

Заключение диссертационного совета МГУ.015.4
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук
Решение диссертационного совета от «04» декабря 2025 г. №10

О присуждении Петушковой Анастасии Игоревне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Структура и специфичность папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина-α» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите диссертационным советом «22» октября 2025 г., протокол № 7.

Соискатель Петушкова Анастасия Игоревна, 1995 года рождения, в 2018 году соискатель окончила магистратуру на кафедре молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по направлению подготовки 06.04.01 Биология, программе Молекулярная биология.

Соискатель работает младшим научным сотрудником факультета биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Диссертация выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель – доктор биологических наук, Замятнин Андрей Александрович, исполняющий обязанности декана факультета биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Байков Александр Андреевич, доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, заведующий отделом химии белка;

Ямпольский Илья Викторович, доктор химических наук, ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, отдел биомолекулярной химии, главный научный сотрудник лаборатории химии метаболических путей;

Бачева Анна Владимировна, кандидат химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет, доцент кафедры химии природных соединений

дали положительные отзывы на диссертацию.

Выбор официальных оппонентов обосновывался компетентностью в соответствующей отрасли науки и наличием публикаций в соответствующей сфере исследования.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 6 работ, из них 6 статей, опубликованных, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (биологические науки).

1) **Petushkova A.I.**, Savvateeva L.V., Zamyatnin A.A. Jr. Structure determinants defining the specificity of papain-like cysteine proteases // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022. Vol. 20. P. 6552–6569. EDN: PJWBBZ. Доля участия 80%. 1,1 п.л. Импакт-фактор 4,1 (JIF).

2) **Petushkova A.I.**, Zamyatnin A.A. Jr. Redox-mediated post-translational modifications of proteolytic enzymes and their role in protease functioning // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 4. P. 650. EDN: MDUIZN. Доля участия 80%. 1,3 п.л. Импакт-фактор 4,8 (JIF).

3) **Петушкиова А.И.**, Савватеева Л.В., Королев Д.О., Замятнин А.А. мл. Цистеиновые катепсины: перспективы применения в диагностике и терапии злокачественных опухолей // *Биохимия*. 2019. Т. 84, № 7. С. 953–971. EDN: QPFBNT. Доля участия 70%. 1,1 п.л. Импакт-фактор 1,696 (РИНЦ).

[**Petushkova A.I.**, Savvateeva L.V., Korolev D.O., Zamyatnin A.A. Jr. Cysteine cathepsins: potential applications in diagnostics and therapy of malignant tumors // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. Vol. 84, № 7. P. 746–761. EDN: HYETPD. Доля участия 70%. 1 п.л. Импакт-фактор 2,2 (JIF).]

4) Makarov V.A., Tikhomirova N.K., Savvateeva L.V., **Petushkova A.I.**, Serebryakova M.V., Baksheeva V.E., Gorokhovets N.V., Zernii E.Y., Zamyatnin A.A. Jr. Novel applications of modification of thiol enzymes and redox-regulated proteins using S-methyl methanethiosulfonate (MMTS) // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2019. Vol. 1867, № 11. P. 140259. EDN: CQTXGK. Доля участия 40%. 0,6 п.л. Импакт-фактор 2,3 (JIF).

5) Balakireva A.V., Kuznetsova N.V., **Petushkova A.I.**, Savvateeva L.V., Zamyatnin A.A. Jr. Trends and prospects of plant proteases in therapeutics // *Current medicinal chemistry*. 2019. Vol. 26, № 3. P. 465–486. EDN: AANIHW. Доля участия 50%. 1,3 п.л. Импакт-фактор 3,5 (JIF).

6) Gorokhovets N.V., Makarov V.A., **Petushkova A.I.**, Prokopets O.S., Rubtsov M.A., Savvateeva L.V., Zernii E.Y., Zamyatnin A.A. Jr. Rational design of recombinant papain-like cysteine protease: optimal domain structure and expression conditions for wheat-derived enzyme triticain- α // *International journal of molecular sciences*. 2017. Vol. 18, № 7. P. 1395. EDN: XNFXBK. Доля участия 40%. 1 п.л. Импакт-фактор 4,9 (JIF).

