

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

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 10 октября 2019 г. № 22
о присуждении Глазуновой Ольге Александровне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 27.05.2019 г. (протокол № 15) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк, от 10.02.2014 г. №55/нк, от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 г. № 222/нк.

Соискатель

Глазунова Ольга Александровна (1988 года рождения) в июне 2011 г. окончила Московскую государственную академию тонкой химической технологии им. Ломоносова по специальности «Химическая технология и биотехнология», и в ноябре 2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (с июля 2015 г. входит в состав Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»), где проходила обучение по ноябрь 2015 г. С 2011 г. и по настоящее

время работает в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационную работу соискатель Глазунова О.А. выполняла в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Ярополов Александр Иванович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Поляков Константин Михайлович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Куранова Инна Петровна, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»;

Лисов Александр Викторович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научным вопросам Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, Куранова Инна Петровна является одним из ведущих отечественных специалистов в области кристаллографии и рентгеноструктурного анализа;

тем, что кандидат биологических наук, Лисов Александр Викторович является одним из ведущих отечественных специалистов в области биохимии и энзимологии;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Глазуновой Ольги Александровны.

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 своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, зав. лабораторией рентгеноструктурных исследований биополимеров Плетневым Владимиром Захаровичем и утвержденном директором ИБХ РАН академиком Габировым Александром Габировичем, указала, что диссертационная работа Глазуновой Ольги Александровны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Глазунова Ольга Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук специальности – 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в ИБХ РАН активно ведутся исследования в области изучения структуры и функции белков. Таким образом, сотрудники ИБХ РАН и, в частности, лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны изложены в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzeev S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes

Antrodiella faginea and *Steccherinum murashkinskyi* // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, Vol. 118, P. 406–418.

2. **Glazunova O.A.**, Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13(6), e0197667.

3. **Glazunova O.A.**; Trushkin N.A.; Moiseenko K.V.; Filimonov I.S.; Fedorova T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // *Catalysts*, 2018, Vol. 8 (152).

4. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova, S., Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Popov A.N., Koroleva O.V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism // *Acta Crystallogr. D*, 2017, Vol. D73(5), P.388–401.

5. **Glazunova O.A.**, Moiseenko K.V., Kamenihina I.A., Isaykina T.U., Yaropolov A.I., Fedorova T.V. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: does glycosylation matter? // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20(8): 2008.

6. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Fedorova T.V., Dorovatovskii P.V., Koroleva, O.V. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. D*, 2015, Vol. 71(4), P. 854-861.

7. Федорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., **Глазунова О.А.**, Малошенко Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королева О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2013, Т. 49(6), С. 570-580.

Результаты работы также были представлены на 7 международных и 2 всероссийских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности на 5-ом Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016); *International Conference OxiZymes* (Вена, 2014); *43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)*, (Прага, 2018), *VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды"* (Москва, 2017); *International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications* (Москва, 2013); *38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)* (St. Peterburg, 2013), *The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS)* (Leipzig, 2013); *International Conference OxiZymes* (Marseille, 2012).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, **Курановой Инны Петровны** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- При исследовании степени доступности консервативных участков петель во второй координационной сфере центра T1 не указано как именно рассчитана доступная площадь поверхности.
- При введении иона меди Cu²⁺ в центр T2/T3 лакказы *S. caperata* диссертант использовал настаивание кристаллов в криорастворе, содержащем насыщенную концентрацию соли CuCl. При этом наблюдалось снижение дифракционного качества кристалла, а в молекуле фермента обнаружены дополнительные места связывания ионов меди. Не следует ли из этого, что концентрация соли при настаивании слишком высока и ее следовало бы снизить, чтобы замедлить разрушение кристалла?
- На рисунке 10 (стр. 34) пропущены индексы, приведенные в подписи.
- В таблице 10 (стр. 76) значение полноты набора для последнего слоя лакказы *S. murashkinskyi* превышает среднее значение по набору.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук **Лисова Александра Викторовича** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- В качестве пожелания хотелось бы указать необходимость более подробного освещения в «Литературном обзоре» реакций лакказ с участием медиаторов, поскольку данные реакции имеют большое фундаментальное и прикладное значение.
- Допущены некоторые неточности в оформлении текста диссертации. В таблице 9 не указана размерность величин, указанных в столбцах. В подписи к рисунку 24 не указано, что именно обозначено желтым цветом.

