

Заключение диссертационного совета МГУ.02.08

по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

Решение диссертационного совета от «15» октября 2019 г. № 42

о присуждении Пометун Анастасии Александровне, гражданство РФ, ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «Структурно-функциональные взаимосвязи и белковая инженерия форматдегидрогеназ» по специальности **03.01.04 – «Биохимия»** принята к защите диссертационным советом 18 июня 2019 г., протокол № 37.

Соискатель Пометун Анастасия Александровна 1985 года рождения в 2008 году с отличием окончила химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова и в 2011 г. завершила обучение в аспирантуре. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук «Рекомбинантная форматдегидрогеназа из сои *Glycine max*: белковая инженерия и структурные исследования» защитила в 2011 г. в диссертационном совете Д 501.001.59 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель с 2011 г. работает в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук в должности научного сотрудника, а также с 2018 г. по совместительству на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова в должности научного сотрудника.

Диссертация выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Научный консультант:

Тишков Владимир Иванович, доктор химических наук, профессор химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, заведующий лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (по совместительству).

Официальные оппоненты:

Костров Сергей Викторович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук;

Мирошников Константин Анатольевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Яненко Александр Степанович, доктор биологических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов национального исследовательского центра "Курчатовский институт", заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 17 статей, в том числе по теме диссертации 16 статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

1. Садыхов Э.Г., Серов А.Е., Ясный И.Е., Войнова Н.С., Алексеева (Пометун) А.А., Петров А.С., Тишков В.И. NAD⁺-зависимые форматдегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* и сои: экспрессия в клетках *E.coli* и кинетические свойства рекомбинантных ферментов. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2006, т. 47, № 1, с.31-34. (Scopus, IF 0,19).
2. Sadykhov, E.G., Serov, A.E., Voinova, N.S., Uglanova, S.V., Petrov, A.S., Alekseeva (Pometun), A.A., Kleimenov, S.Yu., Popov, V.O., Tishkov, V.I. A comparable study of thermal stability of formate dehydrogenases from microorganisms and plants. Appl.Biochem.Microbiol. 2006, v.42, № 3, p.236-240. (Web of Science IF 0,47, Scopus, IF 0,70).
3. Войнова Н.С., Савин С.С., Алексеева (Пометун) А.А., Скиргелло О.Е., Тишков В.И. Инактивация форматдегидрогеназ при pH 8. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2008, т.49, № 2, с.77-80. (Scopus, IF 0,19).
4. Романова Е.Г., Алексеева (Пометун) А.А., Пометун Е.В., Тишков В.И. Определение концентрации активных центров и каталитической константы рекомбинантной форматдегидрогеназы из сои *Glycine max*. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2010, т.51, № 3, с.156-159. (Scopus, IF 0,19)
5. Алексеева (Пометун) А.А., Савин С.С., Тишков В.И. NAD⁺-зависимая форматдегидрогеназа растений. Acta Naturae, 2011, т.3, № 4(11), с.40-56. (Web of Science, IF 2,0)
6. Алексеева (Пометун) А.А., Савин С.С., Клейменов С.Ю., Упоров И.В., Пометун Е.В., Тишков В.И. Стабилизация рекомбинантной форматдегидрогеназы из сои *Glycine max* методом рационального дизайна. Биохимия (Мос.), 2012, т.77, № 10, с. 1443-1456 (Scopus, IF 2,01 Web of Science, IF 1,886).
7. Alekseeva (Pometun) A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Tishkov V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations. Protein Engineering, Design and Selection, 2012, v. 25, № 11, p. 781-788 (Web of Science, IF 1,98).
8. Алексеева (Пометун) А.А., Петров А.С., Федорчук В.В., Федорчук Е.А., Осипова Т.А., Тишков В.И. Изменение величины изоэлектрической точки форматдегидрогеназы методом рационального дизайна, Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2014, т.55, № 2, с. 98-105 (Scopus, IF 0,19).
9. Тишков В.И., Гончаренко К.В., Алексеева (Пометун) А.А., Клейменов С.Ю., Савин С.С. Роль структурно-эквивалентного остатка Phe в катализе и термостабильности форматдегидрогеназ из разных источников. Успехи биологической химии, 2015, т. 55, с. 123-144 (Tishkov V.I., Goncharenko K.V., Alekseeva (Pometun) A.A., Kleymenov S.Yu., Savin S.S. Role of a structurally equivalent phenylalanine residue in catalysis and thermal stability of formate dehydrogenases from different sources. Biochemistry (Moscow), 2015, v. 80, № 13, p. 1690-1700) (Scopus, IF 2,01 Web of Science, IF 1,886).
10. Алексеева (Пометун) А. А., Федорчук В. В., Зарубина С. А., Садыхов Э. Г., Маторин А. Д., Савин С. С., Тишков В. И. Роль остатка Ala198 в стабильности и коферментной специфичности бактериальных форматдегидрогеназ. Acta Naturae, 2015, т.7, № 1(24), с.64-73 (Web of Science, IF 2,0).
11. Алексеева (Пометун) А. А., Каргов И. С., Клейменов С. Ю., Савин С. С., Тишков В. И. Аддитивность стабилизирующего эффекта единичных аминокислотных замен в тройных мутантах рекомбинантной форматдегидрогеназы из сои *Glycine max*. Acta Naturae, 2015, т.7, № 3(26), с.61-71 (Web of Science, IF 2,0).
12. Kargov I.S., Kleimenov S.Y., Savin S.S., Tishkov V.I., Alekseeva (Pometun) A.A. Improvement of the soy formate dehydrogenase properties by rational design. Protein Engineering, Design and Selection, 2015, v. 28, № 6, p. 171-178 (Scopus, Web of Science, IF 1,98).
13. Тишков В.И., Пометун А.А., Степашкина А.В., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Каргов И.С., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Шеломов М.Д., Ковалевский Р.П., Бойко К.М., Эльдаров М.А., Д'Оронцо Э., Секундо Ф., Савин С.С. Рациональный дизайн практически значимых ферментов. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2018, т.59, № 2, с. 70-77 (Scopus, IF 0,19).
14. Пометун А.А., Клейменов С.Ю., Зарубина С.А., Каргов И.С., Паршин П., Садыхов Э.Г., Савин С.С., Тишков В.И. Сравнение термостабильности новых форматдегидрогеназ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2018, т.59, № 2, с. 164-169 (Scopus, IF 0,19).
15. Пометун А.А., Войнова Н.С., Пометун Е.В., Савин С.С., Тишков В.И. Влияние pH среды и ионной силы на температурную стабильность растительных форматдегидрогеназ. Вестник Московского Университета, Сер. 2: Химия, 2018, т.59, № 4, с. 313-319 (Scopus, IF 0,19).

