

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 07.11.2024 № 16
о присуждении Юрченко Татьяне Сергеевне, гражданство Российская Федерация, ученой
степени кандидата химических наук

Диссертация «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология была принята к защите 30.08.2024 г. (протокол №15) диссертационным советом 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк, от 10.02.2014 № 55/нк, от 30.09.2015 г. №1166/нк, от 13.03.2019 г. №222/нк, от 03.06.2021 г. №561/нк и 22.03.2023 г. №501/нк.

Соискатель:

Юрченко Татьяна Сергеевна, 1994 года рождения, в 2018 году с отличием окончила Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени

М.В. Ломоносова» с присвоением квалификации (Химик, Преподаватель химии) по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» (Диплом специалиста ААК 2602582). С 2018 по 2022 гг. обучалась в очной аспирантуре на кафедре Химической энзимологии Химического факультета ФГБУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова. (Свидетельство об окончании аспирантуры АС 003163).

С 2023 года и по настоящее время Юрченко Т.С. работает в Отделе молекулярной диагностики Дирекции фармацевтического анализа Акционерного общества «Генериум» в должности младшего научного сотрудника 7 разряда.

Диссертационную работу соискатель Юрченко Т.С. выполняла в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Тишков Владимир Иванович, доктор химических наук (специальность – 02.00.15. Кинетика и катализ), профессор (специальность – 03.01.04. Биохимия), профессор Химического факультета ФГБУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова;

Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук (специальность – 03.01.04. Биохимия), заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты:

Марквичева Елена Арнольдовна, доктор химических наук (специальность 03.00.04 — Биохимия), главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»;

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук (специальности 1.5.7. Генетика и 1.5.11. Микробиология), профессор, заместитель руководителя Комплекса по научной работе (Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий) Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт".

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что **Марквичева Елена Арнольдовна** является одним из ведущих отечественных специалистов в области получения и исследования свойств новых систем доставки на основе наночастиц;

тем, что **Яненко Александр Степанович** является одним из ведущих отечественных специалистов в области изучения особенностей экспрессии генов в различных штаммах продуцентах, в частности, бактериях *Rhodococcus*;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Юрченко Татьяны Сергеевны.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) в своем отзыве, подписанном академиком РАН Кочетковым Сергеем Николаевичем и утвержденном ученым секретарем Коноваловой Е.В., указал, что диссертационная работа Юрченко Татьяны Сергеевны является законченной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Юрченко Татьяна Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в ФГБУН Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН активно ведутся исследования в области биохимии физиологически активных соединений. Таким образом, сотрудники ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Юрченко Татьяны Сергеевны.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы. Ведущая организация дала положительный отзыв на диссертационную работу Юрченко Татьяны Сергеевны.

Публикации:

Основные результаты диссертационной работы Юрченко Татьяны Сергеевны изложены в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Pometun A.A., Boyko K.M., Iurchenko T.S., Nikolaeva A.Yu, Atroshenko D.L., Savin S.S., Popov V.O., Tishkov V.I. Highly-Active Recombinant Formate Dehydrogenase from Pathogenic Bacterium *Staphylococcus aureus*: Preparation and Crystallization. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – V. 85. – № 6. – P. 689-696.
2. Юрченко Т.С., Болотова С.Б., Логинова А.А., Пометун Е.В., Савин С.С., Пометун А.А., Тишков В.И. Влияние природы буферного раствора на каталитическую активность NAD⁺-зависимой форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2022. – Т. 63. – № 6. – С. 405–417.
3. Юрченко Т.С., Логинова А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И., Савин С.С., Пометун А.А. Инженерия активного центра форматдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*: введение в структуру дополнительной петли и остатков гистидина. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. – 2023. – Т. 64. – № 2. – С. 163–177.
4. Юрченко Т.С., Пометун А.А., Атрошенко Д.Л., Чубарь Т.А., Польшаков В.И., Савин С.С., Тишков В.И. Получение изотопно меченых препаратов рекомбинантной NAD⁺-зависимой форматдегидрогеназы из патогена *Staphylococcus aureus*. // *Биотехнология*. – 2023. – Т. 39. – № 6. – С. 19-25.
5. Iurchenko T.S., Bolotova S.B., Loginova A.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Savin S.S., Pometun E.V., Tishkov V.I., Pometun A.A. Study of the structure-function relationship of formate dehydrogenase– an important enzyme for *Staphylococcus aureus* biofilms by rational design. // *Biochimie*. – 2024. – Vol. 216. – P. 194-204.