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 содержит следующие вопросы и замечания:**

- В ходе ознакомления с диссертационной работой Глазуновой Ольги Александровны серьезных недостатков выявлено не было. Можно лишь сделать небольшие

замечания касательно некоторых стилистических погрешностей, наличие которых, однако, не носит принципиального характера и не влияет на общую высокую оценку диссертационной работы. Очевидно, несмотря на заверченный характер диссертации, работа в этом направлении, по-видимому, будет продолжена. В этой связи, представляется целесообразным дальнейшее развитие структурно-функционального аспекта работы на базе уже полученного структурного материала. В частности, было бы целесообразно уже экспериментальными методами рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза детально изучить специфичность связывания субстрата и ее взаимосвязь с каталитической активностью.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Козлова Дмитрия Георгиевича, кандидата биологических наук, зав. лабораторией систем экспрессии генов НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика, **замечаний нет.**

Родиной Елены Валерьевны, кандидата химических наук, доцента кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

- Единственное замечание, которое хотелось бы высказать, касается части, посвященной получению и характеристике исходных белковых препаратов. На мой взгляд, она написана слишком сжато, а те результаты, которые все-таки приведены, недостаточно проанализированы. В частности, из текста неясно, для чего определяли массовое содержание сахаров в препаратах и согласуется ли эта информация с содержанием и природой сахаров, видимых в структурах. Нигде не указана катализируемая реакция и не обсуждается судьба органического субстрата, что может быть весьма важно как для интерпретации каталитических параметров, так и в свете предполагаемого практического использования новых лакказ. Высказанное замечание касается стиля оформления автореферата и не умаляет достоинств работы в целом.

Абдуллатыпова Азата Вадимовича, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, ФИЦ "Пущинский научный центр РАН". **В отзыве имеются следующие вопросы:**

- Коль скоро автор расположила продуцентов лакказ по окислительно-восстановительному потенциалу и по экологическим группам так: первичный

ксилотроф (более 700 мВ), фитопатоген (700 мВ), вторичный ксилотроф (600-700 мВ), гумусовый сапротроф (550 мВ), а также провела сравнительный анализ 4 лакказ по субстратной специфичности, то не могла бы она пояснить, какие именно реакции, катализируемые лакказами, могут играть определяющую роль в каждой из этих экологических групп?

- Насколько можно сравнить циклотроны DESY и Сибирь по качеству получаемых дифракционных картин (разрешению, R-фактору)?
- Согласно данным, полученным Ольгой Сергеевной Савиновой, на которые я тоже писал отзыв, у *Trametes hirsuta* 072 семь изоформ лакказ, хотя обычно выделяется только мажорная. Брала ли Ольга Александровна мажорную изоформу, и не возникало ли в работе проблемы загрязнения другими изоформами?
- Есть также замечание по поводу актуализации темы: почему-то в разделе "Актуальность работы" говорится об одноэлектронном окислении разных соединений, хотя, на мой взгляд, лакказы примечательны именно своей способностью к четырёхэлектронному восстановлению кислорода.

Шаховой Наталии Витальевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биохимии грибов Ботанического института им В.Л. Комарова РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- В качестве замечания можно отметить не совсем удачное, на мой взгляд, название диссертации «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов». Автором, безусловно, проведена большая работа и всестороннее изучение лакказ, полученных из афиллофоровых базидиомицетов, относящихся к семейству *Steccherinaceae* (*A. faginea* и *S. murashkinskyi*) и *Polyporaceae* (*C. caperata* и *T. hirsuta*). Однако базидиальные грибы не ограничиваются только этими двумя семействами. Базидиомицеты, или базидиальные грибы подразделяют (с учетом их строения и жизненного цикла) на два подкласса. Подкласс холобазидиомицеты, включающий экзобазидиальные, афиллофоровые (к которым относятся описываемые в диссертации представители семейств *Steccherinaceae* и *Polyporaceae*), агариковые грибы и гастеромицеты. Подкласс фрагмобазидиомицеты, содержит головневые, ржавчинные, дрожалковые, аврикуляриевые, туласнелловые, дакриомицетовые грибы. Возможно, в названии диссертации было бы корректнее указать, к каким семействам принадлежат рассматриваемые в работе грибы.

Самыгиной Валерии Ролановны, кандидата Физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории РМАиСИ ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- Банк белковых данных (Protein Data Bank) назван банком трехмерных структур. Это не совсем верно. PDB содержит структуры биологических молекул. Тогда как трехмерная структура есть также у малых молекул, минералов и т.п., тем не менее, в этот банк эти данные не размещаются.

В дискуссии приняли участие:

Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. и Топунов А.Ф.

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

- Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы из базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Эти лакказы обладали средним окислительно-восстановительным потенциалом (620 и 650 мВ отн. НВЭ), высокой термостабильностью и были способны катализировать окисление ряда фенольных соединений с эффективностью, сопоставимой (либо превышающей) с лакказами из базидиомицетов *C. caperata* и *T. hirsuta* с высоким окислительно-восстановительным потенциалом.
- Сравнение скоростей ферментативного окисления фенольных соединений лакказами со средними и с высокими окислительно-восстановительными потенциалами показало, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ и фенольных красителей окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказ является определяющим фактором. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре T1 лакказ и эффективностью окисления этих субстратов, катализируемого лакказами.
- Решены с высоким разрешением пространственные структуры лакказ из *A. faginea* (1,75 Å, $R_f = 16,1\%$), *S. murashkinskyi* (0,95 Å, $R_f = 12,1\%$), лакказы *C. caperata* (1,67 Å, $R_f = 15,6\%$) с удаленным ионом меди из центра T2 и комплексов лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 с CuCl (1,98 Å, $R_f = 20,2\%$) и CuSO₄ (1,67 Å, $R_f = 16,5\%$).

