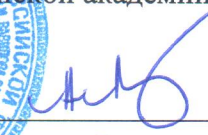


УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт
общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук



 А.В. Мисюрин

ноябре 2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе **Филькина Сергея Юрьевича** на тему
**«Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в
метилотрофных дрожжах *P. pastoris*»**, представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
1.5.4. – Биохимия

Актуальность диссертационной работы

Современная биотехнология и пищевая промышленность сталкиваются с растущей потребностью в эффективных, безопасных и масштабируемых ферментативных решениях. Фосфолипаза A2 (ФЛА2) и химозин, широко применяемые в производстве продуктов питания, нуждаются в усовершенствовании методов получения и очистки. При этом природные источники этих ферментов либо ограничены, либо сопряжены с высокими затратами и этическими вопросами, что делает рекомбинантные формы более привлекательными. Кроме того, фосфолипаза A2 играет важную роль во множестве физиологических процессов, включая воспаление, свертывание крови и разрушение клеточных мембран, что делает её также перспективной мишенью для разработки новых лекарственных препаратов. Таким образом, разработка эффективных экспрессионных систем и методов очистки рекомбинантных ферментов остаётся приоритетом биотехнологии. Углублённое понимание механизмов действия ФЛА2 и химозина

необходимо как для совершенствования промышленных процессов их получения, так и для расширения областей их применения. Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* (Komagataella phaffii) зарекомендовали себя как перспективная платформа для экспрессии гетерологичных белков, обладающая высокой продуктивностью, GRAS-статусом и возможностью посттрансляционных модификаций. Однако потенциал этой системы ещё не исчерпан. Актуальными остаются задачи повышения выхода белка, улучшения фолдинга и секреции, оптимизации условий культивирования и разработки новых регуляторных элементов, включая безметанольные промоторы.

Кроме того, изучение биохимических и метаболомных механизмов синтеза и секреции рекомбинантных ферментов в *P. pastoris* позволяет выявлять лимитирующие стадии процесса и открывает путь к созданию более эффективных штаммов-продуцентов. Введение в практику таких систем будет способствовать снижению себестоимости ферментов, расширению их применения и обеспечению устойчивости производства.

Новизна исследования и полученных результатов

Разработаны подходы для масштабируемого получения и очистки рекомбинантных ферментов — фосфолипазы A2 и химозина — при экспрессии в *Pichia pastoris*. Предложенные биопроцессы являются технологически воспроизводимыми, экономически целесообразными и удовлетворяют требованиям биобезопасности, включая отсутствие остаточной ДНК. Впервые охарактеризован и описан новый ингибитор тромбина — фосфолипаза A2 TI-Nh из яда египетской кобры (*Naja haje*), относящаяся к подгруппе IB. Это первый известный случай ингибирования тромбина секреторной фосфолипазой A2 из ядов змей семейства Elapidae. Создан высокоэффективный штамм *P. pastoris*, продуцирующий рекомбинантный прохимозин быка с последующей автокаталитической активацией в химозин. Разработана система очистки, обеспечивающая получение фермента, пригодного для крупномасштабного применения в пищевой промышленности. Охарактеризован и описан рекомбинантный химозин белухи (*Delphinapterus leucas*), выявлены его физико-химические особенности и ограничения для пищевого использования, связанные с повышенной неспецифической протеолитической активностью. Установлены структурные детерминанты, определяющие различие в специфической активности между химозином белухи и быка. Впервые показано, что коэкспрессия транскрипционного фактора sHAC1 в системе *P. pastoris* под контролем промотора PAOX1 приводит к существенному увеличению продукции рекомбинантного химозина. Установлено изменение метаболического баланса NADH/NAD⁺, что

свидетельствует о задействовании ключевых метаболических путей и открывает новые возможности для метаболической инженерии штаммов-продуцентов.

Обоснованность и достоверность научных положений и заключений

Научные положения и выводы диссертационной работы С.Ю. Филькина являются полностью обоснованными, а полученные результаты не вызывают сомнения. В работе использован широкий круг современных биохимических, молекулярно-биологических методов, методов генетической инженерии, биотехнологии, а также масс-спектрометрического анализа. Эксперименты проведены на высоком методическом уровне, полученные результаты достоверны. Результаты диссертационной работы С.Ю. Филькина опубликованы в 8 статьях в научных изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, получено 4 патента, результаты представлены в шести тезисах докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и содержание работы

Диссертация С.Ю. Филькина включает стандартные разделы: общая характеристика, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и список литературы. Работа изложена на 120 страницах, содержит 13 таблиц, 36 рисунков и 187 литературных источников

В разделе «Общая характеристика работы» автор описывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, обосновывает научную новизну и научно-практическую значимость работы. Также в данном разделе приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и о публикациях, содержащих результаты по теме диссертации.

