

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №__

Решение диссертационного совета от «23» марта 2017 г. № 2 о присуждении

Осипову Евгению Михайловичу, гражданство Российская Федерация,

учёной степени кандидата химических наук.

Диссертация «Структурно-функциональная характеристика хлорид-резистентной лакказы из *Botrytis aclada*» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 12 января 2017 года (протокол № 1) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк.

В июне 2010 г. Осипов Евгений Михайлович окончил Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московскую Государственную Академию тонкой химической технологии им М.В.Ломоносова по специальности «Химия и технология биологически активных соединений» и в ноябре 2011 года поступил в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, где проходил обучение по ноябрь 2015 года. С 2010 года работал в должности младшего научного сотрудника Института биохимии им. А.Н. Баха, а с 2016 года продолжил работу в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертационную работу Осипов Е.М. выполнял в лаборатории инженерной энзимологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Попов Владимир Олегович, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заведующий лабораторией инженерной энзимологии;

Поляков Константин Михайлович, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии.

Официальные оппоненты:

Леонтьевский Алексей Аркадьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской Академии Наук, заведующий лабораторией микробной энзимологии;

Куранова Инна Петровна, доктор химических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения.

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) в своём положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией рентгеноструктурного анализа доктором химических наук Плетнёвым Владимиром Захаровичем, указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, Осипов Е.М., заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук Леонтьевский Алексей Аркадьевич является известным специалистом в области изучения структуры и функций лакказ; доктор химических наук Куранова Инна Петровна является признанным специалистом в области рентгеноструктурного анализа макромолекул. Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися

исследованиями в области рентгеноструктурного анализа, структуры и функции ферментов, а также наличием высококвалифицированных специалистов, проводящих исследования в данной области.

Соискатель имеет 5 опубликованных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Osipov E. M., Polyakov K. M., Kittl R., Shleev S. V., Dorovatovskii P. V., Tikhonova T. V., Hann, S., Ludwig R., Popov V. O. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties // Acta Cryst. Section D, 2014, Vol. 70, № 11, P. 2913-2923

2. Osipov E. M., Polyakov K. M., Tikhonova T. V., Kittl R., Dorovatovskii P. V., Shleev S. V., Popov V. O., Ludwig R. Incorporation of copper ions into crystals of T2 copper-depleted laccase from *Botrytis aclada* // Acta Cryst. Section F, 2015, P. 1465-1469

Результаты работы также были представлены на 3-х международных конференциях.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Леонтьевского А.А. (положительный) не содержал замечаний

Отзыв официального оппонента доктора химических наук Курановой И.П. (положительный) содержал следующие замечания:

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

Остаётся неясным, 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 Val.

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

Отзыв ведущей организации **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (положительный)**

Отзыв содержал следующие замечания:

На стр. 5 вместо «восстановление молекулы кислорода до воды» написано «окисление молекулы кислорода до воды».

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. На основе громадного экспериментального объема по данному классу ферментов было бы полезно обсудить возможные конкурирующие изменения аналогичного масштаба в активных центрах при дегликозилировании фермента.

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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

- 1) ведущего научного сотрудника лаборатории КК Научно-исследовательского центра «Курчатовский Институт» кандидата физико-математических наук Качаловой Галины Сергеевны;

В отзыве приведено следующее замечание:

В работе встречаются некоторые стилистические недостатки изложения полученных данных.

- 2) старшего научного сотрудника группы структурного исследования рибосомных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук, кандидата физико-математических наук Габдулхакова Азата Габдрахмановича;

В отзыве приведены следующие замечания:

- Наблюдается небрежность в оформлении автореферата. Так на страницах 14 и 15 рисунки имеют одинаковый номер. Имеются разрывы фраз, не все элементы рисунков и диаграмм четко обозначены, что вызывает трудности в восприятии результатов.
 - В тексте используется сленг и англоязычные термины, например “деплецированной” (автореферат стр. 5), хотя в русском языке есть подходящий синоним “лишенной”.
 - Программы, в которых проводилась обработка дифракционных данных, решение и уточнение структур (страница 12) не упоминаются.
 - Не понятна причина обрезки данных высокого разрешения до 1.83 ангстрем для набора $BaLCu^{2+}$, хотя судя по показателям разрешение данного набора можно было увеличить до 1.5 ангстрем (страница 16).
 - Место встраивания пятого иона меди в структуре $BaLCu^{+}$, описанного в таблице 2, не указано.
- 3) начальника лаборатории КК Научно-исследовательского центра «Курчатовский Институт», кандидата химических наук Ракитиной Татьяны Владимировны

В отзыве приведено следующее замечание:

На страницах 14 и 15 рисунки имеют одинаковый номер.

В дискуссии приняли участие:

Доктор биологических наук В.П. Вейко

Доктор химических наук А.П. Сеницын

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Структуры лакказы из *Botrytis aclada* (BaL), мутанта L499M BaL, комплексов BaL с $CuCl$ и $CuSO_4$ решены и уточнены с разрешением 1.67, 1.7, 2.3 и 1.8 Å. Структуры лакказы BaL и мутанта L499M BaL не содержат иона меди в центре T2. Встраивание иона меди в T2 центр деплецированной формы BaL происходит только при использовании солей Cu^{+} .
- Структуры BaL и L499M BaL различаются исключительно строением T1 центра, в связи с чем снижение редокс потенциала T1 центра на 140 мВ можно связать с заменой аксиального остатка Leu499 на метионин.
- Изучены каталитические свойства BaL и ее L499M мутанта. Мутант L499M BaL менее активен, чем BaL, что коррелирует с более низким значением редокс потенциала T1 центра мутанта.

- Особенности строения канала, ведущего от поверхности к иону меди T2 у лакказ из аскомицетов, позволяют объяснить их хлорид-резистентность. Присутствие в канале консервативного для лакказ из аскомицетов остатка аспарагиновой кислоты препятствует проникновению хлорид-ионов в канал за счет электростатического отталкивания. Наличие у лакказ из аскомицетов N-концевого фрагмента, прикрывающего вход в канал, дополнительно затрудняет проникновение хлорид-ионов в канал.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Методом рентгеноструктурного анализа впервые определена структура рекомбинантной BaL и мутанта L499M BaL с высоким разрешением. Сходство структур BaL и мутантной формы L499M BaL позволяет связать наблюдаемые изменения в редокс потенциале и кинетических характеристиках мутантной формы исключительно с введением в аксиальное положение T1 центра атома серы метионина. Впервые были получена структура деплецированной (depleted) по иону меди T2 (T2Д) формы лакказы из аскомицетов. Впервые для лакказ из аскомицетов проведено встраивание ионов меди в T2 центр T2Д формы лакказы обработкой кристаллов солями Cu^+ . Показана возможность обратимого перестроения T2/T3 кластера при встраивании ионов меди. Впервые проведен анализ структурных особенностей лакказ из аскомицетов, которые могут определять их устойчивость к ингибирующему действию хлорид-ионов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Лакказы обладают большим биотехнологическим потенциалом. Результаты работы могут быть полезны специалистам, занимающимся исследованиями лакказ и практическим применением этих ферментов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- используемые методики исследования и проведённые расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты работы

Личный вклад соискателя состоит в:

получении всех экспериментальных данных либо соискателем самостоятельно, либо при его непосредственном участии; обработке и интерпретации экспериментальных данных; участии в апробации результатов исследования; подготовке публикаций по выполненной работе.