- Показано, что в кристаллах лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 способны встраиваться только ионы меди в степени окисления +1. Также для препарата лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 была показана возможность восстановления активности при обработке солью CuCl в растворе. При обработке солью CuSO₄ восстановления активности не происходило.
- Для лакказ базидиомицетов было изучено влияние структуры окружения иона меди в T1 центре на его окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что доступность растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре T1 коррелирует с величиной окислительно-восстановительного потенциала лакказ. Это позволяет проводить приблизительную оценку окислительно-восстановительного потенциала лакказ с известной пространственной структурой.
- Анализ структур серии из 16 наборов дифракционных данных высокого разрешения, последовательно собранных с одного кристалла лакказы *S. murashkinskyi* с увеличивающейся дозой поглощенного рентгеновского ионизирующего излучения, позволил существенно уточнить механизм восстановления кислорода до воды в активном центре фермента.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы грибов малоизученного семейства *Steccherinaceae* *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Ранее в литературе были охарактеризованы изоформы лакказ только одного представителя этого семейства – *Steccherinum ochraceum*. Были выявлены особенности этих лакказ – среднее значение окислительно-восстановительного потенциала, повышенная термостабильность и высокое сродство к соединениям синрингильного типа. В работе предложена оценка ОВП лакказ с известной пространственной структурой на основании выявленной корреляции между ОВП лакказы и доступностью растворителю пространственно консервативной части окружения центра T1 лакказ.

Механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказами, существенно уточненный в работе, имеет важное теоретическое значение для понимания функционирования медьсодержащих оксидаз. Кроме того, в работе впервые для лакказ была установлена связь между координацией ионов меди в T2/T3 центре и их степенью окисления.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Выделенные и охарактеризованные лакказы из *A. faginea* и *S. murashkinskyi* обладают высокой термостабильностью. Обе лакказы катализируют окисление монофенольных соединений с высокой эффективностью, несмотря на то, что они обладают средним значением ОВП. Это делает их перспективными для применения в промышленных процессах, протекающих при повышенных температурах. Показанная в работе возможность реконструкции центра T2 базидиомицетной лакказы с использованием CuCl позволяет восстанавливать активность ферментов с недостаточным содержанием ионов меди в T2 центре, что особенно важно для ферментов, получаемых рекомбинантным путем.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация Глазуновой О.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается логичным построением исследования, корректной постановкой задач исследования, широким спектром современных методов исследования, использованных в работе, и публикацией результатов работы в пяти иностранных и одном отечественном издании (всего 7 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития современной биохимии и, в частности, представлений о функционировании грибных лакказ.

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

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 10 октября 2019 г. № 22
о присуждении Глазуновой Ольге Александровне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 27.05.2019 г. (протокол № 15) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк, от 10.02.2014 г. №55/нк, от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 г. № 222/нк.

Соискатель

Глазунова Ольга Александровна (1988 года рождения) в июне 2011 г. окончила Московскую государственную академию тонкой химической технологии им. Ломоносова по специальности «Химическая технология и биотехнология», и в ноябре 2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (с июля 2015 г. входит в состав Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»), где проходила обучение по ноябрь 2015 г. С 2011 г. и по настоящее

время работает в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационную работу соискатель Глазунова О.А. выполняла в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Ярополов Александр Иванович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Поляков Константин Михайлович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Куранова Инна Петровна, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»;

Лисов Александр Викторович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научным вопросам Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, Куранова Инна Петровна является одним из ведущих отечественных специалистов в области кристаллографии и рентгеноструктурного анализа;

тем, что кандидат биологических наук, Лисов Александр Викторович является одним из ведущих отечественных специалистов в области биохимии и энзимологии;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Глазуновой Ольги Александровны.

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 своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, зав. лабораторией рентгеноструктурных исследований биополимеров Плетневым Владимиром Захаровичем и утвержденном директором ИБХ РАН академиком Габировым Александром Габировичем, указала, что диссертационная работа Глазуновой Ольги Александровны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Глазунова Ольга Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук специальности – 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в ИБХ РАН активно ведутся исследования в области изучения структуры и функции белков. Таким образом, сотрудники ИБХ РАН и, в частности, лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны изложены в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzeev S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes

Antrodiella faginea and *Steccherinum murashkinskyi* // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, Vol. 118, P. 406–418.

