



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33,
стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-
32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

26.04.2024

№ 85-01-19/390

На №	от
------	----



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН,

доктор биологических наук

Федоров А.Н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Юрченко Татьяны Сергеевны: «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология, выполненную в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Тема диссертационной работы «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» утверждена на заседании Ученого Совета ФИЦ Биотехнологии РАН (Протокол № 2 от 11.04.2024 года).

В 2018 году Юрченко Т.С. 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 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по направленности «Биохимия» (Свидетельство об окончании аспирантуры АС 003163).

В период 2018-2022 гг. работала в лаборатории молекулярной инженерии ФИЦ Биотехнологии РАН (зав. лабораторией д.х.н. Пометун А. А.). С 2023 года и по настоящее время работает в Отделе Молекулярной диагностики, Дирекции фармацевтического анализа Акционерного общества «Генериум» в должности младшего научного сотрудника 7 разряда.

Научные руководители – доктор химических наук, профессор Тишков Владимир Иванович, профессор Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и доктор химических наук Пометун Анастасия Александровна, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

По результатам рассмотрения диссертации «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы

из *Staphylococcus aureus*» принято следующее заключение:

Актуальность темы. NAD(P)⁺-зависимая формиаатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формиаат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Гены формиаатдегидрогеназы обнаружены в организмах представителей царств бактерий, грибов и растений. Это говорит о том, что данный фермент появился на ранних этапах эволюционного развития живых организмов и играет значимую физиологическую роль в их жизнедеятельности. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды показан рост количества мРНК и активности ФДГ у растений, бактерий, в частности – в биопленках *Staphylococcus aureus*. Помимо этого, наблюдается рост экспрессии генов ферментов, ответственных за наработку формиаата (пируватформиаат-лиаза). Таким образом, клетки *S. aureus* в биопленках получают энергию преимущественно по формиаатному пути.

S. aureus – это анаэробные грам-положительные бактерии из семейства *Staphylococcae*. Данный патоген является возбудителем заболеваний, протекающих с различной степенью тяжести: как опасные для жизни, так и протекающие бессимптомно. Сложность борьбы обусловлена широким спектром факторов вирулентности и быстро распространяющейся устойчивости к новым антибактериальным препаратам. Так как формиаатдегидрогеназа – один из ключевых ферментов метаболизма *S. aureus* в состоянии биопленок, его можно рассматривать в качестве перспективной мишени для подбора конкурентных ингибиторов.

На данный момент применение формиаатдегидрогеназы в качестве катализатора регенерации никотинамидных кофакторов NAD(P)H в ферментативных системах стало традиционным.

Согласно требованиям FDA (Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов), для успешного выхода на фармацевтический рынок оптическая чистота лекарственного препарата должна составлять не менее 99%. Разделение смесей энантиомеров, присутствующих в лекарственной форме при стандартных химических способах органического синтеза, является трудоемким процессом. Использование ферментативной стадии в органическом синтезе оптически активных соединений помогает решить проблему получения энантиомерно чистого вещества. Большой интерес для технических процессов представляют NAD(P)⁺-зависимые оксидоредуктазы. Однако из-за высокой стоимости никотинамидных кофакторов их стехиометрическое использование экономически нецелесообразно. Вследствие этого, требуется эффективная регенерация кофакторов *in situ*. Наиболее перспективными стратегиями являются ферментативные способы регенерации никотинамидных кофакторов, так как их отличает высокая селективность и скорость реакции. Формиаатдегидрогеназа выгодно выделяется среди других дегидрогеназ, так как основным субстратом является коммерчески доступный формиаат, а продуктом реакции – диоксид углерода, не требующий дополнительных стадий очистки. Это существенно упрощает технологические процессы и позволяет избежать избыточных потерь целевого соединения.

Ген, кодирующий формиаатдегидрогеназу из бактерий *S. aureus* (SauФДГ), был клонирован в нашей лаборатории несколько лет назад. SauФДГ имеет уникальную аминокислотную последовательность по сравнению с другими ФДГ. Ранее было показано, что SauФДГ имеет самую высокую k_{cat} среди описанных формиаатдегидрогеназ, однако значения $K_M^{NAD^+}$, $K_M^{HCOO^-}$ также высоки. Данный фермент обладает одной из самых высоких показателей термостабильности, по сравнению с ФДГ из других источников, исследованных на данный момент и сравнима по этому параметру только с ФДГ из бактерий *Pseudomonas sp.* 101. Также для этого фермента проведена кристаллизация и решена трехмерная структура (PDB: 6TTV) (PDB DOI: 10.2210/pdb6TTV/pdb).

