

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Осипова Евгения Михайловича «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *Botrytis aclada*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия**

Интерес к изучению лакказ не утихает на протяжении почти полутра веков. Это неудивительно, так как лакказы представляют собой сравнительно редкую группу ферментов, катализирующих прямое восстановление кислорода воздуха до воды, а с другой, - обладают целым набором свойств, привлекательных для их практического применения (высокая стабильность, отсутствие необходимости в использовании дорогих или нестабильных кофакторов, широкая субстратная специфичность, возможность окисления субстратов со сравнительно высоким редокс-потенциалом в присутствии т.н. медиаторов, и др.). Несмотря на длительную историю изучения лакказ, остаются неясными многие вопросы структурной организации, каталитических особенностей, регуляции экспрессии соответствующих генов, действие ингибиторов и пр. Выбор лакказы гриба-аскомицета *Botrytis aclada* в качестве объекта исследования свидетельствует о понимании автором наличия и характера дефицита знаний в описываемой области науки. Так, лакказы аскомицетов в сравнении с лакказами грибов-базидиомицетов и даже с лакказами бактерий, открытых значительно позже, заметно хуже изучены, особенно в структурном отношении. В ряду прочих лакказ аскомицетов немногие известные ферменты грибов рода *Botrytis* также вызывают особый интерес из-за необычно высокой степени гликозилирования и олигомерной структуры. Наконец, фермент из *B. aclada* устойчив к действию хлорида, известного ингибитора лакказ, а также относится к высокредокспотенциальным лакказам, что весьма нетипично для лакказ аскомицетов. Все вышесказанное свидетельствует об актуальности темы работы.

В представленной работе автор провел сравнительное изучение рекомбинантной лакказы из *B. aclada* (BaL) и ее мутантной формы с замещенным аксиальным остатком лейцина на метионин в медном металлоцентре T1 активного центра, полученных от коллег из Австрии. В частности, были изучены кинетические свойства обеих форм фермента; проведена подготовка к проведению кристаллизации (уточнение степени дегликозилирования, доочистка и определение условий для перевода фермента в димерную форму); подобраны условия получения кристаллов дегликозилированных ферментов, пригодных для рентгеноструктурного анализа; из-за потери атома меди в металлоцентре T2

при кристаллизации, были получены комплексы VaL с  $\text{Cu}^+$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ; проведен сбор дифракционных данных и решены трехмерные структуры T2-деплецированной формы лакказы, ее комплексов с  $\text{Cu}^+$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , и мутантной формы.

Диссертация построена по обычной схеме, включающей разделы: «Введение», «Обзор литературы» 45 стр., «Материалы и методы» 8 стр., «Результаты и обсуждение» 33 стр., «Заключение», содержащее выводы, и «Список литературы» 159 ссылок. Общий объем диссертации 108 стр., она содержит 19 таблиц и 35 рисунков.

Раздел «Введение» содержит общие сведения проведенном исследовании, включая описание актуальности, научной новизны и практической значимости работы, формулировки цели и задач исследования.

«Обзор литературы» посвящен описанию распространения лакказ в природе, физико-химических и каталитических свойств, современных представлений о структуре лакказ и сведений о лакказе *B. aclada*. Особенно подробно представлены сведения о современных знаниях в области строения трехдоменных лакказ, что является основным предметом изучения в экспериментальной части работы. Автор хорошо владеет материалом, все вопросы, затронутые в экспериментальной части работы, проиллюстрированы в должной мере. Обращает на себя внимание стиль изложения, сочетающий информативность и разумную краткость.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание ферментных препаратов, использованных в работе, перечень использованных методов и процедур. Методики представлены с необходимой для воспроизведения детализацией.

