

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Петушкова Анастасия Игоревна

**Структура и специфичность папаин-подобной цистеиновой протеиназы
тритикаина- α**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – *Замятнин Андрей Александрович – доктор биологических наук, доцент*
- 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*

Защита диссертации состоится «04» декабря 2025 г. в 17 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: msu.015.4.dissovet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3638>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Протеиназы – это группа ферментов, которые катализируют гидролиз пептидных связей в белках и пептидах, что приводит к их расщеплению до более коротких фрагментов и аминокислот. Долгое время считалось, что ферменты из семейства папаин-подобных цистеиновых протеиназ (ППЦП) выполняют свои функции только в кислой среде лизосомально-эндосомального компартмента и не отличаются высокой субстратной специфичностью. Однако в последнее время было обнаружено, что эти протеиназы выполняют специфические функции внутри различных органелл, а также вне клетки. Растительные ППЦП участвуют в расщеплении запасных белков во время прорастания семян, индукции защитных реакций, процессах старения и регулируемой гибели клеток. ППЦП животных, которые называются цистеиновыми катепсинами, вовлечены в дифференцировку клеток, активацию прогормонов, процессинг антигенов, аутофагию и апоптоз. Также цистеиновые катепсины способствуют метастазированию, ангиогенезу и химиорезистентности злокачественных опухолей. В связи с этим цистеиновые катепсины человека имеют диагностическое значение, а также являются перспективными мишенями для противоопухолевых препаратов. Растительные же ППЦП, наоборот, активно применяют при лечении ряда патологических состояний. Среди них обнаружены ферменты, которые обладают противоопухолевым, антибактериальным, противогрибковым действием, могут влиять на разные этапы свёртывания крови и пищеварения.

Эффективность распознавания субстратов и ингибиторов протеиназой зависит от структуры сайтов связывания в активном центре фермента. Кроме того, эта специфичность подвержена влиянию условий среды, таких как значение pH и наличие/отсутствие других молекул и ионов. Данные о структуре и субстратной специфичности ППЦП могут быть использованы для разработки селективных диагностических зондов, терапевтических ингибиторов, а также проектирования новых ферментов в медицинских целях.

Степень разработанности темы исследования. Активный центр протеиназы находится в субстрат-связывающей борозде, которая представляет собой углубление на поверхности молекулы. В этой борозде для ППЦП было описано пять относительно четко определенных сайтов связывания (Turk et al., 1998). Три аминокислотных остатка (а.о.; P₁, P₂ и P₃) субстрата,

расположенные на *N*-концевой стороне от расщепляемой пептидной связи, распознаются соответствующими сайтами S_1 , S_2 и S_3 фермента. Аналогично происходит взаимодействие с другой стороны от связи: а.о. в P_1' - и P_2' -положениях субстрата контактируют с S_1' - и S_2' -сайтами протеиназы, соответственно (Petushkova et al., 2022). В связи с избыточной активностью цистеиновых катепсинов человека в опухолевых тканях и необходимостью разработки селективных зондов и ингибиторов, их субстратная специфичность является наиболее изученной среди ферментов семейства ППЦП.

Многие ППЦП специфичны к основным а.о. в положении P_1 , что в катепсинах В и Z (CtsB и Z) объясняется наличием отрицательно заряженных а.о. в S_1 - и S_1' -сайтах связывания (Choe et al., 2006, Yoon et al., 2021, Guncar et al., 2000). Однако именно сайт S_2 считается основной детерминантой субстратной специфичности ППЦП, что учитывается при разработке зондов и ингибиторов (Turk et al., 2012). S_2 -сайт связывания в ППЦП обычно представляет собой гидрофобный карман, который селективен к гидрофобным а.о. в P_2 -положении (Choe et al., 2006, Richau et al., 2012). При этом некоторые протеиназы обладают уникальной субстратной специфичностью по этому сайту. Например, CtsK может связывать Pro в P_2 -положении, что определяет его способность расщеплять интактные тройные спирали коллагена (Lecaille et al., 2020). Карбоксипептидазы CtsB и Z, а также круципаин из трипаномы *Trypanosoma cruzi*, в отличие от других ППЦП, содержат отрицательно заряженные а.о. в S_2 -сайте (Yoon et al., 2021, Guncar et al., 2000, Polticelli et al., 2005). Субстратная специфичность сайта связывания S_3 , согласно имеющимся данным, очень низкая (Choe et al., 2006). Другая сторона субстрат-связывающей борозды содержит консервативные остатки Trp, которые могут участвовать в гидрофобных и стэкинг-взаимодействиях (Petushkova et al., 2022). Однако CtsB, L и V также могут связывать полярные а.о. в сайте S_1' (Tomoo, 2010, Puzer et al., 2004). Сайт связывания S_2' в эндопептидазах является гидрофобным, в то время как карбоксипептидазы CtsB и Z содержат в нём положительно заряженные остатки His для взаимодействий с C-концом субстрата (Tomoo, 2010, Guncar et al., 2000).

Субстратная специфичность и структура растительных ППЦП менее изучены по сравнению с катепсинами человека. Тем не менее множество растительных протеиназ, таких как папаин из папайи *Carica papaya*, бромелаин из ананаса *Ananas comosus* и фицин из фикуса *Ficus insipida*, широко используются в медицине: для лечения онкозаболеваний, расстройств

пищеварения и вирусных заболеваний (Balakireva et al., 2019, Murray et al., 2022). Они входят в состав стоматологических средств и препаратов для лечения ран и ожогов (Rosenberg et al., 2014, Bertassoni et al., 2009). Последние несколько лет проводятся исследования ППЦП, обладающих глютеназной активностью, с целью оценить перспективы их применения в терапии непереносимости глютена и целиакии (Machado, 2023). Одним из таких ферментов является охарактеризованная ранее глютенеза тритикаина- α из пшеницы *Triticum aestivum* (Savvateeva et al., 2015).

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является описание субстратной специфичности ППЦП тритикаина- α из пшеницы *T. aestivum* с идентификацией структурных детерминант этой специфичности. Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) Установить необходимые условия экспрессии для получения растворимого активного тритикаина- α .
- 2) Охарактеризовать субстратную специфичность тритикаина- α .
- 3) Определить третичную структуру тритикаина- α методом рентгеноструктурного анализа для выявления сайтов связывания в субстрат-связывающей борозде фермента.
- 4) Сравнить структуру сайтов связывания тритикаина- α и других ППЦП.
- 5) Определить влияние значения pH на субстратную специфичность тритикаина- α .

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являлась ППЦП тритикаина- α из пшеницы *T. aestivum*. Предметом исследования были определение и характеристика структуры и субстратной специфичности этой рекомбинантной протеиназы.

Научная новизна исследования. В представленной работе была впервые описана субстратная специфичность ППЦП пшеницы тритикаина- α с использованием пептидных субстратов и была впервые получена третичная структура данного фермента. Были идентифицированы а.о., формирующие гидрофобный карман в S₂-сайте связывания, а также отрицательно заряженные а.о. в S₁-сайте связывания тритикаина- α , которые могут образовывать водородные и электростатические связи с а.о. в Р₁-положении субстрата. В данной работе была впервые проведена сравнительная характеристика первичных структур тритикаина- α с другими ППЦП в S₁- и S₂-сайтах связывания, а также сравнение распределения зарядов в субстрат-связывающей борозде растительных ППЦП. Также была показана

зависимость субстратной специфичности тритикаина- α от значений pH в отношении пептидов с различными а.о. в P₁-положении.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о субстратной специфичности ППЦП: какие а.о. в активном центре фермента могут на нее влиять и как она зависит от значения pH. Впервые получена третичная структура ППЦП тритикаина- α методом рентгеноструктурного анализа, а также проведена характеристика субстратной специфичности этой протеиназы. Полученные данные могут быть экстраполированы на другие ферменты семейства ППЦП.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные данные и их анализ могут быть использованы для дизайна селективных ингибиторов и зондов ППЦП, которые могут найти применение в медицине. Также полученные данные могут использоваться для редизайна протеиназ с целью скорректировать их субстратную специфичность для нужд различных сфер промышленности и медицины.

Методология и методы исследования. В работе использовали молекулярно-биологические, биохимические, микробиологические, биофизические и биоинформатические методы исследования.

