субстратам (X) и (XI) была измерена в присутствии ингибиторов сериновых пептидаз PMSF и STI. Для сравнения в этих же условиях был проведен также гидролиз этих субстратов гомологичными пептидазами млекопитающих – катепсинами В и L. Оказалось, что аналоги токсических пептидов расщеплялись катепсин L-подобными пептидазами и не гидролизировались катепсин В-подобными пептидазами из разных источников (рис. 11). Субстрат (XI) гидролизировался обоими катепсинами L с сопоставимой скоростью, в то время как субстрат (X) расщеплялся в 5 раз эффективнее пептидазой TmCPII. Таким образом, пищеварительная цистеиновая пептидаза TmCPII из личинок *T. molitor* может быть предложена в качестве кандидата для создания лекарственного препарата против целиакии.

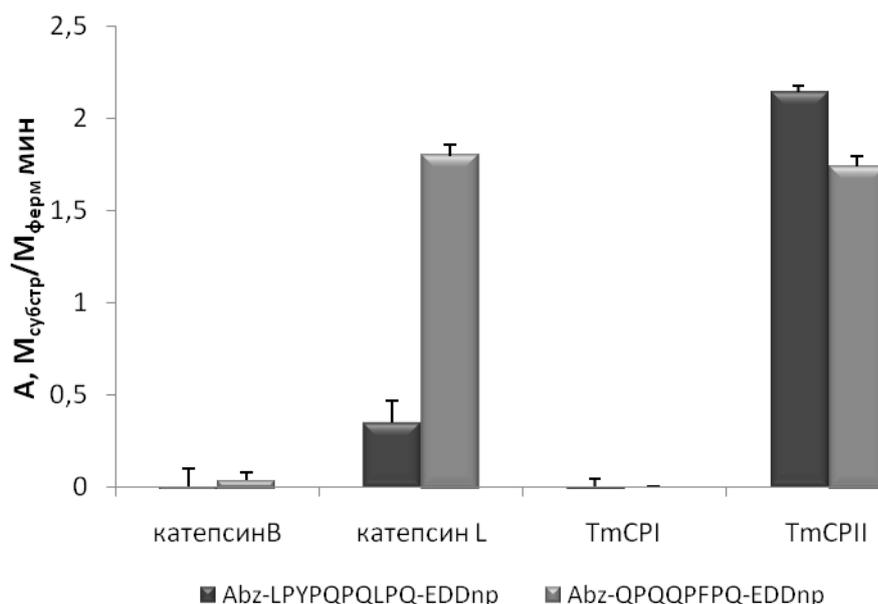


Рис. 11. Гидролиз аналогов токсических пептидов глиадинов катепсин-подобными цистеиновыми пептидазами. Условия реакции: pH 5,6, 1 мМ DTT, 2,5% DMF, концентрация субстратов 25 мкМ.

ВЫВОДЫ

1. Проведен дизайн и осуществлен химико-энзиматический синтез ряда хромогенных и флуорогенных субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1: Glp-Phe-Ala-pNA, Glp-Val-Ala-pNA, Abz-Phe-Ala-pNA, Glp-Phe-Ala-AMC, Glp-Phe-Ala-AFC.

2. Определены кинетические параметры гидролиза синтезированных субстратов пептидазами семейства С1 различного происхождения: растительными ферментами папаином, бромелаином и фицином, а также катепсинами В и L млекопитающих и человека. Показано, что эффективность гидролиза флуорогенных субстратов значительно выше, чем хромогенных.

3. Синтезированные пироглутамилпептиды Glp-Phe-Ala-pNA, Glp-Val-Ala-pNA, Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC селективны для цистеиновых пептидаз семейства С1 и, в отличие от коммерчески доступных субстратов, не расщепляются пептидазами других кланов.

4. Предложен высокочувствительный экспресс-метод детекции цистеиновых пептидаз семейства С1 после нативного электрофореза в ПААГ с использованием синтезированных флуорогенных субстратов Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC.

5. С использованием синтезированных субстратов идентифицированы и охарактеризованы катепсин В- и катепсин L-подобные пищеварительные цистеиновые пептидазы из личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Аникина О.М., Семашко Т.А., Оксенойт Е.С., Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю. Субтилизин Карлсберг, нативный и модифицированный, эффективный катализатор синтеза пептидной связи в органической среде. *Биоорганическая химия*, 2006, Т. 32, № 2, с. 116–121.

2. Семашко Т.А., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Бачева А.В., Филиппова И.Ю. Химико-энзиматический синтез новых флуорогенных субстратов цистеиновых протеиназ семейства папаина. *Биоорганическая химия*, 2008, Т. 34, № 3, с. 376-381.

3. Belyaeva A.V., Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Enzymatic synthesis of high specific substrate for cysteine proteases assay. *Proceedings of the 29th European Peptide Symposium*, 2006, Poland, Gdansk, paper 0319.

4. Semashko T., Popletaeva S., Oksenoit E., Lysogorskaya E., Filippova I. New selective substrates for detection of cysteine proteinases. *Proceedings of the 30th European Peptide Symposium*, 2008, Finland, Helsinki, p. 468-469.

5. Семашко Т.А., Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю. Новые флуорогенные субстраты папаина. Четвертый московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2007, Россия, Москва, секция 6. «Биокатализ и биокаталитические технологии», часть 2, с. 303.

6. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Yu. Synthesis of substrates for cysteine proteinases catalyzed by immobilized enzymes. 2nd International Conference “Biocatalysis in Non-Conventional Media”, 2008, Moscow, p. 49.

7. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Bacheva A.V., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Stable Biocatalysts Based on Proteases Immobilized on Poly(vinyl alcohol) Cryogel for Peptide Bond Formation. 8th International Conference on Protein Stabilisation, 2009, Austria, Graz, p. 73.

8. Семашко Т.А., Оксенойт Е.С., Лысогорская Е.Н., Бачева А.В., Филиппова И.Ю. Биокаталитическая схема синтеза пептидных субстратов протеаз. Пятый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2009, Москва, т. 2., с. 308.

9. Семашко Т.А. Предсказание субстратной специфичности цистеиновых пептидаз семейства С1. XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», 2009, Россия, Москва, секция «Биоинженерия и биоинформатика», подсекция «Биоинформатика», с. 23.

10. Семашко Т.А., Поплетаева С.Б., Бабкин П.А., Гоптарь И.А., Филиппова И.Ю., Элпидина Е.Н. Поиск протеиназ, способных расщеплять трудногидролизуемые пептиды глиаина. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», 2009, Россия, Казань, с. 380.

11. Semashko T.A., Popletaeva S.B., Filippova I.Yu., Elpidina E.N. Digestive cysteine cathepsins against celiac disease. 9th Young Scientist Forum and 34th FEBS Congress, 2009, Czech Republic, Prague. FEBS Journal, V.276, p. 388.