Основные публикации материалов научных конференций:

1. Тишков В.И., Савин С.С., Голубев И.В., Федорчук В.В., Каргов И.С., Зарубина С.А., Долина И.А., Атрошенко Д.Л., Захарова Г.С., Полозников А.А., Юрченко Т.С. (Виролайнен Т.С.), Ковалевский Р.П., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Упоров И.В., Скляренко А.В., Яроцкий С.В., Алексеева А.А. Рациональный дизайн ферментов для биотехнологии. // VIII

Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития». Материалы конгресса. – 2015. – Т.2. – С. 452 – 453.

2. Тишков В.И., Пометун А.А., Зарубина С.А., Каргов И.С., Юрченко Т.С. (Виролайнен Т.С.), Атрошенко Д.Л., Комарова Н.В., Голубев И.В., Хушпульян Д.М., Захарова Г.С., Чубарь Т.А., Газарян И.Г., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. Структурно-функциональные исследования оксидоредуктаз. // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2016. – Т. 2. – С. 34 – 34.

3. Tishkov V.I., Pometun A.A., Zarubina S.A., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., Stepashkina A.V., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Iurchenko T.S. (Virolainen T.S.), Kovalevsky R.P., Chubar T.A., Boiko K., Eldarov M., Savin S.S. New paradigm in biocatalysts creation. // IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives». – 2017. – P. 39 – 39.

4. Болотова С.Б., Юрченко Т.С., Пометун А.А. pH-зависимость активности и термостабильность мутантной форматдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* с улучшенными кинетическими параметрами. // Материалы XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019», секция "Химия". – 2019. – С.1030 – 1030.

5. Yurchenko T., Pometun A., Boiko K., Savin S., Tishkov V. Use of site-directed mutagenesis for structure-function studies of formate dehydrogenases from the bacterium *Staphylococcus aureus*. // FEBS open bio. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 278 – 278.

6. Тишков В.И., Пометун А.А., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Ковалевский Р.П., Эльдаров М.А., Юрченко Т.С., Бойко К.М., Хренова М.Г., Urlacher V.B., Савин С.С. “Genome mining” и белковая инженерия для создания новых биокатализаторов, биосенсоров и поиска лекарств против биопленок патогенов. // Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019). Сборник тезисов докладов. – 2019. – С.92 – 92.

7. Юрченко Т.С., Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И. Структурно-функциональные исследования форматдегидрогеназы патогенных бактерий. // Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019). Сборник тезисов докладов. – 2019. – С.250 – 250.

8. Юрченко Т.С., Пометун А.А., Тишков В.И. Влияние структуры N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства ФДГ из бактерий *Staphylococcus*

aureus. // Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020". – 2020. – С.1608 – 1608.

9. Болотова С.Б., Юрченко Т.С., Пометун А.А., Тишков В.И. Белковая инженерия структуры активного центра формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. // Материалы XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021". – 2021. – С. 1144 – 1144.

10. Юрченко Т.С., Пометун А.А., Романов Р.С., Манцызов А.Б., Польшаков В.И., Тишков В.И. Получение изотопно-меченных образцов формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* для исследования структуры фермента методом ЯМР. // Материалы XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021". – 2021. – С.1214 – 1214.

11. Пометун А.А., Юрченко Т.С., Болотова С.Б., Логинова А.А., Пометун Е.В., Савин С.С., Тишков В.И. Исследование уникальных структурно-функциональных особенностей формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий методом сайт-направленного мутагенеза. // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и Пептиды» VII съезд физиологов СНГ. Научные труды. – 2021. – Т.2. – С.69 – 69.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента **Марквичевой Елены Арнольдовны**, доктора химических наук, главного научного сотрудника, зав. лабораторией биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (положительный).

Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. В п.2.2.20 (стр. 61) при описании определения концентрации белка по методу Бредфорда автор слишком подробно описывает приготовление стандартных растворов.

2. В п.3.2 (стр. 72) автором представлено исследование состава и концентрации буферных растворов при определении каталитических свойств формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*. Была проведена большая работа, однако какой-либо зависимости между составом и свойствами автору обнаружить не удалось. Все буферные растворы содержат фосфат. Возможно, следовало бы изучить каталитические свойства фермента в буферных системах на основе трис или предложить какие-то другие составы без фосфата.

3. Интересна попытка изменить коферментную специфичность (см. п.3.3.2). В литературе, помимо замены остатка аспарагиновой кислоты на остаток глутамина, встречаются замены на остатки аспарагина, серина и аланина. Не совсем понятно, почему в случае данного фермента автор ограничился только одной заменой.

4. Хотелось бы пожелать автору в дальнейшем не брать в список источников так много старых статей, чтобы увеличить процент новых статей в списке публикаций. Иначе складывается искаженное впечатление как об актуальности работы, так и о том, насколько автор внимательно смотрит новую литературу по теме.

5. В работе встречаются опечатки, неудачные выражения.

Отзыв официального оппонента **Яненко Александра Степановича**, доктора биологических наук, профессора, заместителя руководителя Комплекса по научной работе (Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий) Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

1. В обзоре литературы диссертант уделяет значительное внимание бактериям *Staphylococcus aureus* и их патогенезу, хотя далее эти материалы не используются диссертантом.
2. Необходимо продемонстрировать большую связь части работы, посвященной получению изотопно-меченных образцов формиатдегидрогеназы с остальными. Сегодня эта часть кажется случайной.

Отзыв ведущей организации **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

1. На рис.1.2.3.1. и рис.1.2.3.2. представлены выравнивание аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных источников и филогенетическое древо соответственно. В тексте литературного обзора автором не уточняется, по какому принципу выбирались организмы для проведения сравнения последовательностей.
2. В разделе «Материалы и методы» некоторые разделы можно было расположить более оптимальным способом: п.2.2.6. и 2.2.8. следовало расположить непосредственно перед п.2.2.11. поскольку, в них описывается работа с клеточными культурами.

3. Низкое качество рис.3.1.7, рис. 3.1.8. и рис. 3.1.2. Таблицы 3.3.1.1., 3.3.2.1., 3.3.2.2., 3.3.3.1. и 3.3.3.2. несколько отличаются по оформлению от остальных в работе.

Помимо этого, в тексте диссертационной работы имеется незначительное количество опечаток.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Муронца Владимира Израилевича, доктора биологических наук, профессора, заведующего отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

В отзыве замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

Иванова Игоря Владимировича, доктора химических наук, профессора кафедры Химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии, Институт тонких химических технологий, Российский технологический университет РТУ-МИРЭА.

В отзыве замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

Сидоренко Сергея Владимировича, доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента РАН, Руководителя отдела, ведущего научного сотрудника, ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства».

В отзыве замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

Топорковой Яны Юрьевны, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника Казанского института биохимии и биофизики Федерального Исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».

В отзыве замечаний по содержанию и оформлению автореферата нет.

В обсуждении приняли участие:

Бовин Николай Владимирович, Агафонов Михаил Олегович, Костров Сергей Викторович, Федоров Алексей Николаевич, Шумянцева Виктория Васильевна, Мирошников Константин Анатольевич, Левицкий Дмитрий Иванович, Сеницын Аркадий Пантелеймонович, Тишков Владимир Иванович.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Получаемая в результате экспрессии полноразмерного гена *Saufdh1* формиатдегидрогеназа идентична по структуре и каталитическим свойствам белку, экспрессируемому из укороченного гена *Saufdh2* вследствие пост-трансляционной модификации по остатку Met34.
2. Разработана эффективная четырех-компонентная буферная система, состоящая из 0,1 М NaPB-Cit-Tris-Gly, приводящая к снижению $K_M^{NAD^+}$ для wt-SauФДГ в 1,5 раза по сравнению с 0,1 М NaPB.
3. Проведен рациональный дизайн каталитически значимых остатков в различных частях аминокислотной последовательности SauФДГ. Замена V119A привела к снижению значений $K_M^{NAD^+}$ и $K_M^{HCOO^-}$ в 2,5 и 1,6 раз соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. Замена объемного остатка Phe в 194 положении на менее объемный остаток Val привела к снижению констант Михаэлиса по NAD^+ и формиату в 4 и 2 раза соответственно при незначительном снижении k_{cat} .
4. Получены высоко-изотопно меченные $^2H, ^{15}N, ^{13}C$ образцы SauФДГ, которые были использованы в исследовании структуры и поиска перспективных ингибиторов методом ЯМР.

Научная новизна.

Проведено исследование уровня экспрессии SauФДГ при различных вариантах N-концевой последовательности. Впервые получена форма белка SauФДГ, содержащая первые 33 аминокислотных остатка.

В рамках данного исследования была разработана комбинированная буферная система с концентрацией 0,1 М каждого компонента, приводящая к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и увеличению каталитической константы SauФДГ. Выделено и охарактеризовано 25 новых мутантных форм формиатдегидрогеназы из *S. aureus* с использованием рационального дизайна, включающие замены в 17 каталитически значимых положениях. Показаны изменения в каталитических свойствах после введения выбранных замен, что подтверждает значимость данных положений для катализа. Для двух мутантных форм показано снижение константы Михаэлиса по NAD^+ вследствие введения меньших по объему боковых заместителей. Проведен дизайн C-концевой области SauФДГ и показано ее критическое значение в катализе.

Теоретическая и практическая значимость работы.

На примере рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *S. aureus* была продемонстрирована значимость пост-трансляционной модификации, в результате которой происходит отщепление части N-концевой аминокислотной последовательности. Было показано, что только укороченная форма белка проявляет специфическую активность. Данный факт может быть полезен при исследовании бактериальных дегидрогеназ из семейства *Staphylococcaceae*.

Разработанная буферная система может быть использована как при исследовании зависимости каталитических свойств ферментов от pH, так и на практике: поставляться совместно с коммерческими системами ферментативной регенерации никотинамидных кофакторов.

Данные, полученные при изучении влияния структура-функция формиатдегидрогеназы из *S. aureus*, являются вкладом в систематическое исследование формиатдегидрогеназ из различных источников. В ходе работы были использованы как описанные ранее приемы рационального дизайна, так и новые стратегические подходы. Мутантные формы с улучшенными каталитическими свойствами могут быть использованы в качестве компонента ферментативных систем с регенерацией NADH.

Полученные в ходе работы высоко изотопно-меченые образцы формиатдегидрогеназы из *S. aureus* могут быть использованы для поиска перспективных ингибиторов SauФДГ как потенциальной мишени для борьбы с данным патогеном.

Личный вклад соискателя:

- Получение основных результатов работы либо лично автором, за исключением отдельно оговоренных случаев, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- В обработке, интерпретации и анализе полученных данных;
- В подготовке публикаций по выполненной работе.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- Использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- Достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- Выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Заключение:

Диссертация Юрченко Т.С. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается логичным построением исследования, корректной подготовкой задач исследования, широким спектром современных методов исследования, использованных в работе, и публикацией результатов работы в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК. Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение важных научных задач, имеющих существенное значение для развития современной биохимии и биотехнологии.

На заседании 07 ноября 2024 года диссертационный совет принял решение присудить Юрченко Татьяне Сергеевне ученую степень кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 13 докторов биологических наук, 11 докторов химических наук по специальностям рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 24

«Против» – нет

Недействительных бюллетеней – 1

И.о. председателя диссертационного
Совета ФИЦ Биотехнологии РАН,
Доктор фармацевтических наук

В.А. Макаров

Учёный секретарь диссертационного
Совета ФИЦ Биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

07.11.2024