Наработка генов тритикаина- α из пшеницы (*T. aestivum*) проводилась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Сайт-направленный мутагенез использовали для внесения точечных мутаций в ген тритикаина- α . Полученные фрагменты дезоксирибонуклеиновых кислот были помещены в экспрессионные векторы с помощью методов молекулярного клонирования. Клетки кишечной палочки *Escherichia coli* были трансформированы полученными плазмидами и затем использованы для продукции целевых белков. Исследуемые ферменты были очищены из бактериальных лизатов при помощи хроматографических методов. Для скрининга субстратной специфичности тритикаина- α использовали библиотеку пептидов, меченных фосфотирозином (pTyr). Измерение каталитической активности исследуемых форм фермента производили с использованием пептидных субстратов, слитых с флуорогенной меткой 7-амино-4-метилкумарин (АМС). Для анализа полученных данных применили модель ферментативной кинетики, описываемую уравнением Михаэлиса-Ментен.

Структура неактивного тритикаина- α была получена методом рентгеноструктурного анализа с использованием источника синхротронного излучения Diamond Light Source, Чилтон, Великобритания. Собранные данные дифракции были обработаны в программе AutoPROC и затем использованы для получения структуры фермента методом молекулярного замещения в программе PHENIX. Кристаллическая структура фермента далее была использована для предсказания возможных расположений пептидов в комплексе с тритикаином- α в программе AlphaFold. Для сопоставления соответствующих участков аминокислотных последовательностей, которые формируют S_1 - и S_2 -сайты связывания в различных ППЦП, было использовано множественное выравнивание в программе AliView. Распределения зарядов на поверхности растительных ППЦП были рассчитаны с использованием уравнения Пуассона-Больцмана в программе ProKSim.

Положения, выносимые на защиту.

- 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 pH среды.

Степень достоверности и апробация результатов. Диссертационная работа была выполнена с использованием современных методов исследования, соответствующих поставленным целям и задачам. Достоверность приведённых результатов подтверждается их воспроизводимостью при проведении нескольких независимых экспериментов, а также статистической обработкой полученных результатов.

По материалам диссертации было опубликовано шесть статей в рецензируемых научных журналах. Материалы диссертации были представлены и обсуждались на шести конференциях в виде устных и постерных докладов: International Conference "Toolkits for DNA vaccine design,

an update" (Москва, Россия, 2016), Sechenov International Biomedical Summit 2017 (Москва, Россия, 2017), Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Москва, Россия, 2017), 45th FEBS Congress (онлайн, 2021), III Объединенный Научный Форум Физиологов, Биохимиков и Молекулярных Биологов (Сочи, Россия, 2022), The 2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges (онлайн, 2022).

Личный вклад автора. Диссертационная работа написана на основе собственных данных, полученных автором и соавторами с 2016 по 2024 год. Автор работы проводила анализ литературных данных; клонирование генов исследованных белков, их наработку и очистку; измерение ферментативной активности тритикаина- α и его мутантов с последующим анализом полученных данных; подбор условий кристаллизации тритикаина- α и интерпретацию полученной методами рентгеноструктурного анализа и молекулярного замещения электронной плотности с решением модели структуры фермента; анализ предсказанных структур комплексов тритикаина- α с пептидами; выравнивание аминокислотных последовательностей ППЦП; вычисление распределения зарядов на поверхности тритикаина- α и других растительных ППЦП. Соискатель внесла существенный вклад в публикации по теме диссертации и принимала непосредственное участие в их написании, а также представляла результаты исследования на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 131 странице машинописного текста, включает 28 рисунков и 6 таблиц, и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, список сокращений и обозначений, список литературы из 294 наименований, приложение А, приложение Б и приложение В.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Продукция каталитического домена в одной полипептидной цепи с продоменом необходима для формирования активного тритикаина- α

Для исследования субстратной специфичности тритикаина- α из *T. aestivum* прежде всего необходимо было получить фермент в активной форме. Полноразмерный ген тритикаина- α состоит из каталитического домена, в котором расположен активный центр фермента, *N*-концевых сигнального пептида и аутоингибирующего продомена и *C*-концевого гранулин-подобного домена (Рис. 1; Kiyosaki et al., 2009).

Так как для продукции в клетках *E. coli* предпочтительными являются низкомолекулярные белки (Baneux et al., 2004), сначала была получена генетическая конструкция, содержащая только ген каталитического домена тритикаина- α (6HIS-Triticain- α -CatD; Рис. 1). Продукт экспрессии был обнаружен только в тельцах включения, что потребовало проведения денатурации с последующим рефолдингом. Однако полученный белок не проявлял активности в отношении флуорогенного пептидного субстрата *Ac*-PLVQ-*AMC* (*Ac* – ацетил; Рис. 2). Результаты указывают на то, что для созревания активной формы тритикаина- α недостаточно полипептида, содержащего только каталитический домен фермента. Поэтому далее, на основе данных, что продомен может функционировать как шаперон (Yamamoto et al., 1999, Paireder et al., 2016), была сделана генетическая конструкция, содержащая ген продомена тритикаина- α (6HIS-Triticain- α -ProD; Рис. 1). Хотя продомен частично продуцировался в растворимой форме, его коэкспрессия с 6HIS-Triticain- α -CatD не привела к увеличению растворимости или активности протеиназы. Было выдвинуто предположение, что для правильного фолдинга тритикаина- α необходима коэкспрессия генов продомена и каталитического домена в форме единого полипептида (6HIS-Triticain- α -GM; Рис. 1). Экспрессия этой конструкции также происходила с накоплением белка в тельцах включения, однако после рефолдинга полученный белок проявлял активность, сопоставимую с активностью папаина из *S. papaya*, взятого в качестве контрольной ППЦП (Рис. 2).

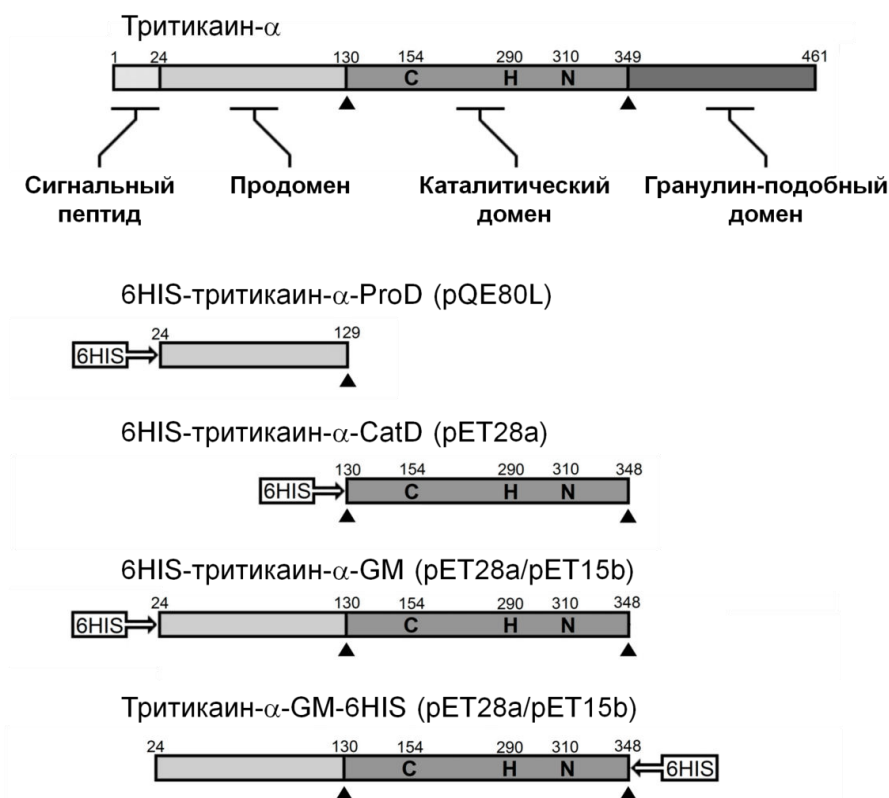


Рисунок 1 – Схема первичной структуры тритикаина-α. Стрелки указывают границы каталитического домена, буквами подписаны а.о. каталитической триады. Ниже перечислены формы фермента, полученные в данном исследовании (Gorokhovets et al., 2017).

