

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Евгения Михайловича Осипова на тему «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *BOTRYTIS ACLADA*», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04-Биохимия

Диссертационная работа Евгения Михайловича Осипова посвящена сравнительному структурно-функциональному исследованию лакказы из гриба-аскомицета *Botrytis aclada* (BaL) и мутантной формы фермента Leu499Met (L499M BaL), содержащей замену аксиального остатка лейцина у иона меди в центре T1 на метионин. Целью работы было установить структурные основы устойчивости этой лакказы к ингибированию галогенид-ионами и проследить влияние мутации на функционально важные свойства фермента – величину редокс потенциала и каталитические свойства.

Лакказы, найденные в грибах, насекомых, бактериях и археях, принадлежат к семейству медь-содержащих оксидаз, к которому относятся также аскорбатоксидаза, билирубиноксидаза, церудоплазмин. Лакказы катализируют окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с одновременным восстановлением молекулярного кислорода до воды. Простейшие представители семейства медь-содержащих оксидаз, лакказы содержат в активном центре четыре иона меди, которые расположены в центре T1 и кластере T2/T3. Ряд лакказ относятся к гликопротеинам и содержит в молекуле до 40% углеводов. В различных организмах они выполняют разные роли: в растениях участвуют в снятии стресса, в насекомых - в процессах, сопровождающих размножение, в грибах обеспечивают переработку продуктов метаболизма. Лакказы из грибов, имеющие наиболее высокий редокс-потенциал, играют ключевую роль в биодеградации лигнина – одного из самых устойчивых к химическому и микробиологическому разложению биополимеров. Благодаря способности окислять широкий круг фенольных соединений, таких как азокрасители, инсектициды и гербициды, лакказы

перспективны для использования в биотехнологических процессах, в том числе связанных с переработкой производственных отходов, применяются в системах детоксификации и деградации ксенобиотиков, ремедиации загрязнённых территорий. Способность лакказ переносить электроны непосредственно с электрода на субстрат делает их привлекательными объектами для разработки топливных элементов нового поколения, а также для разработки миниатюрных источников питания для медицинских имплантатов. Важным преимуществом лакказ при биотехнологическом применении является образование воды в качестве второго продукта реакции.

Для практического применения наиболее пригодны ферменты, имеющие высокий редокс-потенциал, сохраняющие активность в широком диапазоне pH, устойчивые к действию ингибиторов. Поэтому свойства и механизм действия лакказ интенсивно изучаются.

Для ряда ферментов определены физико-химические, кинетические и электрохимические характеристики, методом рентгеноструктурного анализа установлено пространственное строение, описано расположение и ближайшее окружение ионов меди в активном центре. Однако до сих пор не выяснены особенности строения, ответственные за такие функционально важные характеристики ферментов, как величина редокс-потенциала и устойчивость к действию галогенид-ионов. Поэтому поставленная в диссертации задача: определить пространственные структуры рекомбинантной лакказы из аскомицетов *B. aclada* (BaL) и её мутантной формы L499M BaL, содержащей замену аксиального иона меди в центре T1, оценить влияние природы аксиального остатка на редокс-потенциал и функциональное поведение фермента и исследовать структурные основы этого влияния является весьма актуальной.

Известно, что различающиеся по редокс-потенциалу и по устойчивости к действию ингибиторов лакказы из бактерий и грибов имеют разные аминокислотные остатки в аксиальном положении иона меди в T1-центре. В бактериальных ферментах с низким редокс-потенциалом положение вариабельного аксиального остатка занимает боковая цепь метионина, в то

время как в грибных лакказах с более высоким редокс-потенциалом это положение занимает остаток лейцина или фенилаланина.

Выбранная для сравнительного структурно-функционального исследования лакказа из гриба-аскомицета *Botrytis aclada* (BaL) имеет высокий редокс-потенциал T1 центра и от других грибных и бактериальных лакказ отличается повышенной устойчивостью к хлорид-ионам.

Диссертантом охарактеризованы кинетические параметры нативной и мутантной форм фермента в широком интервале pH. Для основной и мутантной формы измерены редокс-потенциалы T1 центра (720 и 580 мВ соответственно). Обнаружено снижение редокс-потенциала мутантной формы на 140 мВ. Более высокая скорость реакции, наблюдаемая при катализе основной формой коррелирует с её более высоким редокс-потенциалом. Изучены параметры ингибирования фермента ионами хлора и фтора в интервале pH, где фермент проявляет каталитическую активность. Подтверждена высокая устойчивость основной формы к действию хлорид-ионов. Показано, что устойчивость мутантной формы к действию ионов хлора значительно ниже.

Диссертантом получены кристаллы и проведено рентгеновское исследование структур нативной и мутантной форм фермента. Для кристаллизации и структурного исследования были использованы дегликозилированные формы фермента, поскольку гликопротеины с высоким содержанием углеводных цепей как правило не дают кристаллов требуемого дифракционного качества. Предварительно, с использованием метода гель-фильтрации диссертант оценил олигомерное состояние фермента в буферах разного состава и выбрал для кристаллизации условия, обеспечивающие минимальную степень агрегации белков и наиболее подходящие для образования кристаллов.

Дифракционные наборы высокого разрешения, собранные автором от выращенных кристаллов на синхротронном источнике Курчатовского национального центра, были использованы им для решения пространственных структур нескольких форм фермента методом молекулярного замещения. Было обнаружено, что в структурах нативной и мутантной форм фермента отсутствует ион меди в центре T2, удалённый в

при дегликозилировании. Диссертант разработал условия для введения иона меди в T2 деплецированную форму BaL, настаивая кристаллы с солями одновалентной меди, и определил структуру восстановленной формы (BaLCu<sup>+</sup>). Координаты трёх структур (BaL, BaLCu<sup>+</sup>, L499M BaL) установленные при высоком разрешении, были депонированы в Международный банк белковых структур.

