

**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 изучению структуры и специфичности цистеиновой протеиназы из пшеницы тритикаина-α, а также выяснению влияния pH и некоторых аминокислотных остатков активного центра на специфичность этого фермента. Актуальность темы обусловлена медицинской значимостью цистеиновых протеиназ, которые являются как мишенями противоопухолевой терапии, так и, в случае растительных ферментов, используются в качестве ферментных препаратов при лечении некоторых заболеваний. Хотя специфичность цистеиновых протеиназ изучается давно, а структура многих ферментов этого семейства известна и представлена в базах данных, однако имеющихся данных о структуре и специфичности цистеиновых протеиназ злаковых, особенно обладающих способностью расщеплять глютен, крайне мало. В связи с этим полученные в работе новые данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

В диссертационной работе была поставлена задача получить тритикаин-α в высокоочищенном состоянии, определить его третичную структуру и описать субстратную специфичность фермента, выявив основные аминокислотные остатки, ответственные за формирование субстрат-связывающего центра, а также изучить влияние pH на селективность гидролиза субстратов разного аминокислотного состава.

Работа изложена на 131 странице машинописного текста и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений и Список литературы, состоящий из 294 наименований. Работа содержит 6 таблиц, 28 рисунков и три приложения.

Введение содержит подробное описание актуальности и степени разработанности темы, объекта и предмета исследования, научной новизны, теоретической и практической значимости, методологии исследования, степени достоверности данных. В нем четко сформулированы цели и задачи работы, положения, выносимые на защиту, а также охарактеризован личный вклад автора и перечислены конференции, где были представлены доклады по теме диссертации.

Обзор литературы систематизирует актуальные сведения о структуре и субстратной специфичности папаин-подобных цистеиновых протеиназ, влиянии различных веществ, в том числе pH, на активность ферментов этого семейства, а также об их применении в медицине. Отдельный подраздел посвящен применению тритикаина- α в терапии непереносимости глютена. В обзоре проведен глубокий анализ активных центров папаин-подобных цистеиновых протеиназ, сделан фокус на ключевых аспектах структуры центров связывания, что обеспечивает хорошую теоретическую базу для собственных результатов автора. Из недостатков главы «Обзор литературы» следует отметить некорректный вывод, сделанный при обсуждении влияния различных ионов на активность ферментов семейства папаина, поскольку приведенные данные говорят скорее о специфическом влиянии различных катионов, чем о простом воздействии ионной силы и экранирования зарядов боковых функциональных групп аминокислот на ферментативную активность.

В разделе «Материалы и методы» методики написаны подробно, детально изложены как генно-инженерные методы, так и процедуры выделения и очистки всех исследуемых в работе белков, способы определения их активности, методики кристаллизации, получения и обработки дифракционных картин, предсказания структур комплексов, а также описаны использованные физико-химические методы исследования и обработки данных. В диссертации был использован широкий спектр разнообразных методов, что показывает прекрасную методическую

подготовку автора. Успешное сочетание самых разных биохимических методов исследования, рентгеноструктурного анализа, а также биоинформатических методов, является одним из преимуществ данной работы.

Глава «Результаты» разделена на шесть подразделов, первый из которых посвящен разработке и оптимизации метода экспрессии активного тритикаина- α , второй – определению субстратной специфичности фермента. Далее приведены данные о третичной структуре тритикаина- α , полученные с помощью рентгеноструктурного анализа и последующего молекулярного замещения с использованием модельной структуры, предсказанной и размещенной в базе данных AlphaFold. Затем подробно обрисована структура активного центра, особое внимание уделено описанию S1- и S2-субстрат-связывающих карманов. В шестом разделе обсуждаются результаты изучения влияния pH среды и наличия остатка Glu191 на специфичность тритикаина- α к P1-положению субстрата. Получены следующие данные: для правильного фолдинга и получения активного тритикаина- α при наработке белка в клетках *E.coli* необходим его продомен, причем в составе единой полипептидной цепи с каталитическим доменом, и наличие 6HIS-тэга возможно только на N-конце белка. Пространственная структура неактивного 6HIS-тритикаин- α -GM^{C154A} с продоменом получена с разрешением 3,46Å, относится к типу $\alpha+\beta$ и характерна для папаин-подобных цистеиновых протеиназ. Аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающие карманы S1 и S2, идентичны либо похожи на аналогичные остатки в других цистеиновых протеазах семейства папаина, за исключением переменных Glu191 в S1-сайте, а также Met198 и Glu340 в S2-сайте, в связи с чем субстрат-связывающая бороздка имеет отрицательно заряженную поверхность. Специфичность тритикаина- α , определенная с использованием библиотеки пептидов и отдельных синтезированных субстратов, похожа на специфичность других ферментов этого семейства, с предпочтением положительно заряженных остатков, а также глутамина в

позиции P1, и гидрофобных остатков в позиции P2. Особый интерес вызывают результаты, представленные в шестом разделе, где показано, что специфичность тритикаина- α по P1-положению зависит от значения pH и присутствия Glu191.