В ходе дальнейших усилий по улучшению растворимости тритикаина-α-GM было проверено влияние локализации аффинной метки 6HIS (Correa et al., 2015). Для этого получили две конструкции: 6HIS-Triticain-α-GM и Triticain-α-GM-6HIS (Рис. 1). Оба варианта экспрессировались в клетках *E. coli* BL21 (DE3) исключительно в нерастворимой форме. Однако уровень экспрессии и активность продукта 6HIS-Triticain-α-GM были значительно выше по сравнению с Triticain-α-GM-6HIS (Рис. 2). Добиться экспрессии Triticain-α-GM в растворимой форме удалось заменой штамма *E. coli* BL21 (DE3) на Rosetta gami B (DE3). Преимущество этого штамма заключается в том, что он содержит мутации, способствующие образованию дисульфидных связей в белках (Novines et al., 2012). Кроме того, экспрессия в Rosetta gami B (DE3) может проводиться при 18°C, что также увеличило растворимость тритикаина-α. Полученные в результате ферменты, экспрессировавшиеся в растворимой форме, обладали более высокой ферментативной активностью по сравнению с теми, что экспрессировались в тельца включения (Рис. 2).

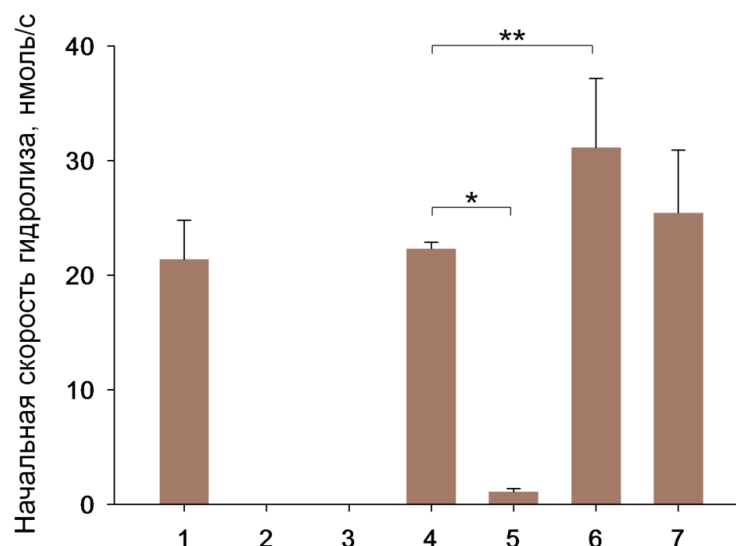


Рисунок 2 – Эффективность расщепления субстрата *Ac*-PLVQ-AMC папаином (1) и тритикаином- α различной доменной организации: 6HIS-тритикаин- α -ProD (2), 6HIS-тритикаин- α -CatD (3), 6HIS-тритикаин- α -GM и тритикаин- α -GM-6HIS из телец включения (4 и 5, соответственно) и из растворимой фракции (6 и 7, соответственно). Статистическая значимость рассчитывалась согласно t-критерию Стьюдента (* $p < 0,0001$; ** $p < 0,1$).

Таким образом, среди изученных условий оптимальным методом получения каталитически активного фермента оказалась продукция в растворимой форме двухдоменного 6HIS-тритикаина- α -GM в бактериальном штамме Rosetta gami B (DE3) при 18°C.

2. Тритикаин- α специфичен к субстратам с гидрофобными и положительно заряженными аминокислотными остатками в P₂- и P₁-положениях

После получения активной формы тритикаина- α были проведены исследования субстратной специфичности протеиназы. Для этого в первую очередь был выполнен скрининг активности тритикаина- α в кислой среде в отношении библиотеки из 3525 пептидов длиной 8 или 15 а.о., меченных pTyr. В результате фермент гидролизировал 225 пептидов, из которых эффективнее всего расщеплялся QLLRVGCV (Рис. 3). Масс-спектрометрический анализ показал, что гидролиз происходил преимущественно после Arg (QLLR↓VGCV). Основываясь на полученных данных, для дальнейших исследований были синтезированы флуорогенные пептиды *Ac*-QLLR-AMC и *Ac*-QLLK-AMC. Также, с учётом продуктов расщепления тритикаином- α глютена пшеницы *T. aestivum* (Savvateeva et al., 2015), были синтезированы *Ac*-PLVQ-AMC и *Ac*-VLPQ-AMC. К перечисленным пептидам были добавлены субстраты других цистеиновых протеиназ: CtsS человека – *Ac*-FVR-AMC, каспазы 3 – *Ac*-DEVD-AMC и

метакаспаз типа II – *Ac-FESR-AMC* (Vasiljeva et al., 2005, Яковлев и др., 2008, Bozhkov et al., 2005).

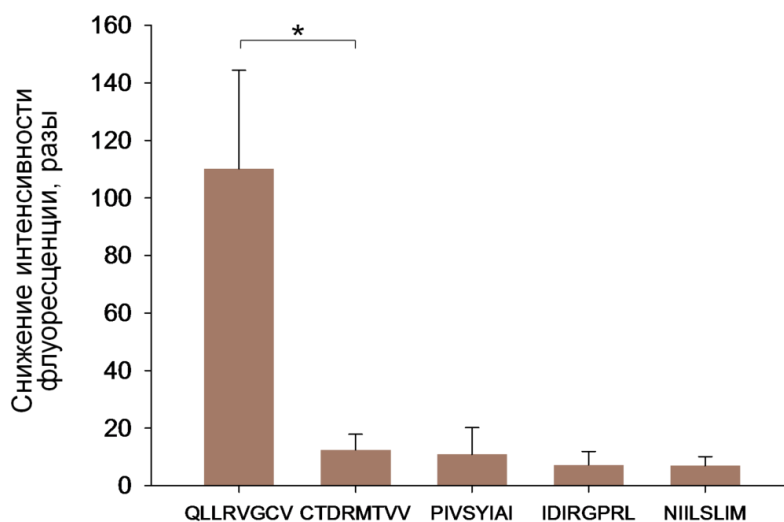


Рисунок 3 – Пять пептидов с самой высокой эффективностью расщепления тритикаином- α из библиотеки, включающей 3525 проверенных в ходе скрининга пептидов. Статистическая значимость рассчитывалась согласно t-критерию Стьюдента (* $p < 0,1$).

Результаты измерения активности тритикаина- α с перечисленными пептидами при pH 4,6 представлены на Рис. 4. Наилучшими субстратами для фермента оказались *Ac-QLLR-AMC* и *Ac-QLLK-AMC*, которые содержат положительно заряженный а.о. в P_1 -положении. Похожий на них субстрат *Z-FVR-AMC* гидролизует тритикаином- α хуже, что может быть вызвано более короткой длиной этого пептида. *Ac-PLVQ-AMC* был третьим по эффективности расщепления тритикаином- α . Интересно, что этот субстрат протеиназа гидролизовала в 20 раз лучше, чем похожий на него *Ac-VLPQ-AMC*. Вероятно, Pro в P_2 -положении ограничивает конформационную подвижность этого пептида. *Ac-DEVD-AMC* с отрицательно заряженным а.о. в P_1 -положении расщеплялся тритикаином- α с самой низкой эффективностью. Субстрат *Ac-FESR-AMC*, который единственный содержит гидрофильный а.о. в P_2 -положении, оказался устойчив к гидролизу тритикаином- α . Это соответствует известным данным о выраженной специфичности большинства ППЦП к гидрофобному а.о. в P_2 -положении субстрата (Petushkova et al., 2022).

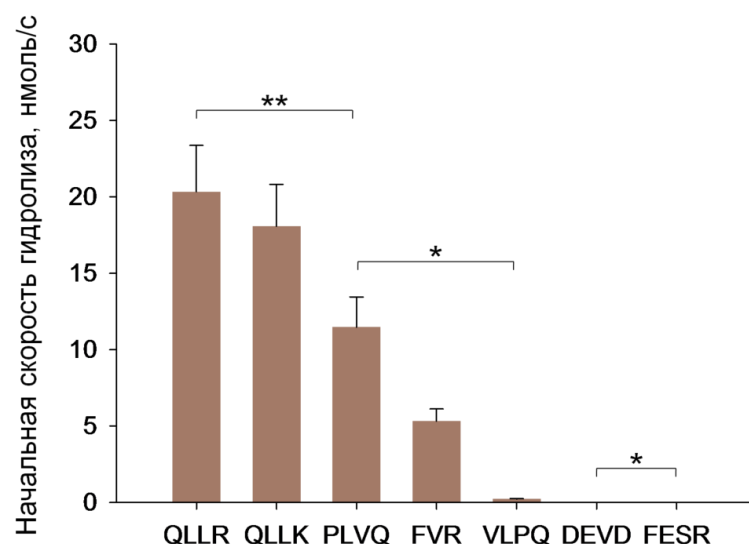


Рисунок 4 – Эффективность расщепления тритикаином- α флуорогенных пептидных субстратов. Статистическая значимость рассчитывалась согласно t-критерию Стьюдента (* $p < 0,001$; ** $p < 0,05$).