16. D'Oronzo E., Secundo F., Minofar B., Kulik N., Pometun A.A., Tishkov V.I. Activation/inactivation role of ionic liquids on formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp.101 and its mutated thermostable form. ChemCatChem, 2018, v. 10, i. 15, p. 3247-3259 (Web of Science, IF 4,495).

На автореферат диссертации поступило 8 дополнительных отзывов, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обусловлен их высокой компетентностью в области представленной диссертационной работы и наличием публикаций в области биохимии.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения в области биохимии ферментов. Таким образом, представленная диссертация соответствует пункту 2.1 Положения о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова.

Впервые проведен детальный анализ первичных структур формиатдегидрогеназ из различных организмов и существенно расширен список источников этой группы ферментов. Для наиболее интересных природных источников проведено клонирование новых генов, кодирующих формиатдегидрогеназу. В том числе проведено клонирование гена формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий, дрожжей, сои, мха. Впервые в мире получена рекомбинантная формиатдегидрогеназа растений, представляющая собой активный белок-предшественник с полноразмерным сигнальным пептидом. Ранее попытки экспрессировать полноразмерный вариант растительных про-формиатдегидрогеназ заканчивались получением неактивных телец включения.

Систематически исследованы основные свойства формиатдегидрогеназ дикого типа из большого количества источников и показаны взаимосвязи между свойствами ферментов и их структурой. В результате получены новые ферменты, обладающие или самой высокой каталитической константой, или самыми низкими значениями констант Михаэлиса по коферменту и субстрату среди всех описанных ферментов данной группы.

Получены кристаллы четырех новых формиатдегидрогеназ и определены их трехмерные структуры. Всего проведено решение шести новых трехмерных структур. Для формиатдегидрогеназ из дрожжей и патогенных бактерий получены структуры ферментов как для апо-, так и для холо-форм. Для ферментов из растений сои и мха получены структуры тройных комплексов формиатдегидрогеназы с NAD^+ и азидом. Полученные данные могут быть использованы для анализа пространственных структур аналогичных ферментов, а также для моделирования структур химерных ферментов на основе формиатдегидрогеназы.

Проведен детальный сравнительный анализ трехмерных структур формиатдегидрогеназ из различных источников и определены структурно-эквивалентные аминокислотные остатки и последовательности, играющие ключевую роль в катализе и стабильности формиатдегидрогеназ.

