

ОТЗЫВ

на автореферат Осипова Евгения Михайловича на тему «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *Botrytis aclada*», представленный на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертационная работа Осипова Е.М. посвящена исследованию лакказы, простейшего представителя класса голубых медьсодержащих оксидаз, катализирующего окисление субстрата – донора электронов, сопровождающееся прямым восстановлением молекулярного кислорода до воды. Особые каталитические свойства лакказы, обеспечивающие возможность ее широкого применения в различных отраслях биотехнологии, обусловлены строением активного центра, содержащего уникальный ансамбль из четырех ионов меди входящих в состав трех различных центров. Ограниченность практического применения лакказ в промышленных масштабах связана с тем, что не выяснены многие вопросы, касающиеся основ каталитического механизма действия лакказы. Таким образом, изучение структурно-функциональных характеристик лакказ несомненно является актуальным как с точки зрения фундаментальных исследований, так и для практического использования фермента.

Приоритетной задачей диссертационной работы стало выявление структурных изменений лакказы, влияющих на значение редокс потенциала T1 активного центра, вблизи которого происходит окисление первого субстрата, в зависимости от природы его аксиального остатка. Для решения сформулированной задачи диссертант провел комплексное изучение структурно-функциональных характеристик рекомбинантной хлорид-резистентной лакказы из *Botrytis aclada* (BaL) и мутантной формы BaL с заменой Leu499Met с помощью арсенала современных биохимических и биофизических методов исследования. Методом рентгеноструктурного анализа были определены структуры BaL,

мутанта L499M BaL и комплексов BaL с CuCl и CuSO₄ с разрешением 1.67, 1.7, 2.3 и 1.8 Å, соответственно. Сравнительный анализ структур BaL и L499M BaL позволил автору показать, что они отличаются только в области T1 центра и сделать важное наблюдение о смещении иона меди T1 центра, находящегося в BaL структуре в плоскости, образованной его лигандами, в направлении Sδ Met499 на 0.17 Å от плоскости координирующих его атомов азота и серы в структуре L499M BaL при замене аксиального Leu499 на остаток метионина. При этом также достоверно установлено, что длины координационных связей иона меди T1 центра не изменяются. Наряду со структурными данными автором диссертации были определены кинетические константы для BaL (E_{T1} 720 мВ) и L499M BaL (E_{T1} 580 мВ) в интервале рабочих значений pH 3–6, которые позволили сделать заключение, что высокие значения величины K_m , полученные для L499M BaL вероятно связаны со снижением редокс потенциала его T1 центра. Таким образом, данные кинетических измерений с учетом выявленных структурных изменений в строении T1 центра при замене Leu499Met позволили автору сделать принципиально важный вывод о том, что снижение редокс потенциала T1 центра BaL на 140 мВ связано с введением в аксиальное положение атома серы при замене аксиального остатка Leu499 на метионин.

К несомненно новым важным полученным результатам диссертанта следует также отнести наблюдение, что структуры лакказы BaL и мутанта L499M BaL не содержат меди в центре T2, однако, к сожалению, в диссертации отсутствует обсуждение возможных причин. Показано, что в структуре кристаллов BaL формы только после их «вымачивания» в солях Cu(I) (CuCl) происходит встраивание иона меди в T2 центр деплецированной формы. Следует подчеркнуть отсутствие заполнения T2 центра деплецированной формы BaL ионом меди при использовании солей Cu(II) (CuSO₄), структура таких кристаллов не была депонирована из-за полного сходства с деплецированной формой BaL.

В работе встречаются некоторые стилистические недостатки изложения полученных данных. Тем не менее, она проведена на хорошем методическом уровне и несомненно интересна для специалистов, занимающихся исследованием ферментативной активности лакказ в сочетании с требованиями, предъявляемыми для практического биотехнологического применения этих ферментов.

По результатам работы опубликовано 2 статьи в рецензируемых журналах.

В целом диссертация представляет собой научное исследование, вносящее существенный вклад в изучение взаимосвязи изменений в редокс потенциале и кинетических характеристиках лакказ с природой аксиального лиганда активного центра, определенного по структуре высокого разрешения методом рентгеноструктурного анализа.

Работа Осипова Е.М. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а диссертант заслуживает присвоения ему степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Кандидат физико-математических наук,

Ведущий научный сотрудник

Качалова Галина Сергеевна

Тел. +7 (499) 196-95-39, e-mail: gskachalova@gmail.com

НИЦ «Курчатовский Институт»

Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

Подпись Качаловой Г.С. заверяю :

Главный Ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский Институт»

С.Ю. Стремоухов



09 марта 2017г