2. **Glazunova O.A.**, Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13(6), e0197667.

3. **Glazunova O.A.**; Trushkin N.A.; Moiseenko K.V.; Filimonov I.S.; Fedorova T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // *Catalysts*, 2018, Vol. 8 (152).

4. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova, S., Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Popov A.N., Koroleva O.V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism // *Acta Crystallogr. D*, 2017, Vol. D73(5), P.388–401.

5. **Glazunova O.A.**, Moiseenko K.V., Kamenihina I.A., Isaykina T.U., Yaropolov A.I., Fedorova T.V. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: does glycosylation matter? // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20(8): 2008.

6. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Fedorova T.V., Dorovatovskii P.V., Koroleva, O.V. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. D*, 2015, Vol. 71(4), P. 854-861.

7. Федорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., **Глазунова О.А.**, Малошенок Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королева О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2013, Т. 49(6), С. 570-580.

Результаты работы также были представлены на 7 международных и 2 всероссийских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности на 5-ом Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016); *International Conference OxiZymes* (Вена, 2014); *43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)*, (Прага, 2018), *VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды"* (Москва, 2017); *International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications* (Москва, 2013); *38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)* (St. Peterburg, 2013), *The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS)* (Leipzig, 2013); *International Conference OxiZymes* (Marseille, 2012).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, **Курановой Инны Петровны** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- При исследовании степени доступности консервативных участков петель во второй координационной сфере центра T1 не указано как именно рассчитана доступная площадь поверхности.
- При введении иона меди Cu²⁺ в центр T2/T3 лакказы *S. caperata* диссертант использовал настаивание кристаллов в криорастворе, содержащем насыщенную концентрацию соли CuCl. При этом наблюдалось снижение дифракционного качества кристалла, а в молекуле фермента обнаружены дополнительные места связывания ионов меди. Не следует ли из этого, что концентрация соли при настаивании слишком высока и ее следовало бы снизить, чтобы замедлить разрушение кристалла?
- На рисунке 10 (стр. 34) пропущены индексы, приведенные в подписи.
- В таблице 10 (стр. 76) значение полноты набора для последнего слоя лакказы *S. murashkinskyi* превышает среднее значение по набору.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук **Лисова Александра Викторовича** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- В качестве пожелания хотелось бы указать необходимость более подробного освещения в «Литературном обзоре» реакций лакказ с участием медиаторов, поскольку данные реакции имеют большое фундаментальное и прикладное значение.
- Допущены некоторые неточности в оформлении текста диссертации. В таблице 9 не указана размерность величин, указанных в столбцах. В подписи к рисунку 24 не указано, что именно обозначено желтым цветом.

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 содержит следующие вопросы и замечания:**

- В ходе ознакомления с диссертационной работой Глазуновой Ольги Александровны серьезных недостатков выявлено не было. Можно лишь сделать небольшие

замечания касательно некоторых стилистических погрешностей, наличие которых, однако, не носит принципиального характера и не влияет на общую высокую оценку диссертационной работы. Очевидно, несмотря на заверченный характер диссертации, работа в этом направлении, по-видимому, будет продолжена. В этой связи, представляется целесообразным дальнейшее развитие структурно-функционального аспекта работы на базе уже полученного структурного материала. В частности, было бы целесообразно уже экспериментальными методами рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза детально изучить специфичность связывания субстрата и ее взаимосвязь с каталитической активностью.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Козлова Дмитрия Георгиевича, кандидата биологических наук, зав. лабораторией систем экспрессии генов НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика, **замечаний нет.**

Родиной Елены Валерьевны, кандидата химических наук, доцента кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

- Единственное замечание, которое хотелось бы высказать, касается части, посвященной получению и характеристике исходных белковых препаратов. На мой взгляд, она написана слишком сжато, а те результаты, которые все-таки приведены, недостаточно проанализированы. В частности, из текста неясно, для чего определяли массовое содержание сахаров в препаратах и согласуется ли эта информация с содержанием и природой сахаров, видимых в структурах. Нигде не указана катализируемая реакция и не обсуждается судьба органического субстрата, что может быть весьма важно как для интерпретации каталитических параметров, так и в свете предполагаемого практического использования новых лакказ. Высказанное замечание касается стиля оформления автореферата и не умаляет достоинств работы в целом.

Абдуллатыпова Азата Вадимовича, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, ФИЦ "Пущинский научный центр РАН". **В отзыве имеются следующие вопросы:**

- Коль скоро автор расположила продуцентов лакказ по окислительно-восстановительному потенциалу и по экологическим группам так: первичный

ксилотроф (более 700 мВ), фитопатоген (700 мВ), вторичный ксилотроф (600-700 мВ), гумусовый сапротроф (550 мВ), а также провела сравнительный анализ 4 лакказ по субстратной специфичности, то не могла бы она пояснить, какие именно реакции, катализируемые лакказами, могут играть определяющую роль в каждой из этих экологических групп?