Таким образом, изучение формиаатдегидрогеназ с уникальной последовательностью имеет, как практический интерес, так как среди данных ферментов могут быть обнаружены перспективные востребованные на данный момент биокатализаторы и охарактеризованы условия их работы, так и научный – исследование взаимосвязи структура-функция методом рационального дизайна и

выявление перспективных стратегий направленного мутагенеза.

Целью работы является изучение взаимосвязи структура-функция рекомбинантной формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий *S. aureus*.

Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования

1. Изучено влияние N-концевой аминокислотной последовательности на уровень экспрессии и свойства SauФДГ. Впервые получена форма белка SauФДГ, содержащая полную аминокислотную последовательность.
2. В рамках данного исследования была разработана комбинированная буферная система, приводящая к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и увеличению каталитической константы SauФДГ.
3. 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 С-концевой области SauФДГ и показано ее критическое значение в катализе.

Научно-практическое значение

1. На примере рекомбинантной формиатдегидрогеназы из *S. aureus* была продемонстрирована значимость пост-трансляционной модификации отщеплением части N-концевой аминокислотной последовательности. Было показано, что только укороченная форма белка проявляет специфическую активность. Данный факт может быть полезен при исследовании дегидрогеназ из семейства стафилококковые.
2. Данные, полученные при изучении влияния структура-функция формиатдегидрогеназы из *S. aureus*, являются вкладом в систематическое исследование формиатдегидрогеназ из различных источников. На примере данного фермента были подтверждены или опровергнуты успешно используемые ранее приемы рационального дизайна. А также, проведена апробация новых стратегических подходов.
3. Разработанная буферная система может быть использована как при исследовании зависимости каталитических свойств ферментов от pH, так и на практике: поставяться совместно с коммерческими системами ферментативной регенерации никотинамидных кофакторов.
4. Мутантные формы с улучшенными каталитическими свойствами могут быть использованы в качестве компонента ферментативных систем с регенерацией $NADH$.
5. 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.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Большинство экспериментов, вошедших в диссертацию, было выполнено либо непосредственно автором работы, либо с его участием.

Степень достоверности

Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов, полученных с использованием комбинации различных методов, адекватных поставленным задачам.

Соответствие содержания диссертации специальностям, по которым она рекомендуется к защите

Представленная Юрченко Татьяной Сергеевной диссертационная работа посвящена изучению взаимосвязи структура-функция рекомбинантной формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий *S. aureus*. Работа соответствует специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология, по которым она рекомендуется к защите.

Апробация работы

По теме диссертации было опубликовано 5 статей в международных рецензируемых журналах. Основные результаты работы были представлены на международных конгрессах и

конференциях: XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021" (Москва, Россия, 2021), III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов VII съезд биохимиков России X Российский симпозиум «Белки и Пептиды» VII съезд физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2021), XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020" (Москва, Россия, 2020), Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019) (Судак, Крым, Россия, 2019), The 44th FEBS Congress (Краков, Польша, 2019), XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2019» (Москва, Россия, IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, Россия, 2017), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

По теме диссертации было опубликовано 5 статей в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК и 11 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных рецензируемых журналах

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.

Тезисы докладов

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., **Виролainen Т.С.**, Ковалевский Р.П., Степашкина А.В., Чубарь Т.А., Упоров И.В., Складенко 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., **Виролainen 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* (русскаяязычная 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., **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 форматдегидрогеназы 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 форматдегидрогеназы 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 форматдегидрогеназы из патогенных бактерий методом сайт-направленного мутагеза. // 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.

Рекомендуемые оппоненты:

Марквичева Елена Арнольдовна, доктор химических наук, главный научный сотрудник, зав. лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН).

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


Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

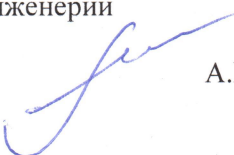
Диссертационная работа Юрченко Татьяны Сергеевны «Рациональный дизайн форматдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий молекулярной инженерии, биотехнологии ферментов, молекулярных основ биотрансформаций, инженерной энзимологии, белок-белковых взаимодействий, химической энзимологии, структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН путем открытого голосования. Присутствовало на заседании – 26 чел. Результаты голосования: «за» – 26 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 1 от « 20 » февраля 2024 г.

Председатель совместного семинара лабораторий
Научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии
Кандидат биологических наук


Н.Н. Мордкович

Секретарь
Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии
Кандидат биологических наук


А.Н. Антипов