Раздел «Обзор литературы» начинается с описания экспрессионной системы *P. pastoris*, её преимуществ, особенностей механизма секреции, используемых промоторов и особенностей биоэнергетического баланса *P. pastoris* при продукции рекомбинантных белков. Затем автор переходит к описанию и классификации ФЛА2, особенностям их экспрессии и прикладным аспектам использования ФЛА2 в качестве терапевтического препарата и в биотехнологических процессах. Также часть «Обзор литературы» посвящена описанию исследований, посвященных структуре химозина и его каталитических особенностей.

Раздел «Материалы и методы» демонстрирует высокий технический уровень работы и использование современных биохимических и молекулярно-биологических методов, таких как: молекулярное клонирование, электрофорез, различные

хроматографические методы, методы масс-спектрометрии. Использованные методические подходы адекватны поставленным в работе задачам.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены итоги экспериментальных исследований, структурированных в шести тематических блоках, каждый из которых раскрывает отдельный аспект работы. Первая часть посвящена исследованию антикоагулянтной активности рекомбинантной фосфолипазы A2 TI-Nh, выделенной из яда египетской кобры *Naja haje*. Во второй части рассматривается экспрессия рекомбинантной фосфолипазы A2 *Streptomyces violaceoruber* в системе *P. pastoris*, а также разработка масштабируемых методов очистки данного фермента. Третья часть фокусируется на изучении влияния двухвалентных катионов на стабилизацию третичной структуры рекомбинантной ФЛА2 *S. violaceoruber*. Четвёртая часть описывает создание высокопродуктивного экспрессионного штамма *P. pastoris* для получения рекомбинантного химозина быка и разработку технологии его очистки, соответствующей требованиям пищевой промышленности. В пятой части рассматривается экспрессия и характеристика рекомбинантного химозина белухи, включая его физико-химические и каталитические свойства. Шестая часть посвящена метаболомному анализу клеток при экспрессии химозина, включая исследование влияния коэкспрессии транскрипционного фактора sHAC1 на метаболический профиль продуцента.

В разделе «Заключение» полученные результаты исследования обобщены и оценены, «Выводы» работы полностью обоснованы и соответствуют поставленной в начале работы задаче.

Замечания по содержанию диссертации

Литературный обзор:

Предложение: Классификацию фосфолипаз A2 (ФЛА2) на 16 групп было бы целесообразно оформить в виде сводной таблицы, содержащей ключевые характеристики (тип организма, молекулярную массу, конфигурацию дисульфидных мостиков, активность, особенности катализа и др.) – это улучшило бы наглядность и восприятие информации.

Рис. 4 (структура ФЛА2 *S. violaceoruber*): Изображение трёхмерной структуры выглядит малоинформативным. Следовало бы обозначить каталитические аминокислотные остатки, Ca^{2+} -связывающие участки, а также дисульфидные мостики. В подписи желательно было бы уточнить: лиганды, условия кристаллизации, наличие/отсутствие ионов Ca^{2+} .

Происхождение рисунков 4, 6, 7: Если автор выполнил их самостоятельно, необходимо было указать программное обеспечение. Если заимствовано из литературы — добавить ссылки в подписи.

Рис. 7 (выравнивание химозинов): Представлены аминокислотные замены, но выводы автора недостаточно ясны. Следует конкретизировать, какие именно замены могут повлиять на активность, и чем обоснован этот выбор.

Рис. 6 (филогенетическое дерево): Следовало бы указать процент гомологии между белками (не только с бычьим, но и с другими млекопитающими).

Раздел 1.1.2: Информацию о препролидерных последовательностях разумнее представить в виде схемы или таблицы.

Материалы и методы:

Описание векторов и рестриктаз: Уточнить, был ли использован один и тот же сайт рестрикции (SacI) для всех конструкций. Если да — оправдан ли этот выбор? И нет ли риска для повторной интеграции в геном?

Сигнальные последовательности: были ли препролидерные пептиды (например, α -фактор) модифицированы или оптимизированы для конкретного белка? Использовалась ли кодон-оптимизация?