Полученные данные указывают на то, что в кислой среде тритикаин- α специфичен к субстратам с гидрофобным а.о. в P_2 - и с положительно заряженным а.о. в P_1 -положении.

3. Третичная структура тритикаина- α , полученная с помощью метода рентгеноструктурного анализа

Для выявления структурных особенностей тритикаина- α , определяющих его субстратную специфичность, было решено получить третичную структуру фермента для последующего анализа. Структуру протеиназы определяли методом рентгеноструктурного анализа с использованием мутанта по каталитическому Cys154 – 6HIS-тритикаина- α -GM^{C154A}. В результате несколько кристаллов выросли в течение 10 дней при 4°C в 100 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 4,6, с 3,5% полиэтиленгликолем 4000 и 15% глицерином. Полученные на источнике синхротронного излучения картины дифракции от белковых кристаллов были автоматически обработаны в программном пакете AutoPROC (Vonnrhein et al., 2011). Лучшее достигнутое разрешение составило 3,46 Å (Табл. 1). Структура по этим данным была построена методом молекулярного замещения в программе PHENIX (Liebschner et al., 2019). В качестве модели была использована предсказанная структура тритикаина- α , взятая из базы AlphaFold под идентификационным номером AF-Q0WVG8-F1 (Varadi et al., 2024).

Таблица 1 – Параметры собранных данных дифракции кристалла 6HIS-тритикаина- α -GM^{C154A} и полученной по ним структуры белка. В скобках указаны параметры для части данных с наилучшим разрешением.

Собранные данные	
Пространственная группа симметрии	P 65
Параметры ячейки: a, b, c (Å) α, β, γ (°)	126,69, 126,69, 42,36 90, 90, 120
Разрешение (Å)	109,72-3,46 (3,79-3,46)
R_{merge}	0,059 (0,540)
$I / \sigma(I)$	9,4 (1,4)
Полнота данных (%)	78,6 (29,5)
Избыточность	1,9 (1,8)

Полученная структура	
Разрешение (Å)	109,7-3,46 (3,96-3,46)
Количество отражений	4178 (706)
R / R_{free}	0,9410 (1,0021)
Число атомов:	2548
Белка	2548
Лиганда/ионов	0
Воды	0
B -фактор	164,0
Среднеквадратичное отклонение (RMSD):	
Длин связей (Å)	0,23
Углов (°)	0,48

Полученная в результате структура тритикаина- α -GM^{C154A} подходит под электронную плотность с параметрами $R = 0,246$ и $R_{\text{free}} = 0,267$. Итоговая структура фермента характерна для ППЦП (Рис. 5). N -конец продомена состоит из трёх α -спиралей, а C -концевой участок закрывает субстрат-связывающую борозду, не формируя вторичных структур. Каталитический домен состоит из двух структурных доменов: N -концевого L-домена, сформированного четырьмя α -спиралями и одним антипараллельным β -листом, и C -концевого R-домена, в состав которого входят два антипараллельных β -листа и три короткие α -спирали. Между этими структурными доменами расположена V-образная субстрат-связывающая борозда. Она сформирована самой длинной α -спиралью L-домена, на N -конце которой расположен Ala154 (вместо каталитического Cys154), и крупным β -листом из четырёх цепей, в котором располагаются каталитические His290 и Asn310 (Рис. 5). Всего в структуру тритикаина- α -GM^{C154A} входит 325 а.о., из которых 306 (95%) находятся в предпочтительных конформациях, а 14 (4%) – в разрешенных.

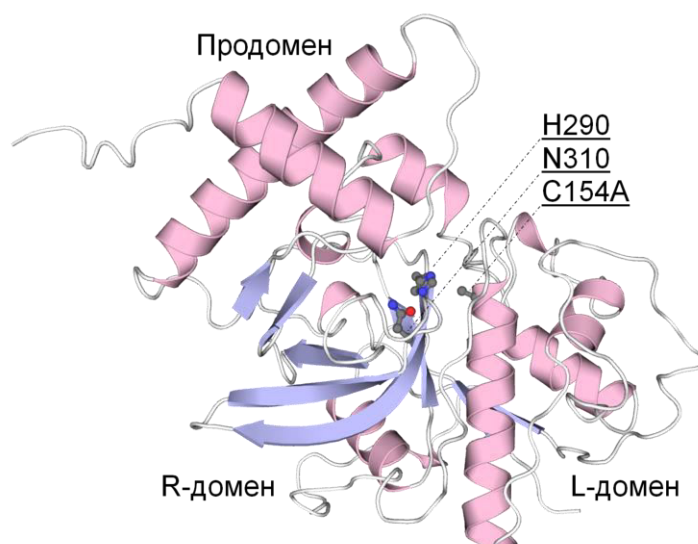


Рисунок 5 – Полученная методом рентгеноструктурного анализа структура 6HIS-тритикаина- α -GM^{C154A} (PDB ID: 8ZLQ). Цветом выделены участки полипептида с разной вторичной структурой. Подписаны структурные домены фермента и а.о., составляющие каталитическую триаду.

Полученная структура тритикаина- α соответствует структуре цистеиновых протеиназ (d.3) согласно базе данных SCOPe (Fox et al., 2014) и может использоваться для дальнейших исследований структурных особенностей, определяющих субстратную специфичность ППЦП.

4. Субстрат-связывающая борозда тритикаина- α содержит гидрофобный карман и отрицательно заряженные аминокислотные остатки

Полученная кристаллическая структура тритикаина- α была далее использована для моделирования структур комплексов с олигопептидами. Для этого использовали аминокислотные последовательности каталитического домена фермента с интактным Cys154 и пептидов QLLR↓VG, QLLK↓VG, PLVQ↓VG, FVR↓VG, VLPQ↓VG, DEVD↓VG и FESR↓VG (стрелкой указано ожидаемое место гидролиза). Предсказание структур проводилось в программе AlphaFold (Jumper et al., 2021, Mirdita et al., 2022), в которой для каждого пептида было получено по 40 моделей взаимодействия. Модели сравнили между собой по расстоянию между атомом серы Cys154 фермента и атакуемым им карбонильным атомом углерода а.о. в P₁-положении пептида (Рис. 6А).

