



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

13.09.2024

№

85-01-19/64

На №

от

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора
ФИЦ Биотехнологии РАН



Равин Н.В.
д.б.н.

13.09.2024 г.

Заключение

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Филькина Сергея Юрьевича «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*»

Диссертационная работа Филькина Сергея Юрьевича «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*» в лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия, выполненную в лаборатории молекулярной биотехнологии института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Тема диссертационной работы «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*» утверждена на заседании Учёного Совета ФИЦ Биотехнологии РАН (Протокол от 20 июня 2024 года).

В 2007 году Филькин Сергей Юрьевич окончил Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с присвоением квалификации специалист по специальности «Биохимия». С 2007 по 2011 год обучался в очной аспирантуре Института Биоорганической Химии им.

академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по специальности «Биохимия».

В период с 2018-2024 гг. работал в лаборатории молекулярной биотехнологии ФИЦ Биотехнологии РАН (зав. лабораторией к.б.н. Юркова М.С.). Научный руководитель – кандидат химических наук Липкин Алексей Валерьевич, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Института биохимии им. Баха ФИЦ Биотехнологии» РАН.

По результатам рассмотрения диссертационной работы «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 и химозина в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*» принято следующее заключение:

Актуальность темы:

Фосфолипаза А2 (ФЛА2) и химозин являются важными биотехнологическими ферментами и широко применяются в пищевой промышленности, а также используются и в агропромышленной отрасли.

ФЛА2 участвует в эмульгировании яичного желтка для приготовления майонеза, соусов, хлебопекарной продукции и при очистке растительных масел. Основными источниками биотехнологической ФЛА2 является свиная поджелудочная железа и яды змей.

Исследование биохимических и физико-химических свойств рекомбинантной ФЛА2 и молоко-свертывающих ферментов имеет большое прикладное значение. Развитие и разработка принципиально новых и высокоэффективных методов промышленного получения и очистки этих ферментов является важной и актуальной задачей современной биотехнологии. Понимание биохимических механизмов ферментативного катализа рекомбинантных молоко-свертывающих ферментов позволит разработать, как ферменты с улучшенными каталитическими свойствами, так и более эффективные методы получения и очистки данных ферментов.

Известно, что продукция рекомбинантных белков является нагрузкой на биосинтетический аппарат метилотрофных дрожжей, причем данная нагрузка распределена неравномерно. Так понимание механизмов возникновения недостатка отдельных аминокислот при биосинтезе рекомбинантных белков могут быть проявлены при помощи анализа метаболома.

Целью данной работы является биотехнологический синтез и разработка масштабируемых методов очистки рекомбинантных ферментов ФЛА2 и химозина, изучение биохимических механизмов их каталитических свойств, подбор условий экспрессии и изучение метаболомных процессов, идущих при экспрессии в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*.

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

Разработаны подходы для масштабируемых процессов выделения и очистки рекомбинантных фосфолипазы A2 и химозина. Впервые: охарактеризован и описан новый белок из группы секреторных фосфолипаз A2 ядов змей, обладающих антикоагулянтными свойствами; охарактеризован и описан рекомбинантный химозин белухи; определены структурные детерминанты физико-химической активности ФЛА2 и химозина; охарактеризованы изменения метаболомного состава при продукции рекомбинантных ферментов в метилотрофных дрожжах *P.pastoris*.

Научно-практическое значение

Полученные в ходе работы данные вносят значимый вклад в понимание физико-химических свойств фосфолипаз A2 и молокосвертывающих ферментов. Так как фосфолипаза A2 и химозин играют важную роль в пищевой биотехнологии, то раскрытие новых свойств данных ферментов, а так же особенности их биосинтеза в метилотрофных дрожжах *P.pastoris* носит крайне важное значение для народного хозяйства. В настоящей работе впервые описан антикоагулянтный белок TI-Nh, относящийся структурно к классу фосфолипаз A2. Это расширяет возможность использования отдельных полипептидных пространственных укладок для создания новых физиологических активностей. Понимание фундаментальных механизмов изменения метаболома в системе *P.pastoris* при экспрессии целевых рекомбинантных белков расширяет наше представление о биохимических механизмах увеличения продуктивности штамм-производителей.

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 проведенных измерений и согласованностью результатов, полученных при помощи комбинации различных биохимических и молекулярно-биологических методов, адекватных поставленным задачам.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная Филькиным Сергеем Юрьевичем диссертационная работа посвящена изучению биохимических аспектов экспрессии рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *P.pastoris*. Работа соответствует специальности 1.5.4. Биохимия, по которой она рекомендуется к защите.

Апробация работы

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science. Отдельные результаты диссертационной работы были представлены на нескольких конференциях, таких как: IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2019 г.); 12-ая конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» (2019 г.) XXXIX Международная научно-практическая конференция «Химия, физика, биология» (2021 г.); 13-ая конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» (2023 г.); XI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (2024 г.).

Наиболее значимые работы, опубликованные по теме:

По теме диссертации было опубликовано 8 статей в международных журналах, входящих в перечень ВАК, 4 патента РФ и 6 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных рецензируемых журналах:

1. Osipov A.V., **Filkin S.Y.**, Makarova Y.V., Tsetlin V.I., Utkin Y. N. A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the *Naja haje* cobra venom // *Toxicon*. – 2010. – V. 55. – №. 2-3. – P. 186-194.
2. Frahm S., Slimak M.A., Ferrarese L., Santos-Torres J., Antolin-Fontes B., Auer S., **Filkin S.**, Pons S., Fontaine J.F., Tsetlin V., Maskos U., Ibañez-Tallon I. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. // *Neuron*. – 2011. – V. 70. – №. 3. – P. 522-535.
3. Vulfius C.A., Kasheverov I.E., Starkov V.G., Osipov A.V., Andreeva T.V., **Filkin S.Y.**, Gorbacheva E.V., Astashev M.E., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors, a novel facet in the pleiotropic activities of snake venom phospholipases A2 // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №. 12. – P. e115428.