- Насколько можно сравнить циклотроны DESY и Сибирь по качеству получаемых дифракционных картин (разрешению, R-фактору)?
- Согласно данным, полученным Ольгой Сергеевной Савиновой, на которые я тоже писал отзыв, у *Trametes hirsuta* 072 семь изоформ лакказ, хотя обычно выделяется только мажорная. Брала ли Ольга Александровна мажорную изоформу, и не возникало ли в работе проблемы загрязнения другими изоформами?
- Есть также замечание по поводу актуализации темы: почему-то в разделе "Актуальность работы" говорится об одноэлектронном окислении разных соединений, хотя, на мой взгляд, лакказы примечательны именно своей способностью к четырёхэлектронному восстановлению кислорода.

Шаховой Наталии Витальевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биохимии грибов Ботанического института им В.Л. Комарова РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- В качестве замечания можно отметить не совсем удачное, на мой взгляд, название диссертации «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов». Автором, безусловно, проведена большая работа и всестороннее изучение лакказ, полученных из афиллофоровых базидиомицетов, относящихся к семейству *Steccherinaceae* (*A. faginea* и *S. murashkinskyi*) и *Polyporaceae* (*C. caperata* и *T. hirsuta*). Однако базидиальные грибы не ограничиваются только этими двумя семействами. Базидиомицеты, или базидиальные грибы подразделяют (с учетом их строения и жизненного цикла) на два подкласса. Подкласс холобазидиомицеты, включающий экзобазидиальные, афиллофоровые (к которым относятся описываемые в диссертации представители семейств *Steccherinaceae* и *Polyporaceae*), агариковые грибы и гастеромицеты. Подкласс фрагмобазидиомицеты, содержит головневые, ржавчинные, дрожалковые, аврикуляриевые, туласнелловые, дакриомицетовые грибы. Возможно, в названии диссертации было бы корректнее указать, к каким семействам принадлежат рассматриваемые в работе грибы.

Самыгиной Валерии Ролановны, кандидата Физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории РМАиСИ ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- Банк белковых данных (Protein Data Bank) назван банком трехмерных структур. Это не совсем верно. PDB содержит структуры биологических молекул. Тогда как трехмерная структура есть также у малых молекул, минералов и т.п., тем не менее, в этот банк эти данные не размещаются.

В дискуссии приняли участие:

Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. и Топунов А.Ф.

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

- Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы из базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Эти лакказы обладали средним окислительно-восстановительным потенциалом (620 и 650 мВ отн. НВЭ), высокой термостабильностью и были способны катализировать окисление ряда фенольных соединений с эффективностью, сопоставимой (либо превышающей) с лакказами из базидиомицетов *C. caperata* и *T. hirsuta* с высоким окислительно-восстановительным потенциалом.
- Сравнение скоростей ферментативного окисления фенольных соединений лакказами со средними и с высокими окислительно-восстановительными потенциалами показало, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ и фенольных красителей окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказ является определяющим фактором. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре T1 лакказ и эффективностью окисления этих субстратов, катализируемого лакказами.
- Решены с высоким разрешением пространственные структуры лакказ из *A. faginea* (1,75 Å, $R_f = 16,1\%$), *S. murashkinskyi* (0,95 Å, $R_f = 12,1\%$), лакказы *C. caperata* (1,67 Å, $R_f = 15,6\%$) с удаленным ионом меди из центра T2 и комплексов лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 с CuCl (1,98 Å, $R_f = 20,2\%$) и CuSO₄ (1,67 Å, $R_f = 16,5\%$).

- Показано, что в кристаллах лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 способны встраиваться только ионы меди в степени окисления +1. Также для препарата лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 была показана возможность восстановления активности при обработке солью CuCl в растворе. При обработке солью CuSO₄ восстановления активности не происходило.
- Для лакказ базидиомицетов было изучено влияние структуры окружения иона меди в T1 центре на его окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что доступность растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре T1 коррелирует с величиной окислительно-восстановительного потенциала лакказ. Это позволяет проводить приблизительную оценку окислительно-восстановительного потенциала лакказ с известной пространственной структурой.
- Анализ структур серии из 16 наборов дифракционных данных высокого разрешения, последовательно собранных с одного кристалла лакказы *S. murashkinskyi* с увеличивающейся дозой поглощенного рентгеновского ионизирующего излучения, позволил существенно уточнить механизм восстановления кислорода до воды в активном центре фермента.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы грибов малоизученного семейства *Steccherinaceae* *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Ранее в литературе были охарактеризованы изоформы лакказ только одного представителя этого семейства – *Steccherinum ochraceum*. Были выявлены особенности этих лакказ – среднее значение окислительно-восстановительного потенциала, повышенная термостабильность и высокое сродство к соединениям синрингильного типа. В работе предложена оценка ОВП лакказ с известной пространственной структурой на основании выявленной корреляции между ОВП лакказы и доступностью растворителю пространственно консервативной части окружения центра T1 лакказ.

Механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказами, существенно уточненный в работе, имеет важное теоретическое значение для понимания функционирования медьсодержащих оксидаз. Кроме того, в работе впервые для лакказ была установлена связь между координацией ионов меди в T2/T3 центре и их степенью окисления.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Выделенные и охарактеризованные лакказы из *A. faginea* и *S. murashkinskyi* обладают высокой термостабильностью. Обе лакказы катализируют окисление монофенольных соединений с высокой эффективностью, несмотря на то, что они обладают средним значением ОВП. Это делает их перспективными для применения в промышленных процессах, протекающих при повышенных температурах. Показанная в работе возможность реконструкции центра T2 базидиомицетной лакказы с использованием CuCl позволяет восстанавливать активность ферментов с недостаточным содержанием ионов меди в T2 центре, что особенно важно для ферментов, получаемых рекомбинантным путем.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация Глазуновой О.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается логичным построением исследования, корректной постановкой задач исследования, широким спектром современных методов исследования, использованных в работе, и публикацией результатов работы в пяти иностранных и одном отечественном издании (всего 7 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития современной биохимии и, в частности, представлений о функционировании грибных лакказ.

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

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 10 октября 2019 г. № 22
о присуждении Глазуновой Ольге Александровне, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 27.05.2019 г. (протокол № 15) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк, от 10.02.2014 г. №55/нк, от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 г. № 222/нк.

Соискатель

Глазунова Ольга Александровна (1988 года рождения) в июне 2011 г. окончила Московскую государственную академию тонкой химической технологии им. Ломоносова по специальности «Химическая технология и биотехнология», и в ноябре 2011 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (с июля 2015 г. входит в состав Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»), где проходила обучение по ноябрь 2015 г. С 2011 г. и по настоящее

время работает в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника.

Диссертационную работу соискатель Глазунова О.А. выполняла в лаборатории молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научные руководители:

Ярополов Александр Иванович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Поляков Константин Михайлович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Куранова Инна Петровна, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»;

Лисов Александр Викторович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научным вопросам Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»;

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, Куранова Инна Петровна является одним из ведущих отечественных специалистов в области кристаллографии и рентгеноструктурного анализа;

тем, что кандидат биологических наук, Лисов Александр Викторович является одним из ведущих отечественных специалистов в области биохимии и энзимологии;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Глазуновой Ольги Александровны.

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 своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, зав. лабораторией рентгеноструктурных исследований биополимеров Плетневым Владимиром Захаровичем и утвержденном директором ИБХ РАН академиком Габировым Александром Габировичем, указала, что диссертационная работа Глазуновой Ольги Александровны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор, Глазунова Ольга Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук специальности – 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что в ИБХ РАН активно ведутся исследования в области изучения структуры и функции белков. Таким образом, сотрудники ИБХ РАН и, в частности, лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Глазуновой Ольги Александровны изложены в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzeev S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes

Antrodiella faginea and *Steccherinum murashkinskyi* // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, Vol. 118, P. 406–418.

2. **Glazunova O.A.**, Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // *PLoS ONE*, 2018, Vol. 13(6), e0197667.

3. **Glazunova O.A.**; Trushkin N.A.; Moiseenko K.V.; Filimonov I.S.; Fedorova T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // *Catalysts*, 2018, Vol. 8 (152).

4. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova, S., Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Popov A.N., Koroleva O.V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism // *Acta Crystallogr. D*, 2017, Vol. D73(5), P.388–401.

5. **Glazunova O.A.**, Moiseenko K.V., Kamenihina I.A., Isaykina T.U., Yaropolov A.I., Fedorova T.V. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: does glycosylation matter? // *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20(8): 2008.

6. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Fedorova T.V., Dorovatovskii P.V., Koroleva, O.V. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. D*, 2015, Vol. 71(4), P. 854-861.

7. Федорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., **Глазунова О.А.**, Малошенок Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королева О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2013, Т. 49(6), С. 570-580.