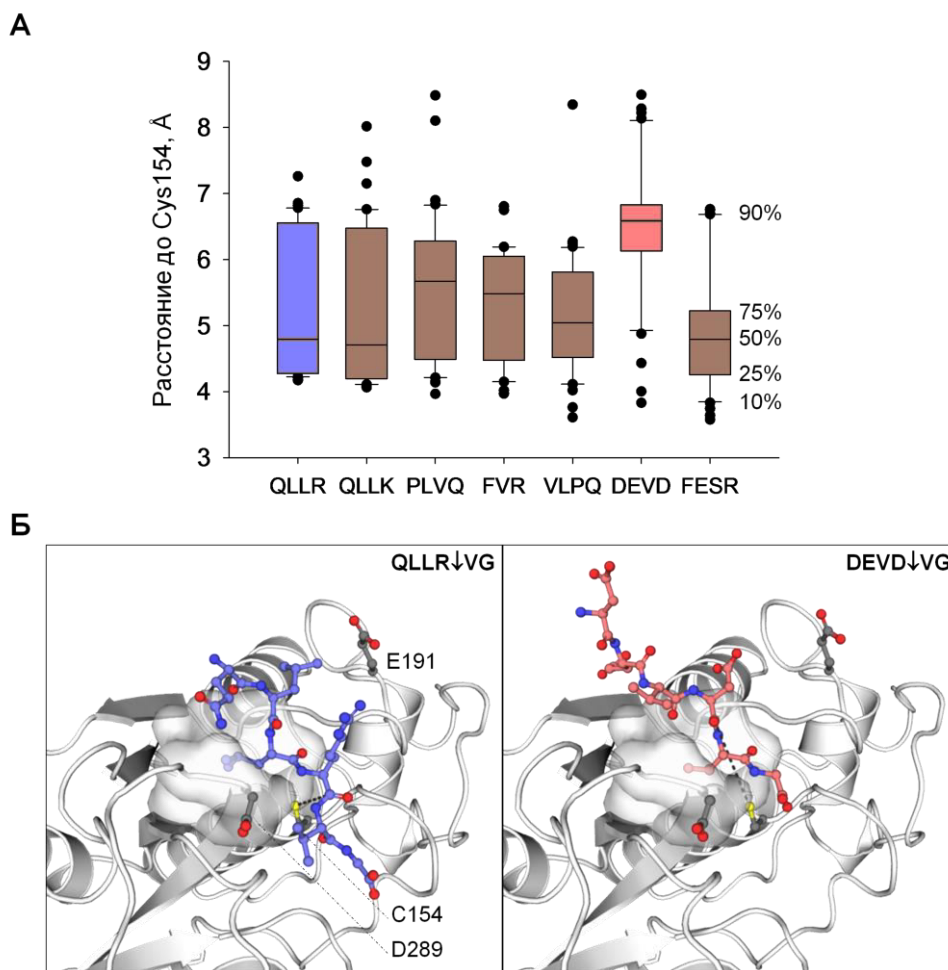


Рисунок 6 – Сравнение предсказанных моделей комплексов олигопептидов, связанных с каталитическим доменом трипсина- α . А – Расстояния между карбонильным атомом углерода а.о. в P_1 -положении пептида и атомом серы Cys154 фермента в полученных моделях. Здесь и далее на оси ОХ подписаны только а.о. в P_4 - P_1 -положениях пептидов, а справа указаны процентиля на примере данных для FESRVG. Б – Лучшие модели комплексов трипсина- α с QLLRVG и DEVDRVG согласно AlphaFold. Гидрофобный карман в S_2 -сайте представлен в виде поверхности. Каталитический Cys154, Glu191 и Asp289 в сайте связывания S_1 фермента выделены и подписаны. Жирной штриховой линией указано расстояние, по которому модели сравниваются на Рис. 6А.

Все пептиды располагались в субстрат-связывающей борозде трипсина- α . Интересно, что в полученных комплексах положительно заряженный а.о. в P_1 -положении QLLR↓VG, QLLK↓VG и FESR↓VG связывался ближе к Cys154 чаще, чем а.о. в P_1 других пептидов (Рис. 6А). При этом в лучших моделях комплексов (согласно ранжированию AlphaFold) пептиды QLLR↓VG и QLLK↓VG располагались схожим образом, при котором а.о. в P_2 -положении пептида был локализован в гидрофобном кармане в S_2 -сайте связывания фермента (Рис. 6Б). Однако в лучшей структуре комплекса трипсина- α с FESR↓VG цепь пептида была развёрнута в субстрат-связывающей борозде (GVR↓SEF) по сравнению с ожидаемым ее положением. При

этом Arg в P₁ располагался в сайте связывания S₁, благодаря чему атакуемый атом углерода всё равно находился рядом с серой Cys154 (Рис. 6А). Наоборот, в DEVD↓VG отрицательно заряженный Asp в P₁-положении редко располагался достаточно близко к Cys154 для нуклеофильной атаки (Рис. 6А). В частности, в его лучшей структуре в сайте S₁ находился Gly, что соответствует месту расщепления DEV↓VG (Рис. 6Б). Эти структуры подтверждают ранее полученные данные о наличии специфичности тритикаина-α к положительно заряженным по сравнению с отрицательно заряженными а.о. в P₁-положении субстрата.

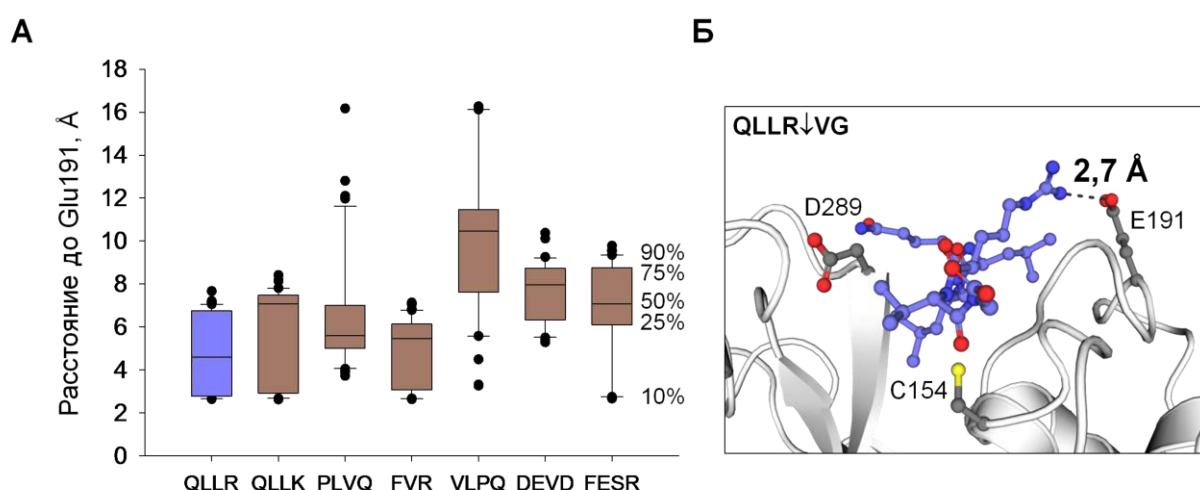


Рисунок 7 – Сравнение предсказанных моделей комплексов олигопептидов, связанных с каталитическим доменом тритикаина-α. А – Расстояния между боковыми группами а.о. в P₁-положении пептида и Glu191 фермента в полученных моделях. Б – Модель комплекса тритикаина-α с QLLRVG, в которой Arg в P₁ может взаимодействовать с Glu191. Штриховой линией указано расстояние, по которому модели сравниваются на Рис. 7А.

При дальнейшем анализе было обнаружено, что S₁-сайт связывания тритикаина-α фланкирован отрицательно заряженными Glu191 и Asp289. Чтобы оценить вероятность их взаимодействий с субстратом, были измерены расстояния между боковыми группами а.о. в P₁-положении пептидов и Glu191 или Asp289 фермента (Рис. 7А и 8А). Только среди структур комплексов с QLLR↓VG, QLLK↓VG и FVR↓VG были модели, в которых расстояние между а.о. в P₁ и Glu191 было меньше 3 Å, что необходимо для формирования водородной связи (Harris et al., 1999), и при этом расстояние между атакуемым атомом углерода и атомом серы Cys154 не превышало 5 Å (Рис. 7Б). Наоборот, во всех комплексах с DEVD↓VG расстояние от боковой группы а.о. в P₁ до Glu191 или Asp289 было больше 5 Å (Рис. 7А и 8А). В сторону Asp289 были направлены только Gln в P₁-положении VLPQ↓VG и PLVQ↓VG (Рис. 8Б). Вероятно, этот а.о.

менее важен для распознавания заряженных а.о. в P₁-положении, но может участвовать в водородных связях.

