



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

27.02.2017 № 401/1-217.1-176

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор Учреждения академии наук
академик В.Т. Иванов



« 1 » марта 2017 г.

**ОТЗЫВ
ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу Евгения Михайловича Осипова «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *botrytis aclada*» представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук (специальность 03.01.04 – биохимия)

Лакказа это фермент катализирующий окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Лакказы были обнаружены в грибах, насекомых, бактериях и растениях. Эти ферменты характеризуются наличием трех медь содержащих центров T1, T2 и T3 с разными окислительно-восстановительными потенциалами. Они обладают широкой субстратной специфичностью, которую можно увеличить, используя редокс-медиаторы. Лакказа является одним из ферментов, чьи каталитические свойства обеспечивают возможность ее широкого применения в различных отраслях биотехнологии. Для эффективного применения фермента необходимо знание механизма его действия и взаимосвязи его со структурой. Однако, несмотря на более чем столетнюю историю исследования лакказы, широкий круг вопросов, касающихся каталитического механизма действия фермента, особенностей его биосинтеза, регуляции активности и физиологической роли, остается невыясненным. Таким образом, взаимосвязь структура – функция для данного класса ферментов остается вопросом, требующим дальнейшего изучения.

Работа Е. М. Осипова посвящена исследованию структурно-функциональной взаимосвязи новой хлорид-резистентной лакказы из гриба-аскомицета *Botrytic aclada* (BaL). Диссертация построена по традиционной схеме – она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (159 источников). Диссертация изложена на 108 страницах, включает 35 рисунков и 19 таблиц.

Очень подробный и хорошо написанный обзор позволяет составить детальное представление о текущем состоянии проблемы, дает достаточно полную информацию о данной группе ферментов, их физико-химических и каталитических свойствах, аминокислотной последовательности и пространственной структуре.

В разделе «Материалы и методы» даны необходимые сведения, касающиеся экспериментальной части работы, представлено подробное описание объектов исследований и используемых методов. Этот раздел свидетельствует о большом объеме и высоком научном уровне проведенных исследований, а также высокой квалификации автора диссертационной работы.

В следующем и основном разделе диссертации Е. М. Осипова представлены оригинальные экспериментальные результаты рентгеноструктурного и биохимического исследования лакказы из гриба-аскомицета *Botrytic aclada* (BaL). Следует отметить, что к настоящему времени в PDB банке среди более сотни пространственных структур природных и генно-инженерных вариантов лакказ из различных источников грибы-аскомицеты представлены только двумя организмами *M. albomyces* и *T. arenaria*. Кроме того, ферменты из аскомицетов характеризуются низкой аминокислотной гомологией с лакказами из других организмов. Это обстоятельство, а также хорошие технологические характеристики представителя лакказ из аскомицетов, *B. aclada* - устойчивость к ингибированию хлорид-ионами и высокий редокс-потенциал, обуславливают актуальность его детального изучения.

Следует отметить, что BaL – непростой объект для структурных исследований. Это гликопротеин, обладающий высокой молекулярной массой (~ 100 kDa) и требующий проведения трудоемкого процесса дегликозилирования для получения качественных монокристаллов пригодных для рентгеноструктурного анализа.

В работе диссертанта рентгеновскими методами установлены пространственные структуры природной формы фермента BaL (543 аминокислотных остатка), его мутанта с заменой в T1 центре остатка лейцина 499 на метионин, а также его комплексов с солями одновалентной и двухвалентной меди, CuCl и CuSO₄. Все белковые объекты кристаллизуются в моноклинной группе симметрии C2 и содержат около 4200 атомов в

независимой части ячейки. Три из четырех структур установлены с высоким разрешением $< 2\text{Å}$. Величины R факторов кристаллографического уточнения указывают на высокое качество полученных структур. Интерпретация структурных данных сомнений не вызывает.