Опечатки и несоответствия: - "Sepadex" → Sephadex, - "мол. масса изменилась на 1494 Да" — вероятно, ошибка на порядок (имелось в виду 14 940 Да).

Результаты и обсуждение

ФЛА2 TI-Nh из яда кобры.

Дополнение к таблице 7: Было бы полезно привести выравнивание N-концевых последовательностей ФЛА2 из разных источников с указанием консервативных/вариабельных остатков.

N-концевая последовательность: Планируется ли в будущем получение полной аминокислотной и нуклеотидной последовательности TI-Nh? Возможен ли транскриптомный/геномный подход для этого?

Дисульфидные мостики: Если полная последовательность белка TI-Nh не установлена, на каком основании сделан вывод о наличии 7 дисульфидных мостиков?

Ингибирование тромбина и фосфолипазная активность: TI-Nh не требует Ca^{2+} для ингибирования тромбина, в отличие от катализа фосфолипидов. Рассматривалась ли возможность двойной (бифункциональной) природы белка — ферментативной и неферментативной?

Экспрессия и очистка рекомбинантной ФЛА2.

Графики (например, рис. 20): Отсутствуют погрешности измерений и указание числа повторов. Были ли технические и биологические повторы?

Секреция ФЛА2: Уточнить, была ли произведена оптимизация сигнального пептида или гликозилирования. Выполнялось ли это в рамках данной работы или ранее?

Рекомбинантный химозин быка и белухи

Препролидерная последовательность (рис. 23): Какой участок был удалён при модификации α -фактора (*mfa1* → *mfa1D*)? Почему это улучшило секрецию?

Выбор химозина белухи: Почему он рассматривался как кандидат для пищевой промышленности, несмотря на ожидаемую повышенную неспецифическую активность? Можно ли было предсказать эти свойства на основе гомологии или филогенетического анализа?

Экспрессия химозина белухи: Почему при экспрессии белухиногo химозина не была использована модифицированная сигнальная последовательность, хотя она улучшила продуктивность при экспрессии бычьего химозина?

Замечания по оформлению перечня публикаций

Список статей не упорядочен хронологически, что затрудняет восприятие динамики научных результатов.

В одном и том же журнале представлены публикации, как на русском, так и на английском языках (Прикладная биохимия и микробиология / Applied Biochemistry and Microbiology, Biochemistry (Moscow)). Желательно было бы выбрать одну языковую версию для последовательности и единообразия (например, только англоязычные версии, если речь идёт о международной защите или подаче в ВАК).

Пример дублирования/разнородности:

– Филькин С.Ю. и соавт. // Прикладная биохимия и микробиология, 2019, т. 55, №6

– Filkin S.Y. и соавт. // Applied Biochemistry and Microbiology, 2020, V. 56

Рекомендуется:

Упорядочить статьи по году издания (от ранних к поздним).

Приводить названия журналов в одной языковой версии.

При наличии перевода — ссылаться либо на оригинал, либо на англоязычную публикацию, но не смешивать.

Заключение

Диссертационная работа С.Ю. Филькина на тему «Экспрессия рекомбинантных ферментов фосфолипазы A2 и химозина в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*» является завершённой научно-квалификационной работой. Содержание работы

соответствует специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки). По уровню научной новизны, значимости и качеству выполненных исследований, практической значимости полученных результатов представленная работа полностью соответствует требованиям пп. 9–14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с актуальными изменениями), а её автор, Филькин Сергей Юрьевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Диссертация заслушана на семинаре ИОГен РАН 21.10.2025 года (Протокол №1 от 21.10.2025, присутствовало 9 человек, «За» – 9, «Против» – нет, «Воздержались» – нет).

Заместитель директора по научной работе

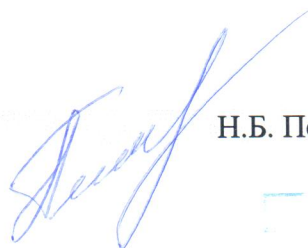
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, кандидат химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия (химические науки)

Адрес: 119991, Москва, улица Губкина, д. 3

Телефон: +7(499)135-6213

e-mail: pest@vigg.ru

Н.Б. Пестов



Подпись
удостоверяю

Я, Пестов Николай Борисович, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнология РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационные дела соискателя и дальнейшую обработку.



УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Д.Б.И

ГОРЯЧЕВА И.И.

7 ноября 2025г



Подпись
удостоверяю