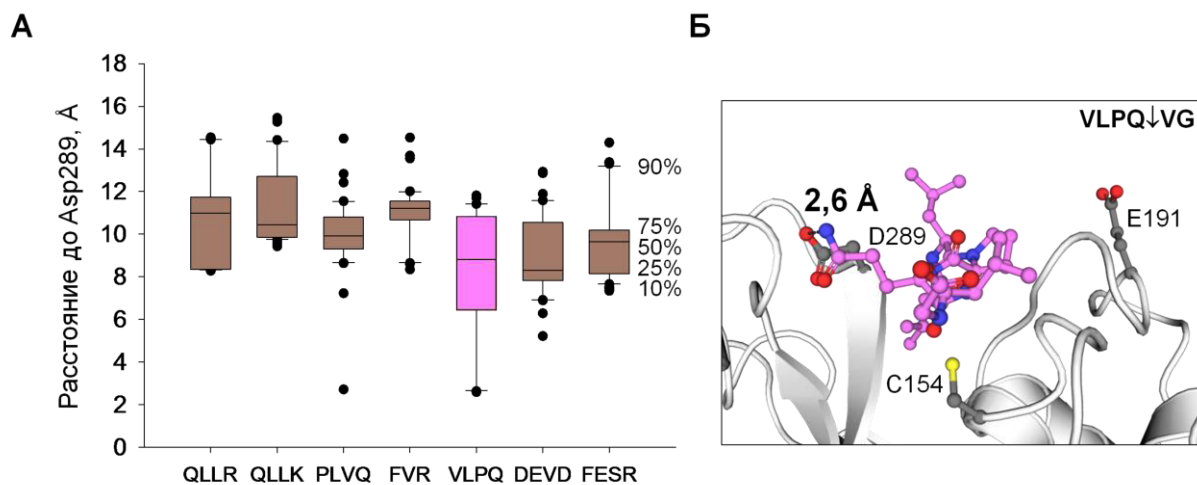


Рисунок 8 – Сравнение предсказанных моделей комплексов олигопептидов, связанных с каталитическим доменом тритикаина- α . А – Расстояния между боковыми группами а.о. в P₁-положении пептида и Asp289 фермента в полученных моделях. Б – Модель комплекса тритикаина- α с VLPQVG, в которой Gln в P₁ может взаимодействовать с Asp289. Штриховой линией указано расстояние, по которому модели сравниваются на Рис. 8А.

Специфичность тритикаина- α к гидрофобным а.о. в P₂-положении субстрата может определяться наличием гидрофобного кармана в S₂-сайте связывания (Рис. 9). Он сформирован гидрофобными Trp155, Gly196, Leu197, Met198, Ala264, Ile265, Leu288 и Gly291. Примечательно, что на границе S₂-сайта связывания расположен Glu340 (Рис. 9). Учитывая его pK_a = 4,72, можно предположить, что при нейтральных pH он может участвовать в электростатических взаимодействиях.

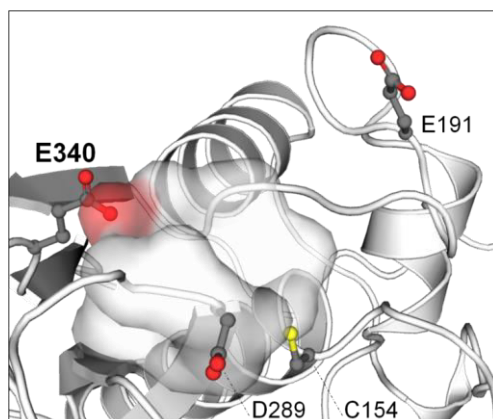


Рисунок 9 – S₂-сайт в субстрат-связывающей борозде тритикаина- α . Гидрофобный карман и Glu340 изображены в виде полупрозрачной поверхности. Каталитический Cys154, Glu191 и Asp289 в S₁- и Glu340 в S₂-сайтах связывания выделены и подписаны.

Основываясь на полученных данных можно сделать вывод, что наблюдаемая в кислой среде специфичность тритикаина- α к пептидным субстратам с гидрофобным а.о. в P_2 -положении определяется наличием гидрофобного кармана в S_2 -сайте связывания фермента. В то же время субстратная специфичность к положительно заряженным и незаряженным а.о. в положении P_1 может быть обусловлена наличием Glu191 и Asp289 в сайте S_1 .

5. Отрицательно заряженные остатки в S_1 - и S_2 -сайтах связывания тритикаина- α отличают фермент от других папаин-подобных протеиназ

Чтобы определить, насколько консервативны в семействе ППЦП а.о. в S_1 - и S_2 -сайтах связывания тритикаина- α , было проведено множественное выравнивание нескольких ферментов из семейства. Для этого использовали аминокислотные последовательности растительных ППЦП (папаина, химопапаина и карикаина из *C. papaya*, бромелаина стебля и ананаина из *A. comosus*, актинидина из *Actinidia chinensis*, вигнаина из *Vigna mungo*, зингипаина из *Zingiber officinale*, EP-B 2 из *Hordeum vulgare*), круципаина из *T. cruzi* и цистеиновых катепсинов из *Homo sapiens* (CtsB, C, F, H, K, L, O, S, V, W и Z).

	155	196	197	198	264	265	288	291	340		155	196	197	198	264	265	288	291	340																
Тритикаин-α	W	-	G	L	M	-	A	I	-	L	-	G	-	E							Катепсин В	W	-	G	Y	P	-	A	F	-	G	-	A	-	E
Папаин	W	-	G	Y	P	-	V	L	-	V	-	A	-	S							Катепсин С	Y	-	G	F	P	-	V	A	-	T	-	A	-	I
Химопапаин	W	-	G	Y	Q	-	L	V	-	L	-	A	-	S							Катепсин F	W	-	G	L	P	-	A	I	-	I	-	A	-	M
Карикаин	W	-	G	Y	P	-	V	V	-	V	-	A	-	S							Катепсин H	W	-	G	L	P	-	A	F	-	V	-	A	-	C
Бромелаин	W	-	G	W	E	-	A	V	-	L	-	A	-	D							Катепсин K	W	-	G	Y	M	-	A	I	-	L	-	A	-	L
Ананаин	W	-	G	W	I	-	A	L	-	L	-	A	-	D							Катепсин L	W	-	G	L	M	-	A	I	-	M	-	G	-	A
Актинидин	W	-	G	Y	I	-	A	L	-	I	-	A	-	M							Катепсин O	W	-	G	S	T	-	I	V	-	A	-	A	-	S
Вигнаин	W	-	G	L	M	-	A	I	-	L	-	G	-	M							Катепсин S	W	-	G	F	M	-	G	V	-	V	-	G	-	F
Зингипаин	W	-	G	W	M	-	T	M	-	A	-	A	-	F							Катепсин V	W	-	G	F	M	-	A	M	-	L	-	G	-	A
EP-B 2	W	-	G	L	M	-	A	V	-	L	-	G	-	E							Катепсин W	W	-	G	F	V	-	T	I	-	V	-	S	-	F
Круципаин	W	-	G	L	M	-	A	V	-	L	-	G	-	E							Катепсин Z	W	-	G	N	D	-	G	I	-	I	-	V	-	H

Рисунок 10 – А.о., составляющие S_2 -сайт связывания тритикаина- α , и соответствующие им а.о. в других ППЦП. Нумерация по тритикаину- α .

Большинство а.о. гидрофобного кармана в S_2 -сайте связывания довольно консервативны: Trp155, Gly196, Leu197, Ala264, Ile265, Leu288 и Gly291 заменены на гидрофобные или (реже) на полярные незаряженные а.о. в других протеиназах (Рис. 10). На их фоне выделяется вариабельный Glu340 тритикаина- α . Только EP-B 2, круципаин и CtsB также содержат Glu в этой позиции (Рис. 10). Считается, что этот а.о. отвечает за их особую субстратную специфичность к положительно заряженным а.о. в P_2 -положении (Polticelli et al., 2005, Yoon et

al., 2021). В протеиназах из *A. comosus* и *C. papaya*, CtsO и Z в этой позиции находятся полярные, а в остальных протеиназах – гидрофобные а.о. (Рис. 10). При этом у CtsK в этой позиции Leu323, который определяет его коллагеназную активность и субстратную специфичность к Pro в P₂-положении (Korenč et al., 2015). Таким образом, гидрофобный карман в S₂-сайте связывания ППЦП консервативен, однако различия в субстратной специфичности к P₂-положению могут определяться переменными а.о. на месте Glu340 тритикаина-α.

	191	289		191	289
Тритикаин-α	E	D	Катепсин B	D	G
Папаин	Y	D	Катепсин C	Q	N
Химопапаин	Y	D	Катепсин F	K	D
Карикаин	H	D	Катепсин H	H	N
Бромелаин	Y	N	Катепсин K	D	N
Ананасин	Y	N	Катепсин L	E	D
Актинидин	R	D	Катепсин O	Y	N
Вигнаин	Q	N	Катепсин S	K	N
Зингипаин	H	N	Катепсин V	Q	D
EP-B 2	D	D	Катепсин W	D	D
Круципаин	S	D	Катепсин Z	G	N

Рисунок 11 – А.о., фланкирующие S₁-сайт связывания тритикаина-α, и соответствующие им а.о. в других ППЦП. Нумерация по тритикаину-α.