Показано, что природный фермент BaL и его замещенные аналоги BaL-Leu499Met, BaL-Cu⁺ и BaL-Cu²⁺ имеют трехдоменную структуру с близкой β -сэндвичевой укладкой полипептидной цепи каждого домена. Установлены все углевод-связывающие центры с идентификацией состава остаточных после дегликозилирования фрагментов углеводных цепей. Проведен тщательный анализ различий полученных структур с акцентом на субстрат и медь-связывающие центры T1 и T2/T3. С высокой точностью локализованы положения, заселенность и координационные связи ионов меди. Установлено, что снижение редокс потенциала на 140 мВ при замене аксиального лейцина 499 на метионин в T1-центре BaL связано с образованием координационной связи Cu1 – S ^{δ} (Met499). Анализ структур полученных при вымачивании BaL в растворах солей CuCl и CuSO₄ выявил предпочтительность встраивания в T2 центр одновалентной меди Cu⁺ с последующим разворотом боковой цепи координационного остатка His429 от иона меди T3 центра к иону меди T2 центра. Стереохимический анализ двух заполненных молекулами воды функциональных каналов, соединяющих T2/T3 медь содержащий кластер с поверхностью белка, позволил автору сделать структурно обоснованный вывод о их роли в связывании ионов меди и повышенной резистентности к ингибированию хлорид-ионами.

Полученные структурные результаты получили хорошее подкрепление биохимическими исследованиями изучаемых объектов. Детально изучены pH зависимые каталитические и кинетические свойства BaL с использованием разных субстратов и ингибиторов. Положительное впечатление оставляет сравнение структуры BaL с лакказами из других источников.

При ознакомлении с работой замечено незначительное число опечаток. Так на стр. 5 вместо «восстановление молекулы кислорода до воды» написано «окисление молекулы кислорода до воды». Можно высказать также некоторые замечания, имеющие характер пожеланий. В работе установлены достаточно тонкие структурные изменения в активных медь связывающих центрах при замене Leu499 на Met в T1 центре, а также при посадке иона одновалентной меди в T2 центре. При этом, на основе громадного экспериментального объема по данному классу ферментов было бы полезно обсудить возможные конкурирующие изменения аналогичного масштаба в активных центрах при дегликозилировании фермента. И наконец, на основе полученных и имеющихся в литературе структурных данных было бы желательно смоделировать связывание субстрата

в субстрат-связывающем центре и попытаться в критическом плане рассмотреть стереохимические особенности, отвечающие за его связывание. Эти замечания носят частный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность выносимых на защиту положений и сделанных выводов.

Очевидно, несмотря на заверченный характер диссертации, работы в этом направлении, по-видимому, будут продолжены. В этой связи, представляется целесообразным дальнейшее развитие структурно-функционального аспекта работы на базе уже полученного структурного материала по лакказе *BaL*. В частности, было бы целесообразно уже экспериментальными методами рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза детально изучить специфичность связывания субстрата ее взаимосвязь с каталитической активностью.

В целом представленная к защите работа очень объемная, выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием современных рентгеноструктурных, физико-химических и биохимических методов. Полученные результаты изложены подробно и корректно интерпретированы. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Диссертация хорошо читается и прекрасно иллюстрирована. Автореферат и публикации соискателя полностью отражают содержание диссертации. Рецензируемая работа является законченным исследованием, обладающим несомненной новизной и существенной научной значимостью. Основные результаты работы изложены в двух публикациях в журналах, входящих в Перечень ВАК РФ, а также представлены в материалах трех международных конференций.

Полученные результаты могут быть использованы на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова и в Учреждениях Российской академии наук: Институте биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте цитологии РАН, Институте эволюционной физиологии и биохимии РАН.

Диссертационная работа Осипова Евгения Михайловича «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *botrytis aclada*», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является законченным научным исследованием, которое соответствует требованиям изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительством Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, профилю диссертационного совета Д002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии

наук». Работа отвечает всем требованиям предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия. Ее автор, Евгений Михайлович Осипов, заслуживает присуждения искомой степени.

Диссертация Е.М. Осипова и отзыв были заслушаны на семинаре лаборатории рентгеноструктурного анализа Института биоорганической химии РАН 27 февраля 2017 г.

Заведующий лаборатории рентгеноструктурного анализа
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук (ФГБУ ИБХ РАН).
Доктор химических наук.

« 1 » марта 2017 г.



В.З. Плетнев