Методами белковой инженерии получено более пятидесяти мутантных формиатдегидрогеназ. Выявлены положения в аминокислотных последовательностях, отвечающие за каталитические свойства, стабильность и субстратную специфичность семейства этого фермента. За счет одной аминокислотной замены впервые удалось повысить стабильность формиатдегидрогеназы при высоких температурах более чем в 100 раз. Полученные результаты можно использовать при анализе суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот, членом которого является формиатдегидрогеназа.

На примере наименее стабильной формиатдегидрогеназы сои опробовано несколько различных подходов по стабилизации фермента методами белковой инженерии, и выявлены подходы, обладающие наибольшей эффективностью, которые впоследствии могут быть использованы для других ферментов.

Получены новые данные о механизме коферментной специфичности формиатдегидрогеназы. С помощью одной замены впервые удалось изменить специфичность от NAD^+ к NADP^+ . За счет точечных аминокислотных замен удалось добиться значительного улучшения кинетических

параметров у формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий. Заменой одного остатка цистеина в дрожжевой формиатдегидрогеназе удалось повысить химическую стабильность формиатдегидрогеназы более чем на два порядка. Данные ферменты могут быть использованы для создания биокатализаторов регенерации кофактора. Полученные данные могут быть использованы при разработке подходов к получению других ферментов с заданными характеристиками методами белковой инженерии.

Заложены основы по проведению реакции, катализируемой формиатдегидрогеназой, в ионных жидкостях. Полученные данные могут быть использованы для подбора условий работы ферментов в ионных жидкостях.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Клонированные последовательности соответствуют последовательностям, кодирующим формиатдегидрогеназы из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* (OpaFDH), а также растений сои *Glycine max* (SoyFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PpaFDH). У растительных ферментов оптимальный уровень экспрессии наблюдается для конструкций, которые не содержат сигнальные последовательности.

2. SauFDH и OpaFDH являются одними из самых стабильных формиатдегидрогеназ среди прокариот и эукариот соответственно. SauFDH также имеет самое высокое значение каталитической константы по сравнению с формиатдегидрогеназой из других источников, а SoyFDH и OpaFDH характеризуются самыми низкими значениями констант Михаэлиса как по NAD^+ , так и по формиату.

3. Формиатдегидрогеназы из растений (SoyFDH и PpaFDH) кристаллизуются только в виде тройного комплекса в закрытой конформации. Для OpaFDH апо- и холо- формы являются открытыми. В структуре комплекса SauFDH- NAD^+ только одна из субъединиц является закрытой.

4. Подход, в результате которого происходит заполнение полостей внутри белковой глобулы, приводит к увеличению стабильности формиатдегидрогеназы из сои. Точечная (A267M) и двойная (A267M/I272V) замены приводят к увеличению термостабильности SoyFDH в 2,8-3,6 и 5,4-11 раз соответственно при повышенных температурах.

5. Замены остатков цистеина на остатки аланина приводят к увеличению химической стабильности формиатдегидрогеназы. В случае OpaFDH замена C230A привела к снижению константы скорости инактивации пероксидом водорода более чем на два порядка.

6. Замены аминокислотного остатка в положении X в канонической полуконсервативной последовательности XP(A)QP приводят к существенному изменению свойств формиатдегидрогеназы из различных источников. Наиболее эффективными для температурной стабильности в положении X являются отрицательно заряженные аминокислотные остатки. Остаток пролина является критически важным для стабильности и каталитических свойств формиатдегидрогеназ. В случае SoyFDH добавление аминокислотных замен F290D, F290N и F290S в положении X к заменам A267M/I272V приводит к повышению стабильности фермента более чем в 100 раз при повышенных температурах без существенного изменения каталитических свойств.

7. Каноническая последовательность G(A)XGXXG оказывает существенное влияние на каталитические свойства формиатдегидрогеназ из различных источников. Замены аминокислот в этой последовательности у SauFDH приводят к значительному изменению констант Михаэлиса как по NAD^+ , так и по формиату.

8. Остаток аспарагиновой кислоты, находящийся в кофермент-связывающем домене формиатдегидрогеназы, определяет специфичность формиатдегидрогеназы к NAD^+ .

9. Формиатдегидрогеназы сохраняют высокую активность и достаточно стабильны в водных смесях с ионными жидкостями. Влияние ионных жидкостей зависит от источника фермента. Свойства фермента в растворах ионных жидкостей меняются в зависимости от типа и положения изменяемого остатка.

На заседании 15 октября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить **Пометун А.А.** ученую степень доктора химических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за 18, против 0, недействительных бюллетеней 1.

Председатель диссертационного совета

д.х.н., проф., член-корр. РАН

Варфоломеев С.Д.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н.

Самодынская И.К.



15 октября 2019 года