Результаты работы также были представлены на 7 международных и 2 всероссийских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций), в частности на 5-ом Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016); *International Conference OxiZymes* (Вена, 2014); *43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)*, (Прага, 2018), *VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды"* (Москва, 2017); *International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications* (Москва, 2013); *38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS)* (St. Peterburg, 2013), *The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS)* (Leipzig, 2013); *International Conference OxiZymes* (Marseille, 2012).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, **Курановой Инны Петровны** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- При исследовании степени доступности консервативных участков петель во второй координационной сфере центра T1 не указано как именно рассчитана доступная площадь поверхности.
- При введении иона меди Cu²⁺ в центр T2/T3 лакказы *S. caperata* диссертант использовал настаивание кристаллов в криорастворе, содержащем насыщенную концентрацию соли CuCl. При этом наблюдалось снижение дифракционного качества кристалла, а в молекуле фермента обнаружены дополнительные места связывания ионов меди. Не следует ли из этого, что концентрация соли при настаивании слишком высока и ее следовало бы снизить, чтобы замедлить разрушение кристалла?
- На рисунке 10 (стр. 34) пропущены индексы, приведенные в подписи.
- В таблице 10 (стр. 76) значение полноты набора для последнего слоя лакказы *S. murashkinskyi* превышает среднее значение по набору.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук **Лисова Александра Викторовича** (положительный). **Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:**

- В качестве пожелания хотелось бы указать необходимость более подробного освещения в «Литературном обзоре» реакций лакказ с участием медиаторов, поскольку данные реакции имеют большое фундаментальное и прикладное значение.
- Допущены некоторые неточности в оформлении текста диссертации. В таблице 9 не указана размерность величин, указанных в столбцах. В подписи к рисунку 24 не указано, что именно обозначено желтым цветом.

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 содержит следующие вопросы и замечания:**

- В ходе ознакомления с диссертационной работой Глазуновой Ольги Александровны серьезных недостатков выявлено не было. Можно лишь сделать небольшие

замечания касательно некоторых стилистических погрешностей, наличие которых, однако, не носит принципиального характера и не влияет на общую высокую оценку диссертационной работы. Очевидно, несмотря на заверченный характер диссертации, работа в этом направлении, по-видимому, будет продолжена. В этой связи, представляется целесообразным дальнейшее развитие структурно-функционального аспекта работы на базе уже полученного структурного материала. В частности, было бы целесообразно уже экспериментальными методами рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза детально изучить специфичность связывания субстрата и ее взаимосвязь с каталитической активностью.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Козлова Дмитрия Георгиевича, кандидата биологических наук, зав. лабораторией систем экспрессии генов НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИгенетика, **замечаний нет.**

Родиной Елены Валерьевны, кандидата химических наук, доцента кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. **В отзыве имеются следующие вопросы и замечания:**

- Единственное замечание, которое хотелось бы высказать, касается части, посвященной получению и характеристике исходных белковых препаратов. На мой взгляд, она написана слишком сжато, а те результаты, которые все-таки приведены, недостаточно проанализированы. В частности, из текста неясно, для чего определяли массовое содержание сахаров в препаратах и согласуется ли эта информация с содержанием и природой сахаров, видимых в структурах. Нигде не указана катализируемая реакция и не обсуждается судьба органического субстрата, что может быть весьма важно как для интерпретации каталитических параметров, так и в свете предполагаемого практического использования новых лакказ. Высказанное замечание касается стиля оформления автореферата и не умаляет достоинств работы в целом.

Абдуллатыпова Азата Вадимовича, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, ФИЦ "Пущинский научный центр РАН". **В отзыве имеются следующие вопросы:**

- Коль скоро автор расположила продуцентов лакказ по окислительно-восстановительному потенциалу и по экологическим группам так: первичный

ксилотроф (более 700 мВ), фитопатоген (700 мВ), вторичный ксилотроф (600-700 мВ), гумусовый сапротроф (550 мВ), а также провела сравнительный анализ 4 лакказ по субстратной специфичности, то не могла бы она пояснить, какие именно реакции, катализируемые лакказами, могут играть определяющую роль в каждой из этих экологических групп?

- Насколько можно сравнить циклотроны DESY и Сибирь по качеству получаемых дифракционных картин (разрешению, R-фактору)?
- Согласно данным, полученным Ольгой Сергеевной Савиновой, на которые я тоже писал отзыв, у *Trametes hirsuta* 072 семь изоформ лакказ, хотя обычно выделяется только мажорная. Брала ли Ольга Александровна мажорную изоформу, и не возникало ли в работе проблемы загрязнения другими изоформами?
- Есть также замечание по поводу актуализации темы: почему-то в разделе "Актуальность работы" говорится об одноэлектронном окислении разных соединений, хотя, на мой взгляд, лакказы примечательны именно своей способностью к четырёхэлектронному восстановлению кислорода.