Также было проведено сравнение а.о., фланкирующих S₁-сайт связывания ППЦП (Рис. 11). Asp289 довольно консервативен: протеиназы из *C. papaya*, актинидин, EP-B 2, круципаин, CtsF, L, V и W также содержат в этой позиции Asp, CtsB – Gly, а остальные протеиназы – полярный незаряженный Asn. Glu191 тритикаина-α, наоборот, переменен среди ППЦП: только в CtsL в этой позиции также находится Glu, а в EP-B 2, CtsB, K и W – Asp. Многие протеиназы содержат His или Tyr в этом положении; также встречаются Arg, Lys, Gln, Ser и Gly (Рис. 11). Хотя Glu191 переменен, за ним следует консервативный мотив GCxGG, а с N-конца – распространённый среди цистеиновых катепсинов Asn. Переменный а.о. на месте Glu191 тритикаина-α в S₁-сайте связывания ППЦП, возможно, определяет различия в их субстратной специфичности подобно Glu340 в S₂-сайте. В случае тритикаина-α отрицательно заряженные Glu191, Asp289 и Glu340, вероятно, влияют на селективность протеиназы, формируя отрицательно заряженную поверхность субстрат-связывающей борозды заметную при сравнении с другими растительными ППЦП (Рис. 12).

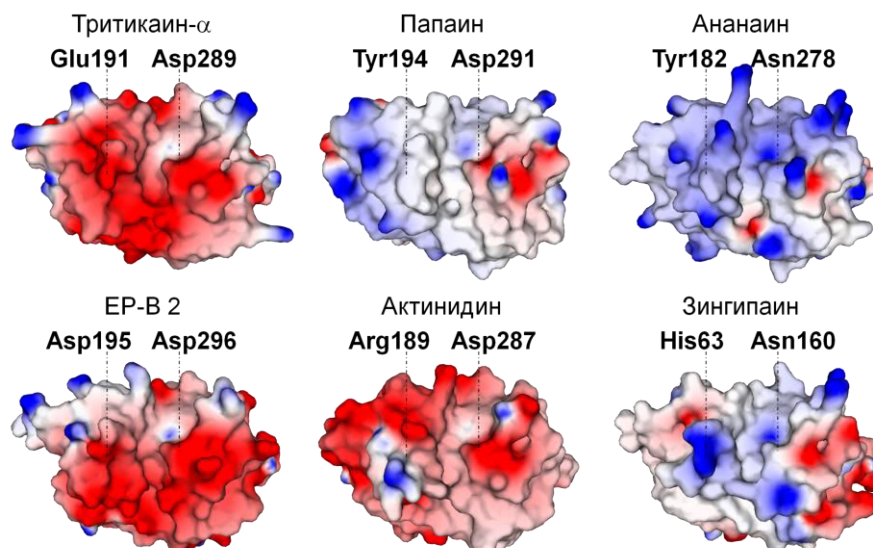


Рисунок 12 – Распределение зарядов на поверхности каталитических доменов тритикаина-α, EP-B 2, папаина, актинидина, ананаина и зингипаина при pH 4,6 (PDB ID: 2CIO, 6YCB, 2ACT, 1CQD и 2FO5, соответственно; Bethune et al., 2006, Alphey et al., 2006, Baker et al., 1980, Azarkan et al., 2020, Choi et al., 1999). Поверхность белка окрашена в зависимости от величины электростатического потенциала от -100 мВ (красный) до +100 мВ (синий). Указаны а.о., которые фланкируют S₁-сайт связывания.

6. Специфичность тритикаина-α к P₁-положению субстрата зависит от значения pH среды и наличия Glu191 в S₁-сайте

Glu191 и Asp289 с pK_a, равными соответственно 4,57 и 3,09, могут быть протонированы и незаряжены или нести отрицательный заряд в зависимости от значения pH. В связи с этим было решено определить, как значение pH влияет на специфичность тритикаина-α к а.о. в P₁-положении субстрата. Для этого была измерена активность фермента в диапазоне pH от 3,6 до 7,5. В качестве субстратов использовались флуорогенные пептиды *Ac*-QLLR-AMC, *Ac*-QLLK-AMC, *Ac*-QLLQ-AMC и *Ac*-QLLD-AMC. Было обнаружено, что в то время как максимальная скорость расщепления субстратов *Ac*-QLLR-AMC, *Ac*-QLLK-AMC и *Ac*-QLLQ-AMC возрастает с повышением pH до 6,5, скорость гидролиза *Ac*-QLLD-AMC падает (Рис. 13). Более того, при pH 6,5 и 7,5 *Ac*-QLLD-AMC устойчив к расщеплению тритикаином-α. Вероятно, Glu191 и Asp289 депротонируются при повышении pH, приобретая отрицательный заряд и отталкивая Asp в P₁-положении *Ac*-QLLD-AMC.

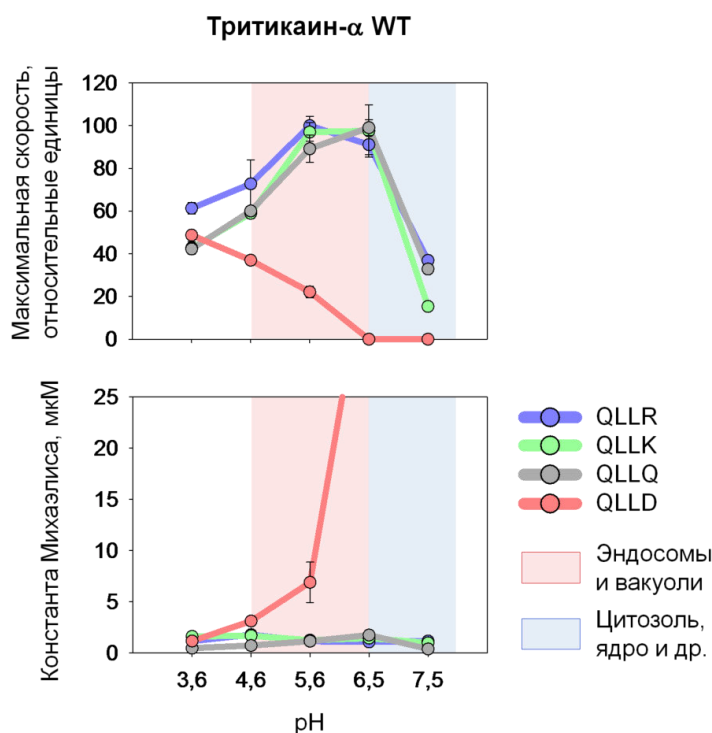


Рисунок 13 – Параметры каталитической активности тритикаина-α в реакциях гидролиза субстратов *Ac*-QLLR-AMC, *Ac*-QLLK-AMC, *Ac*-QLLQ-AMC и *Ac*-QLLD-AMC при значениях pH от 3,6 до 7,5. Каждое значение было получено на основе графиков зависимости активности фермента от концентрации субстрата. Значения констант Михаэлиса для реакций тритикаина-α с субстратом *Ac*-QLLD-AMC при pH 6,5 и 7,5 показаны как "стремящиеся к бесконечности" для наглядности.

Так как Glu191 оказался вариabельным (Рис. 11), было решено оценить его вклад в распознавание а.о. в P₁-положении субстрата. Для этого получили две мутантные формы тритикаина-α с заменой Glu191 либо на Asn, либо на Lys. Тенденция к увеличению максимальной скорости расщепления субстратов *Ac*-QLLR-AMC, *Ac*-QLLK-AMC и *Ac*-QLLQ-AMC с одновременным снижением скорости расщепления субстрата *Ac*-QLLD-AMC при повышении pH сохранилась для обоих мутантов (Рис. 14). Интересно, что оба мутанта были способны гидролизовать *Ac*-QLLD-AMC при pH 6,5. Причём самое низкое значение константы Михаэлиса реакции гидролиза *Ac*-QLLD-AMC при pH 6,5 было выявлено для мутанта с заменой Glu191Lys (Рис. 14). Вероятно, Lys191 в S₁-сайте связывания может образовывать ионные взаимодействия с Asp в P₁-положении субстрата. При этом константы Михаэлиса для реакций с остальными субстратами всё равно ниже, предположительно, из-за наличия интактного Asp289 в S₁-сайте связывания.

Полученные данные указывают на то, что специфичность тритикаина-α к субстратам с незаряженными и положительно заряженными а.о. в P₁-положении по сравнению с субстратами

с отрицательно заряженными а.о. становится более выраженной при повышении значений pH до нейтральных. Важный вклад в эту субстратную специфичность вносит Glu191 в S₁-сайте связывания фермента.