Детальный анализ полученных трёхмерных структур и их сравнение между собой и с известными структурами лакказ из других источников проведён автором с использованием программ Coot и PyMol. Были исследованы и описаны укладка полипептидной цепи в молекуле фермента, расположение ионов меди в центре T1 и кластере T2/T3, координационные сферы ионов меди. Установлен состав и локализовано положение углеводных цепей, сохранившихся в дегликозилированном ферменте. Исследована упаковка молекул фермента в кристаллизационной решётке.

Проведённый анализ полученных структур позволил выявить ряд корреляций между структурой и функциональными характеристиками фермента. Обнаружено, что пространственные структуры мутантной формы и исходного фермента одинаковы и отличаются только аминокислотными остатками в аксиальном положении и геометрией координационной сферы иона меди в центре T1. Показано, что замена лейцина на метионин сопровождается смещением иона меди из плоскости, образованной координирующими лигандами, в направлении атома серы метионина и перестройкой тригональной координационной сферы иона меди в искажённую тетраэдрическую. При этом образуется координационная связь между атомом меди T1 и атомом серы метионина. Так как других различий между структурами исходного белка и мутанта не было обнаружено, автор предполагает, что изменение координационной сферы иона меди в центре T1 при замене аксиального лиганда, является одним из факторов, влияющих на величину редокс-потенциала и кинетические параметры обеих форм.

Диссертант обнаружил также особенности строения молекулы BaL, могущие влиять на устойчивость фермента к ингибированию ионами

хлора. Ранее было показано, что ионы хлора связываются с ионом меди T2 центра, замещая молекулу воды, доступ к которой осуществляется через канал, ведущий от поверхности фермента к T2 центру. В структуре лакказы BaL, как и в структурах других белков из аскомицетов, устье канала на поверхности фермента оказалось прикрытым N-концевым фрагментом полипептидной цепи, отсутствующим у лакказ из базидиомицетов. Проведённое автором сравнение аминокислотных последовательностей, образующих данный канал в лакказах из аскомицетов, показало присутствие остатка аспарагиновой кислоты на входе в канал, который отсутствует у белков из базидиомицетов. Это позволило предположить, что депротонированный остаток аспарагиновой кислоты может препятствовать проникновению в канал отрицательно заряженных ионов хлора.

Результаты проведённых работ изложены на 108 страницах диссертации, которая включает «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Список литературы» и содержит 35 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 159 цитированных источников. Реферат полностью отражает содержание диссертации.

В проведённом исследовании автором получен ряд новых значимых результатов, которые вносят вклад в понимание структурных механизмов, регулирующих величину редокс потенциала лакказ и устойчивость к ингибированию ионами хлора. Автором впервые установлены пространственные структуры трёх форм лакказы и изучено встраивание меди в T2 центр деплецированной формы BaL. Результаты работы могут быть использованы при инженерии новых мутантных форм фермента для практического применения. При выполнении работы автор продемонстрировал владение рядом современных биохимических и физических методов исследования макромолекул, включая рентгеноструктурный метод, при анализе результатов исследования – высокий уровень теоретической подготовки. Выводы хорошо обоснованы, достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. Материалы диссертационной работы представлены в двух статьях в

ведущих рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных, доложены на трёх конференциях, российских и международных.

Работа не лишена некоторых недостатков.

В описании экспериментов по определению кинетических параметров отсутствует графическое представление экспериментальных результатов, приведены только рассчитанные константы.

Остаётся не ясным, насколько воспроизводимы результаты кинетических измерений, если центры связывания ионов меди в исследуемых образцах не полностью заполнены.

Существенно затрудняет понимание текста отсутствие отдельных обозначений, позволяющих различить гликозилированные и негликозилированные препараты фермента.

При описании рентгеноструктурного эксперимента не указано, что структуры решены методом молекулярного замещения и не назван белок, использованный в качестве стартовой модели.

В литературном обзоре (стр. 50) указано, что известна мутантная форма бактериальной лакказы *B. subtilis* Met502Leu, содержащая замену аксиального метионина в T1 центре на лейцин. Было бы интересно в обсуждении результатов сравнить влияние такой замены на свойства бактериального фермента и сопоставить с влиянием «обратной» мутации L499M на свойства BaL.

Получение пригодных для структурного исследования кристаллов фермента следовало бы внести в список результатов работы.

Тем не менее, сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Осипова Е.М., которая является научно-квалификационной работой, содержащей решение важной биохимической задачи и полностью соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор, Осипов Евгений Михайлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04-Биохимия

Официальный оппонент

Куранова Инна Петровна

Адрес: 119333 Москва, Ленинский проспект, д. 59

Тел.: 8 (499) 135-62-20; e-mail: inna@ns.crys.ras.ru

Федеральный научно-исследовательский центр

«Кристаллография и фотоника»

Российской академии наук

Главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа  
и синхротронного излучения

Доктор химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая  
химия, химия природных и физиологически активных веществ

Подпись д. х. н. И.П. Курановой заверяю

Учёный секретарь ФНИЦ

«Кристаллография и фотоника» РАН

к. ф.-м. н.

Тел. 8 926 3979146

Email: cp-secr@crys.ras.ru



Дьякова Ю.А.

04 марта 2017г