По главе «Результаты» у меня возникли следующие вопросы и замечания: 1) Не приведена электрофореграмма очищенного белка, с которым проводились исследования, нет оценки чистоты полученных препаратов белков, и не обсуждается природа дополнительных полос, присутствующих на электрофореграмме, приведенной на рисунке 14 (например, на рисунке отчетливо видны полосы на уровне около 35 и 20 кДа); 2) Обычно считается, что для активации протеазы, экспрессирующейся в виде профермента, нужно отщепление продомена, однако в тексте про это ничего не написано и методика активации не приведена; 3) Не приведена структура пептидной библиотеки «из 3525 пептидов», которую использовали для определения специфичности тритикаина- α . Очевидно, что она не может содержать все случайные последовательности, поскольку в таком случае количество пептидов в этой библиотеке только для октапептидов составляло бы 20^8 или $25,6 \times 10^9$ пептидов, а в составе использованной библиотеки были еще и 15-членные пептиды; 4) Отсутствует объяснение того, почему скорость гидролиза субстрата, содержащий Pro в позиции P2, оказалась настолько низкой для экспрессированного фермента по сравнению с природным ферментом, у которого Pro в позиции P2 встречается довольно часто, на что указывают данные о местах расщепления глютеиновых белков тритикаином- α , приведенные на рисунке 9; 5) не приведено объяснение снижению каталитической активности при pH 7,5 по сравнению с более кислыми значениями pH.

В работе после главы «Результаты» следует глава «Обсуждение», в которой автор более подробно обсуждает полученные данные и сравнивает их с результатами, опубликованными в литературе. По этой главе есть

следующие замечания: 1) первые два абзаца можно было бы перенести в главу «Обзор литературы», и 2) саму главу «Обсуждение» можно было бы объединить с главой «Результаты», что позволило бы избежать ненужных повторений.

К мелким погрешностям текста можно отнести синтаксические ошибки, и неудачные выражения: «домен, **на** котором и происходит гидролиз», «до обратимой формы сульфеновой кислоты, либо до необратимой сульфоновой кислоты», «Измерение активности проводилось **на** диапазоне концентраций субстратов», «бромелаин гидролизует pGlu-FL-PNA **на** диапазоне pH от 4,0 до 4,5...» «Снижение соотношения эффективности расщепления субстратов Z-FR-AMC к ZRR-AMC меняется...», «очистки продукта экспрессии от клеточных лизатов», «Все кристаллы дифракционировались» и т.п.

В целом, у меня сложилось хорошее впечатление о рассматриваемой диссертационной работе, представленный текст свидетельствует о способности Анастасии Игоревны Петушковой к критическому осмыслению своих результатов в контексте имеющихся в литературе данных. Работа представляет собой полноценное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне с привлечением самых современных методов исследования, при помощи которых получены новые важные и оригинальные данные. Результаты данной работы имеют существенное теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в данной области, достоверность полученных данных не вызывает сомнений и подтверждена статистическим анализом. Выводы, сделанные из диссертации, хорошо обоснованы и соответствуют приведенным результатам. Материалы диссертационной работы достаточно полно отражены в шести публикациях, в трех из которых Петушкова Анастасия Игоревна является первым автором. Представленный автореферат по содержанию полностью соответствует

диссертации. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по биологическим наукам), а именно следующим ее направлениям: инженерия белков, разработка принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомика, фолдинг белков (Биологические науки), а также применение генной инженерии для создания технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (культур клеток и тканей), осуществления манипуляций с генами, введения их в другие организмы и выращивания культур микроорганизмов, растений и животных (Биологические науки).

Указанные мной 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, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Петушкова Анастасия Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология» (биологические науки).

Официальный оппонент:
кандидат химических наук,

Доцент кафедры химии природных соединений
Химического факультета Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Бачева Анна Владимировна

24.11.25

Контактные данные:

тел.: +7(495)9395529, e-mail: anbach@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия (хим. науки)

Адрес места работы:

119234, Россия, г. Москва, тер. Ленинские горы, д. 1, стр.40,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химии природных соединений
Тел.: +7(495)9395529; e-mail: anbach@belozersky.msu.ru