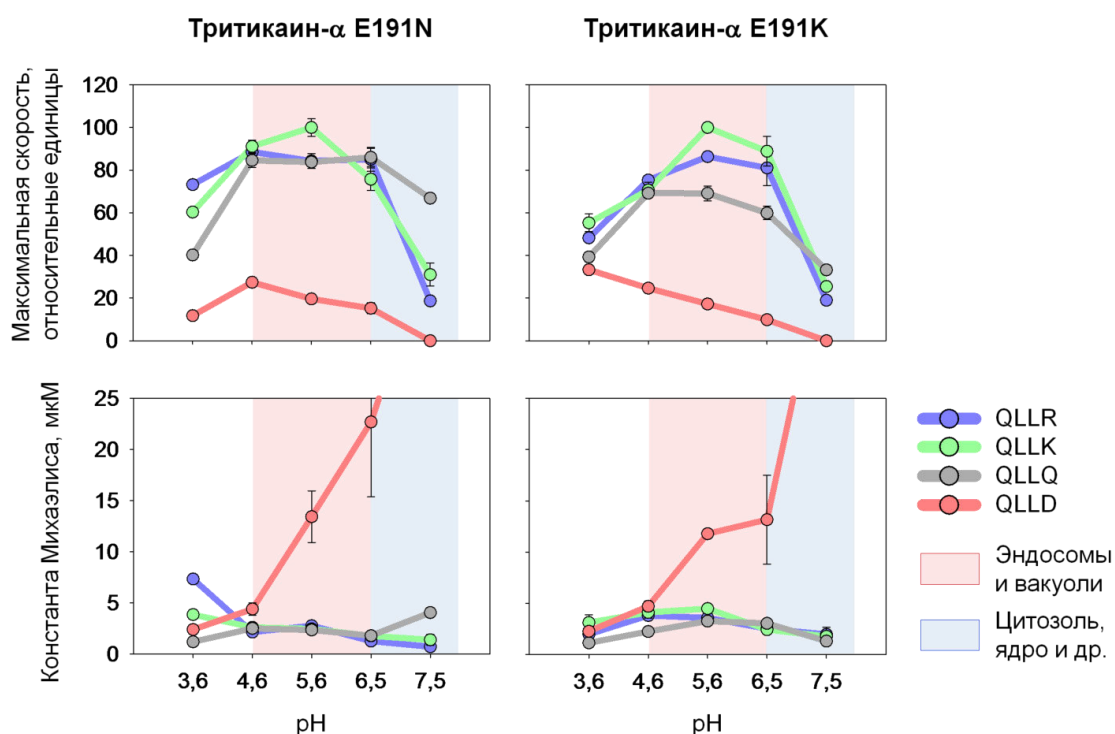


Рисунок 14 – Параметры каталитической активности мутантов тритикаина-α с заменами Glu191Asn и Glu191Lys в реакциях гидролиза субстратов *Ac*-QLLR-AMC, *Ac*-QLLK-AMC, *Ac*-QLLQ-AMC и *Ac*-QLLD-AMC при значениях pH от 3,6 до 7,5. Каждое значение было получено на основе графиков зависимости активности ферментов от концентрации субстрата. Значения констант Михаэлиса для реакций протеиназ с субстратом *Ac*-QLLD-AMC при pH 7,5 показаны как "стремящиеся к бесконечности" для наглядности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы был разработан подход к получению активного растворимого тритикаина-α. Только продукция тритикаина-α, состоящего из продомена и каталитического домена в одной полипептидной цепи, приводила к получению активной протеиназы. Эти данные указывают на важную функцию внутримолекулярного шаперона, которую выполняет продомен фермента. Также растворимость и активность удалось повысить за счёт продукции фермента с N-концевым 6HIS при 18°C в штамме *E. coli* Rosetta gami B (DE3).

В данном исследовании было обнаружено, что в кислой среде тритикаин-α проявляет специфичность к субстратам с гидрофобным а.о. в P₂- и с положительно заряженным а.о. в P₁-положении. Специфичность фермента к положительно заряженным а.о. в P₁-положении подтвердилась и при моделировании структур комплексов, где атакуемый атом углерода в

пептидах QLLR↓VG, QLLK↓VG и FESR↓VG чаще располагался рядом с каталитическим Cys154 в сравнении с остальными пептидами. Однако при измерении активности фермента, *Ac-FESR-AMC*, будучи единственным субстратом с полярным а.о. в P₂-положении, был устойчив к гидролизу.

В ходе данной работы впервые была получена третичная структура тритикаина-α методом рентгеноструктурного анализа. Структура протеиназы с разрешением 3,46 Å была размещена в базе белковых структур с PDB ID: 8ZLQ и может быть использована для дальнейшего изучения структурных особенностей, определяющих субстратную специфичность этого семейства протеиназ.

В предсказанных структурах комплексов тритикаина-α с пептидами был обнаружен консервативный гидрофобный карман в S₂-сайте фермента, характерный для ППЦП. При этом S₁-сайт тритикаина-α фланкирован отрицательно заряженными Glu191 и Asp289. Только боковая группа Gln в P₁-положении PLVQ↓VG и VLPQ↓VG была направлена в сторону Asp289. В то же время положительно заряженные а.о. в P₁-положении пептидов QLLR↓VG, QLLK↓VG и FVR↓VG зачастую были направлены в сторону Glu191. Glu191 и Asp289 в S₁-сайте и Glu340 в S₂-сайте формируют отрицательно заряженную поверхность субстрат-связывающей борозды тритикаина-α, которая отличает его от других ППЦП и может определять его специфичность.

Измерение активности тритикаина-α и его мутантов Glu191Asn и Glu191Lys в диапазоне pH от 3,6 до 7,5 показало, что специфичность тритикаина-α к P₁-положению субстрата зависит от значения pH. Активность всех ферментов в отношении субстрата с отрицательно заряженным Asp в P₁-положении (*Ac-QLLD-AMC*) снижалась на фоне повышения активности в отношении остальных субстратов (*Ac-QLLR-AMC*, *Ac-QLLK-AMC* и *Ac-QLLQ-AMC*) при повышении pH от 3,6 до 6,5. В отличие от дикого типа, оба мутанта тритикаина-α были способны гидролизовать *Ac-QLLD-AMC* при pH 6,5. Эти данные указывают на то, что при нейтральных значениях pH Glu191 фермента важен для специфичности тритикаина-α.

На основе полученных данных может быть разработан pH-зависимый ингибитор для стабилизации фермента в исследовательских и медицинских целях. Также эти данные могут быть экстраполированы на семейство ППЦП и использованы для описания структурных особенностей, определяющих их различия в специфичности в разных условиях среды и между собой. Полученные данные могут быть использованы для разработки диагностических зондов и

терапевтических ингибиторов для ППЦП, а также для поиска и дизайна новых протеиназ для применения в энзиматической терапии.

ВЫВОДЫ

1) Наличие продомена, ковалентно связанного с каталитическим доменом, у профермента тритикаина- α критически необходимо для созревания активного фермента.

2) Тритикаин- α предпочитает субстраты с положительно заряженными и полярными незаряженными аминокислотными остатками в P_1 -положении.

3) Определена кристаллическая структура тритикаина- α . Подобно другим папаин-подобным цистеиновым протеиназам, тритикаин- α имеет консервативный гидрофобный карман в S_2 -сайте связывания. Однако тритикаин- α отличается от большинства ферментов семейства наличие отрицательно заряженных Glu191 в S_1 -сайте и Glu340 в S_2 -сайте субстрат-связывающей борозды.

4) Субстратная специфичность тритикаина- α более выражена в нейтральных условиях, чем в кислых. В отличие от поведения в кислой среде, при нейтральных значениях pH протеиназа утрачивает способность гидролизовать субстраты, содержащие отрицательно заряженный аспартат в положении P_1 .

5) Результаты компьютерного моделирования комплексов фермент-субстрат и экспериментальные данные, полученные с использованием сайт-направленного мутагенеза протеиназы, свидетельствуют о том, что остатки Glu191 и Asp289 в S_1 -сайте тритикаина- α являются ключевыми детерминантами pH-зависимой субстратной специфичности фермента.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

- 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) **Петушкова 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).