На диссертацию и автореферат поступило 3 дополнительных отзыва, все положительные.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, соответствующей п. 2.1 Положения о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В.Ломоносова. В диссертационной работе была описана специфичность папаин-подобной цистеиновой протеиназы (ППЦП) тритикаина- α из пшеницы *Triticum aestivum* и выявлена зависимость этой специфичности от структуры сайтов связывания S₁ и S₂ фермента и значения pH среды.

В представленном исследовании был разработан подход к получению активного растворимого тритикаина- α . Только продукция фермента, состоящего из продомена и катализического домена в одной цепи, приводит к получению активного тритикаина- α , что указывает на важную функцию продомена как внутримолекулярного шаперона. Эти данные могут помочь в разработке эффективных методов продукции различных ППЦП.

В данной работе впервые методом рентгеноструктурного анализа была получена третичная структура тритикаина- α (разрешение 3,46 Å, PDB ID: 8ZLQ), которая была далее использована для моделирования комплексов фермента с олигопептидами в программе AlphaFold. Было обнаружено, что боковые группы полярных незаряженных и положительно заряженных аминокислотных остатков (а.о.) в положении P₁ пептидов направлены в сторону Glu191 или Asp289, фланкирующих сайт S₁ тритикаина- α , что отличает фермент от других ППЦП. При этом гидрофобные а.о. в положении P₂ располагаются в консервативном гидрофобном кармане сайта S₂.

Выявленные структурные особенности объясняют специфичность тритикаина- α , описанную с использованием пептидов, меченых фосфотирозином, и флуорогенных пептидов. В кислой среде фермент селективен к субстратам с гидрофобным а.о. в P₂- и полярным незаряженным или положительно заряженным а.о. в P₁-положении. Измерение активности тритикаина- α и его мутантов (Glu191Asn и Glu191Lys) в диапазоне pH 3,6-7,5 показало зависимость специфичности фермента к P₁-положению от pH. При росте pH с 3,6 до 6,5 активность в отношении субстрата с Asp снижалась, а к субстратам с положительно заряженным или полярным незаряженным а.о. в положении P₁ – повышалась. При этом оба мутанта, в отличие от дикого типа, гидролизовали субстрат с Asp при pH 6,5, что указывает на важность Glu191 для специфичности тритикаина- α в нейтральной среде.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при разработке препарата на основе тритикаина- α для энзиматической терапии непереносимости глютена, а именно оптимизации условий его продукции и применения. Также эти данные актуальны для создания диагностических зондов и терапевтических ингибиторов ППЦП, а также дизайна новых протеиназ для энзиматической терапии.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

- 1) Для получения активного растворимого тритикаина- α необходима продукция белка в форме полипептида, содержащего продомен и каталитический домен.
- 2) Тритикаин- α проявляет субстратную селективность по отношению к пептидным последовательностям с гидрофобным а.о. в P_2 - и положительно заряженным или полярным незаряженным а.о. в P_1 -положении.
- 3) В субстрат-связывающей борозде тритикаина- α расположены консервативный гидрофобный карман в S_2 -сайте и отрицательно заряженные а.о. Glu191 и Asp289 в сайте связывания S_1 , которые могут участвовать во взаимодействиях с субстратом.
- 4) Субстратная специфичность тритикаина- α к аминокислоте в позиции P_1 субстрата определяется остатками Glu191 и Asp289 в S_1 -сайте фермента и зависит от рН среды.

На заседании «04» декабря 2025 г. диссертационный совет принял решение присудить Петушковой А.И. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 17 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 13, против 0, недействительных бюллетеней 1.

Председатель
диссертационного совета

Карпова О.В.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Комарова Т.В.

Дата
Печать структурного подразделения МГУ