

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 исследованию субстратной специфичности цистеиновой протеиназы тритикаина-α из пшеницы, а также оценки влияния на эту специфичность структуры и значения pH. Выбранная тема исследования актуальна в связи с перспективностью применения тритикаина-α для энзиматической терапии непереносимости глютена. Также изучение структуры и специфичности папаин-подобных цистеиновых протеиназ способствует поиску новых терапевтических применений растительных ферментов и разработке селективных ингибиторов для цистеиновых катепсинов человека, участвующих в процессах онкогенеза.

Диссертант поставила и выполнила задачи по подбору условий получения тритикаина-α, описанию его субстратной специфичности, определению пространственной структуры, идентификации аминокислотных остатков, взаимодействующих с субстратом, и определения влияния кислотности среды на специфичность фермента.

Диссертационная работа А.И. Петушковой включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, их обсуждение, заключение, список сокращений и обозначений, список цитируемой литературы из 294 наименований и три приложения. Работа изложена на 131 странице машинописного текста и хорошо иллюстрирована 28 рисунками и 6 таблицами.

Во введении А.И. Петушковой хорошо раскрыты актуальность и степень разработанности темы исследования. Поставлены цели и задачи, а также указаны объект и предмет исследования. Автор подробно описывает

научную новизну, теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, приводит краткое описание методологии и методов исследования и указывает личный вклад. Во введении также перечислены положения, выносимые на защиту, и конференции, на которых были апробированы результаты исследования.

В главе «Обзор литературы» А.И. Петушкова анализирует доступные сведения о структуре папаин-подобных цистеиновых протеиназ с особым вниманием к сайтам связывания в субстрат-связывающей борозде. В значительной степени разобраны разные способы регуляции активности протеиназ этого семейства. Также приведено подробное описание роли папаин-подобных протеиназ в медицине, с отдельным разделом, посвященным энзиматической терапии непереносимости глютена и тритикаину- α .

В главе «Материалы и методы» перечислены использованные в работе материалы, включая реактивы, олигонуклеотиды, пептиды, ферменты, антитела, плазмиды и штаммы, а также программное обеспечение. Подробно описан широкий спектр методов примененных для наработки и очистки всех использованных в работе форм тритикаина- α , измерения активности ферментов с использованием флуорогенных пептидов и пептидов, меченых фосфотирозином, характеристики структуры тритикаина- α методом рентгеноструктурного анализа, а также с применением программы на основе искусственного интеллекта. Стиль изложения не вызывает сомнений в личном применении А.И. Петушковой описанных методик, а также позволяет воспроизвести полученные результаты.

В шести разделах главы «Результаты» А.И. Петушкова описывает полученные в диссертационной работе данные. Первый раздел представляет собой важную часть исследования и посвящен подбору условий для продукции растворимого и активного тритикаина- α . Диссертантом были проведены попытки экспрессии набора генетических конструкций фермента

в различных условиях. В результате было показано, что для созревания активной формы фермента необходимо наличие продомена в одной полипептидной цепи с каталитическим доменом. В следующем разделе была описана субстратная специфичность фермента в кислой среде. Была определена селективность тритикаина- α к положительно-заряженным и полярным незаряженным аминокислотам в P_1 -положении и гидрофобным – в P_2 -положении субстрата. Несомненно значимым результатом диссертационного исследования является полученная впервые методом рентгеноструктурного анализа пространственная структура тритикаина- α с разрешением 3,46 Å. Структура соответствует известным структурам других папаин-подобных протеиназ. В четвертом разделе была применена передовая технология предсказания структур в программе AlphaFold2 Multimer для моделирования комплексов каталитического домена тритикаина- α с олигопептидами. В результате анализа полученных структур были охарактеризованы S_1 - и S_2 -сайты связывания на поверхности фермента, которые объясняют его субстратную специфичность. В S_2 -сайте связывания был обнаружен консервативный в семействе папаин-подобных цистеиновых протеиназ гидрофобный карман. При этом сайт S_1 фланкирован отрицательно-заряженными глутаматом 191 и аспартатом 289, которые, как было показано на смоделированных комплексах, могут взаимодействовать с аминокислотными остатками субстрата. В завершающем главу разделе диссертант прицельно изучила специфичность тритикаина- α к P_1 -положению субстрата, в результате показав ее зависимость от значения pH. С применением сайт-направленного мутагенеза была подтверждена важная роль глутамата 191 для специфичности фермента.

В главе «Обсуждение» А.И. Петушкова подробно обсуждает полученные результаты в контексте имеющихся литературных данных. Из этой главы логично вытекает «Заключение», в котором сформулированы пять

хорошо аргументированных выводов, соответствующих поставленным в работе задачам.

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах. Результаты диссертации также были доложены и прошли апробацию на 6 научных конференциях всероссийского и международного уровней, что подтверждает их достоверность. Не вызывает также сомнений научная новизна приведенных в работе данных о структуре и специфичности тритикаина- α . Полученные в работе результаты могут лечь в основу разработки препарата для терапии непереносимости глютена и целиакии. Также новые сведения о тритикаине- α могут быть экстраполированы на семейство папаин-подобных протеиназ, способствуя дальнейшим фундаментальным и прикладным изысканиям.

Автореферат полностью отражает суть диссертации и содержит соответствующие выводы.

Несмотря на высокий уровень проведенного диссертационного исследования, по работе есть несколько вопросов и замечаний:

1) В разделе 3.1 главы «Результаты» проводится сравнение активности тритикаина- α различной доменной организации, в результате которого обнаруживается, что фермент с меткой из шести гистидинов на N-конце обладает более высокой ферментативной активностью по сравнению с ферментом с меткой на C-конце. При этом не приводятся объяснений, чем могут быть обусловлены эти различия.

2) Как соотносятся полученные в работе данные о специфичности тритикаина- α к коротким (до 15 аминокислотных остатков) пептидам с его специфичностью к природным белковым субстратам?

3) Во «Введении» и «Обзоре литературы» акцентируется внимание на перспективности применения тритикаина- α в энзиматической терапии непереносимости глютена. Однако в «Обсуждении» и «Заключении»

отсутствуют рассуждения о том, как именно полученные в работе результаты могут способствовать разработкам препарата на основе исследованного фермента.

Вместе с тем, 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, 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 специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук,
главный научный сотрудник Лаборатории химии метаболических путей,
Отдел биомолекулярной химии,
ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Ямпольский Илья Викторович

Контактные данные:

тел.: +7(499)7248477, e-mail: yampolsky.office@gmail.com
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия (хим. науки)

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,

ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Отдел биомолекулярной химии,
Лаборатория химии метаболитических путей

Тел.: +7(499)7248477; e-mail: yampolsky.office@gmail.com

Подпись сотрудника ФГБУН ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

И.В. Ямпольского удостоверяю:

В.А. ОЛЕЙНИКОВ ДФМН

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИБХ РАН