4. **Filkin S.Y.**, Chertova N.V., Zenin A.A., Lipkin A.V., Sichev A.A., Bityak D.S., Sadykhov E.G., Popov V.O., Fedorov A.N. Expression, purification and biophysical characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase PLA2 overproduced in *Pichia pastoris* // Preparative Biochemistry & Biotechnology. – 2020. – V. 50. – №. 6. – P. 549-555.

5. **Филькин С. Ю.**, Чертова Н.В., Зенин А.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н. Разработка масштабируемого метода выделения и очистки рекомбинантной секреторной фосфолипазы А2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №. 6. – С. 578-585.

6. **Filkin S.Y.**, Lipkin A.V., Fedorov A.N. Phospholipase superfamily: structure, functions, and biotechnological applications // Biochemistry (Moscow). – 2020. – V. 85. – P. 177-195.

7. **Filkin S.Y.**, Chertova N.V., Vavilova E.A., Zatsepin S.S., Eldarov M.A., Sadykhov E.G., Fedorov A.N., Lipkin A.V. Optimization of the production method for recombinant chymosin in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56. – P. 657-661.

8. **Филькин С.Ю.** Чертова Н.В., Зацепин С.С., Садыхов Э.Г., Федоров А.Н., Липкин А.В. Получение химозина белухи (*Delphinapterus leucas*) в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii* и характеристика рекомбинантного фермента // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57. – №. 3. – С. 228-234.

Патенты.

1. Способ очистки рекомбинантного ферментного препарата фосфолипазы А2 из штамма продуцента *Pichia pastoris*. Филькин С.Ю., Зенин В.А., Чертова Н.В., Липкин А.В., Федоров А.Н. Патент на изобретение, RU2746563C1, 15.04.2021.

2. Получение гена фосфолипазы А2 с измененным оптимумом рН путем удаления сайтов гликозилирования. Филькин С.Ю., Федоров А.Н., Липкин А.В., Чертова Н.В. Патент на изобретение, RU2766448, 15.03.2022.

3. Способ микробиологической продукции химозина быка с использованием рекомбинантного штамма *Pichia pastoris*, содержащего синтетический ген варианта химозина с коэкспрессией фактора sHAC1. Эльдаров М.А., Филькин

С.Ю., Федоров А.Н., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Чертова Н.В. Патент на изобретение, RU2769175, 29.03.2022.

4. Способ микробиологического синтеза прохимозина быка с использованием рекомбинантного штамма *Pichia pastoris* содержащего синтетический ген варианта препрохимозина с модифицированной сигнальной последовательностью секреции. Эльдаров М.А., Филькин С. Ю., Федоров А.Н., Липкин А. В., Садыхов Э. Г., Чертова Н. В. Патент на изобретение, RU2779307, 06.09.2022.

Тезисы докладов:

1. Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Зенин А.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Федоров А.Н. Выделение и очистка рекомбинантной секреторной фосфолипазы А2 при экспрессии в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. // IX Российский симпозиум "Белки и пептиды". Материалы симпозиума. – 2019. – С. 141.
2. Чертова Н.В., Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.Н. Разработка технологии рекомбинантного фермента фосфолипазы А2 для пищевой промышленности. // 12-ая Международная конференция "Биокатализ: фундаментальные исследования и применения". Сборник материалов конференции. – 2019. – С. 126.
3. Чертова Н.В., Филькин С.Ю., Федоров А.Н. Разработка и получение рекомбинантных штамм-продуцентов химозина в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii*. // XXXIX Международная научная-практическая конференция "Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования". Сборник статей по материалам конференции. – 2020. – С. 11-15.
4. Князева К.Э., Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Липкин А.В., Федоров А.Н. Разработка и получение рекомбинантных штамм-продуцентов рекомбинантного химозина в *Pichia pastoris*. // X Российский симпозиум «Белки и пептиды». Материалы симпозиума. – 2021. – С. 131.
5. Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Князева К.Э., Цедилин А.М., Липкин А.В., Федоров А.Н. Высокоэффективная система получения рекомбинантных ферментов фосфолипазы А2 и химозина метилотрофных дрожжах *P. pastoris*. // 13-ая Международная конференция "Биокатализ: фундаментальные исследования и применения". Сборник материалов конференции. – 2023. – С. 147.
6. Липкин А.В., Филькин С.Ю., Макарова А.О., Морозкина Е.В., Шлыкова Д.С., Ахременко Д.Д., Волков И.Ю., Юркова М.С., Плеханова Н.С., Федоров А.Н. Разработка технологий производства рекомбинантных белков- проблемы промышленной адаптации и масштабирования. // XI Российский симпозиум "Белки и пептиды". Материалы симпозиума. – 2024. – С. 307.

Рекомендуемые оппоненты:

Солонин Александр Сергеевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

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 Институт
общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен).

Диссертационная работа Филькина Сергея Юрьевича «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*» на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лаборатории молекулярной биотехнологии, лаборатории биотехнологии ферментов, лаборатории молекулярной генетики, лаборатории иммунохимии, центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии РАН» путем открытого голосования. Присутствовало на заседании: 24 чел. Результаты голосования — «за» - 24 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол от «10» сентября 2024 года.

Председатель совместного семинара лабораторий
Заведующая лабораторией молекулярной инженерии
доктор химических наук

Ан
Пометун А.А.

Секретарь
сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии

Шитенкова Е.В.

12 сентября 2024 г.

