

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Петушковой Анастасии

Игоревны

на тему: «Структура и специфичность папаин-подобной цистеиновой протеиназы тритикаина- α »

по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертационная работа А.И. Петушковой посвящена установлению и объяснению на структурном уровне субстратной специфичности цистеиновой протеиназы тритикаина- α пшеницы с целью создания теоретической базы для разработки терапевтических ингибиторов папаин-подобных цистеиновых протеиназ и поиска и дизайна новых протеиназ для энзиматической терапии.

Протеиназы относятся к числу важнейших ферментов клетки и присутствуют в ней в очень большом многообразии как по структуре, так и по механизму действия и роли во различных клеточных процессах. Пик количества публикаций по этой теме относится к прошедшему столетию, но они продолжают с высокой интенсивностью до наших дней. Это свидетельствует о сохраняющемся интересе к протеиназам, наличии нерешенных вопросов и возможности новых открытий. Исследования в этой области приводит к открытию новых протеиназ и механизмов их влияния на важнейшие процессы жизнедеятельности.

В диссертационной работе А.И. Петушковой рассматривается папаин-подобная цистеиновая протеиназа тритикаин- α пшеницы. Диссертант впервые определила пространственную структуру каталитического фрагмента этого фермента и на основе предсказанной молекулярной модели фермент-субстратного комплекса дала полное объяснение субстратной специфичности. Оба направления исследования находятся на передовом крае современной науки.

Диссертационная работа А.И. Петушковой построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть с описанием материалов и методов исследования, результаты, их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и три приложения. Работа изложена на 131 странице, иллюстрирована 33 рисунками и 7 таблицами (включая приложения). Список цитируемой литературы включает 294 наименования.

Во введении показана актуальность темы работы, сформулированы ее цели и задачи, отражена ее новизна. В обзоре литературы А.И. Петушкова рассмотрела доступные публикации по всем аспектам диссертационной работы. Приведено описание общей структуры папаин-подобных цистеиновых протеиназ с анализом подсайтов связывания субстратов, регуляции каталитической активности эндогенными ингибиторами, собственными продоменами, гликозаминогликанами, неорганическими ионами (в том числе H^+). В отдельной части обзора папаин-подобные цистеиновые протеиназы рассмотрены как патогенные и терапевтические факторы в медицине. Рассмотрены также достижения в их использовании для терапии целиакии.

В экспериментальной части приведены сведения об использованных коммерческих реактивах, аналитических наборах, олигонуклеотидах, пептидах, ферментах, антителах, плазмидах, штаммах *E. coli* и расходных материалах из пластика, использованных методах получения и характеристики рекомбинантного тритикаина- α и его мутантных вариантов. Спектр методов очень широк и включает методы разделения белков, измерения протеолитической активности, рентгеноструктурного анализа белка, масс-спектрометрии, сайт-направленного мутагенеза, предсказания структуры белка, электрофорез, биоинформатические методы анализа первичной и третичной структур, методы статистического анализа и другие.

А.И. Петушковой разработана методика и найдены условия продукции активного каталитического фрагмента тритикаина- α в растворимой форме с

хорошим выходом. Скринингом библиотеки из 3525 пептидов длиной 8 или 15 а.о. определена субстратная специфичность тритикаина- α ; показано, что критическим является наличие положительно заряженного и гидрофобного остатков в положениях P1 и P2 субстрата, соответственно (нумерация от остатка, образующего расщепляемую связь в сторону N-конца). Показано, что расщепляемая связь образована карбоксильной группой остатка P1. Синтезированы семь флуорогенных пептидов, отвечающих специфичности тритикаина- α , трех других цистеиновых протеиназ, или содержащих гидролизуюмую тритикаином- α связь фрагментов глютена. Показан гидролиз тритикаином- α одного из двух фрагментов глютена. С разрешением 3,5 Å экспериментально определена структура неактивного фрагмента тритикаина- α , получены теоретические модели комплексов его активной формы с семью пептидами. Для докинга пептидных субстратов нетривиально и очень удачно использовали AlphaFold2 в варианте Multimer. В результате идентифицированы центры связывания на ферменте и найдены существенные для специфичности остатки дикарбоновых аминокислот, фланкирующие центр P1 и отличающие тритикаин- α от других папаин-подобных протеиназ. Важный результат работы — обнаружение зависимости специфичности фермента от pH, вероятно связанной с влиянием указанных остатков дикарбоновых аминокислот.

Полученные результаты представляют интерес как в фундаментальном аспекте, так и в плане их применения для конструирования лекарственных препаратов в медицине, в частности, для лечения целиакии. Научные результаты диссертации, а также методические подходы могут быть в дальнейшем использованы для выполнения фундаментальных исследований в области биоинженерии, биоорганической химии и клинической биохимии в высших учебных заведениях и научно-исследовательских организациях. Все полученные результаты являются новыми и имеют приоритетный характер в части объяснения субстратной специфичности тритикаина- α на

молекулярном уровне. Выполненный автором анализ экспериментальных данных и сделанные выводы полностью соответствуют полученным в работе результатам. Автореферат полностью отражает основное содержание и выводы работы. Достоверность и научная значимость результатов подтверждается их публикацией в шести статьях, из них пять в международных журналах квартилей Q1-Q2 по данным Web of Science и/или Scopus. Результаты были также доложены на шести научных конференциях. Работа прекрасно оформлена. В целом, диссертационную работу А.И. Петушковой можно считать образцовой.

Принципиальных замечаний по работе нет, есть только мелкие замечания, в-основном, стилистического характера:

1. Выбор клеток *E. coli* Rosetta для продукции белка обоснован способностью этих клеток облегчать образование S-S-мостиков. В описаниях структуры и модели AlphaFold не упомянуто, есть ли такие мостики в белке.
2. Разрешение кристаллической структуры белка невелико по современным понятиям. Наверное, имело бы смысл ее уточнить методом молекулярной динамики, который позволяет лучше приблизиться к структуре, соответствующей энергетическому минимуму молекулы белка.
3. Рисунки 13 и 14 автореферата и соответствующие рисунки 27 и 28 диссертации несколько неуклюжи – на них не уместились верхние точки. Имело смысл использовать для ординаты логарифмическую шкалу.
4. Совсем мелкие замечания: автор называет ферментом и тритикаином- α каталитический фрагмент тритикаина- α ; вместо «колонка, уравновешенная буфером» следует писать «колонка, уравновешенная с буфером»; численные значения следует округлять до значащих цифр («175 ± 5» вместо «174,60 ± 4,50» и т.п.).

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует

специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Петушкова А.И. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, заведующий отделом химии белка НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

БАЙКОВ Александр Андреевич

31 октября 2025 г.

Контактные данные оппонента:

тел.: _____, e-mail: baykov@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.10 Биоорганическая химия

Адрес места работы: 119992 г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени М.
В. Ломоносова». Тел.: 7(495)9395359; e-mail: fxb@belozersky.msu.su

Подпись А.А. Байкова заверяю

и.о. директора

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова

член-корреспондент РАН



И.В. Сергеев