Раздел «Результаты и обсуждение» оформлен корректно, с четким разделением описания экспериментов, проведенных автором, и их сопоставлением с данными, известными из литературы. Основными достижениями работы являются: - кристаллизация и решение пространственных структур рекомбинантной лакказы *B. aclada* ее комплексов с  $\text{Cu}^+$  и  $\text{Cu}^{2+}$ , и мутантной формы; - доказательство на примере трехдоменной лакказы гриба-аскомицета ранее известной гипотезы о влиянии аксиального аминокислотного остатка на величину окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) лакказы. В частности, автор убедительно доказывает, что снижение ОВП с 750 mV у рекомбинантной лакказы *B. aclada* до 580 mV у мутантного фермента является, преимущественно, следствием замены лейцина на метионин в положении 499 в микроокружении атома меди металлоцентра T1 в активном центре фермента; - объяснение хлорид-резистентности фермента присутствием в канале, ведущем к T2 центру остатка аспарагиновой кислоты, способного вызвать электростатическое отталкивание хлорид-иона, а также воздействием характерного для

лакказ аскомицетов N-концевого фрагмента затрудняющего попадание хлорид-иона в этот канал. Отдельно следует отметить детальное описание углеводной компоненты лакказы *B. aclada*. После дегликозилирования фермента, специфическое окрашивание на углеводы все еще давало позитивную реакцию. Построение пространственной модели обнаружило остаточные цепи N-гликозилирования, защищенные от гликозидаз расположением в углублении на поверхности белка или стабилизацией за счет формирования дополнительных водородных связей, а также один сайт O-гликозилирования (сформированного, вероятно, вследствие экспрессии гена лакказы в организме *Pichia pastoris*). Приведенный результат отражает надежность и доказательность результатов анализа пространственных моделей ферментов в целом и тщательность проведения анализа построенных структур автором, - ранее, остаточное гликозилирование после N-дегликозилирования у лакказ однозначно трактовалось как наличие O-гликозилирования (Perry et al., J.Gen.Microbiol, 1993, 139, 171-8). Представленные результаты хорошо проиллюстрированы, выводы адекватны полученным результатам.

Научная новизна полученных результатов определяется тем, что определение пространственных структур указанных форм ферментов с высоким разрешением; получение лакказы *B. aclada* с отсутствующим атомом меди в T2 центре и последующее встраивание атома меди состав этого центра с помощью вымачивания кристаллов в присутствии иона  $\text{Cu}^+$ ; объяснение хлорид-резистентности лакказы на основе анализа пространственной структуры фермента были проведены впервые. Вновь полученные сведения вносят существенный вклад в понимание взаимосвязи структурной организации лакказ и их каталитического действия.

Углубление знаний в отношении лакказы *B. aclada* делает этот фермент потенциальным инструментом в биотехнологии: уже описанные свойства лакказ дополняются высоким ОВП и хлорид-резистентностью.

Результаты работы опубликованы в двух рецензируемых статьях зарубежного издательства (Acta Crystallographica). Диссертация написана внятно и просто, хорошо проиллюстрирована, аккуратно оформлена. Сама работа отличается строгим логическим построением, применением самых современных методических подходов, тщательностью анализа, выверенностью результатов и является глубоким научно-квалификационным исследованием. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации, в меру краткое описание экспериментальной работы позволяет оценить и достоинства исследования, и достоверность сформулированных выводов.

Диссертационная работа Евгения Михайловича Осипова «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *Botrytis aclada*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия является законченным научно-квалификационным исследованием и соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, и профилю диссертационного совета Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основа биотехнологии» Российской академии наук». Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

**Леонтьевский А.А.**

Адрес: 142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д.5  
Тел.: +7(495)9563370; эл.почта: leont@ibpm.pushchino.ru  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина  
Российской академии наук» (ИБФМ РАН)  
Заведующий лабораторией микробной энзимологии,  
доктор биологических наук по специальности 03.00.04 – Биохимия

Подпись Леонтьевского А.А. заверяю  
Ученый секретарь ИБФМ РАН  
д.б.н. Решетилова Т.А.  
Тел.: +7(4967)730844, эл.почта: rta@ibpm.pushchino.ru



Дата: 03.03.2017 г.