Шаховой Наталии Витальевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биохимии грибов Ботанического института им В.Л. Комарова РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- В качестве замечания можно отметить не совсем удачное, на мой взгляд, название диссертации «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов». Автором, безусловно, проведена большая работа и всестороннее изучение лакказ, полученных из афиллофоровых базидиомицетов, относящихся к семейству *Steccherinaceae* (*A. faginea* и *S. murashkinskyi*) и *Polyporaceae* (*C. caperata* и *T. hirsuta*). Однако базидиальные грибы не ограничиваются только этими двумя семействами. Базидиомицеты, или базидиальные грибы подразделяют (с учетом их строения и жизненного цикла) на два подкласса. Подкласс холобазидиомицеты, включающий экзобазидиальные, афиллофоровые (к которым относятся описываемые в диссертации представители семейств *Steccherinaceae* и *Polyporaceae*), агариковые грибы и гастеромицеты. Подкласс фрагмобазидиомицеты, содержит головневые, ржавчинные, дрожалковые, аврикуляриевые, туласнелловые, дакриомицетовые грибы. Возможно, в названии диссертации было бы корректнее указать, к каким семействам принадлежат рассматриваемые в работе грибы.

Самыгиной Валерии Ролановны, кандидата Физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории РМАиСИ ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН. **В отзыве имеются следующие замечания:**

- Банк белковых данных (Protein Data Bank) назван банком трехмерных структур. Это не совсем верно. PDB содержит структуры биологических молекул. Тогда как трехмерная структура есть также у малых молекул, минералов и т.п., тем не менее, в этот банк эти данные не размещаются.

В дискуссии приняли участие:

Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. и Топунов А.Ф.

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

- Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы из базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Эти лакказы обладали средним окислительно-восстановительным потенциалом (620 и 650 мВ отн. НВЭ), высокой термостабильностью и были способны катализировать окисление ряда фенольных соединений с эффективностью, сопоставимой (либо превышающей) с лакказами из базидиомицетов *C. caperata* и *T. hirsuta* с высоким окислительно-восстановительным потенциалом.
- Сравнение скоростей ферментативного окисления фенольных соединений лакказами со средними и с высокими окислительно-восстановительными потенциалами показало, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ и фенольных красителей окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказ является определяющим фактором. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре T1 лакказ и эффективностью окисления этих субстратов, катализируемого лакказами.
- Решены с высоким разрешением пространственные структуры лакказ из *A. faginea* (1,75 Å, $R_f = 16,1\%$), *S. murashkinskyi* (0,95 Å, $R_f = 12,1\%$), лакказы *C. caperata* (1,67 Å, $R_f = 15,6\%$) с удаленным ионом меди из центра T2 и комплексов лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 с CuCl (1,98 Å, $R_f = 20,2\%$) и CuSO₄ (1,67 Å, $R_f = 16,5\%$).

- Показано, что в кристаллах лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 способны встраиваться только ионы меди в степени окисления +1. Также для препарата лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 была показана возможность восстановления активности при обработке солью CuCl в растворе. При обработке солью CuSO₄ восстановления активности не происходило.
- Для лакказ базидиомицетов было изучено влияние структуры окружения иона меди в T1 центре на его окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что доступность растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре T1 коррелирует с величиной окислительно-восстановительного потенциала лакказ. Это позволяет проводить приблизительную оценку окислительно-восстановительного потенциала лакказ с известной пространственной структурой.
- Анализ структур серии из 16 наборов дифракционных данных высокого разрешения, последовательно собранных с одного кристалла лакказы *S. murashkinskyi* с увеличивающейся дозой поглощенного рентгеновского ионизирующего излучения, позволил существенно уточнить механизм восстановления кислорода до воды в активном центре фермента.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы грибов малоизученного семейства *Steccherinaceae* *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Ранее в литературе были охарактеризованы изоформы лакказ только одного представителя этого семейства – *Steccherinum ochraceum*. Были выявлены особенности этих лакказ – среднее значение окислительно-восстановительного потенциала, повышенная термостабильность и высокое сродство к соединениям синрингильного типа. В работе предложена оценка ОВП лакказ с известной пространственной структурой на основании выявленной корреляции между ОВП лакказы и доступностью растворителю пространственно консервативной части окружения центра T1 лакказ.

Механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказами, существенно уточненный в работе, имеет важное теоретическое значение для понимания функционирования медьсодержащих оксидаз. Кроме того, в работе впервые для лакказ была установлена связь между координацией ионов меди в T2/T3 центре и их степенью окисления.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Выделенные и охарактеризованные лакказы из *A. faginea* и *S. murashkinskyi* обладают высокой термостабильностью. Обе лакказы катализируют окисление монофенольных соединений с высокой эффективностью, несмотря на то, что они обладают средним значением ОВП. Это делает их перспективными для применения в промышленных процессах, протекающих при повышенных температурах. Показанная в работе возможность реконструкции центра T2 базидиомицетной лакказы с использованием CuCl позволяет восстанавливать активность ферментов с недостаточным содержанием ионов меди в T2 центре, что особенно важно для ферментов, получаемых рекомбинантным путем.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация Глазуновой О.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается логичным построением исследования, корректной постановкой задач исследования, широким спектром современных методов исследования, использованных в работе, и публикацией результатов работы в пяти иностранных и одном отечественном издании (всего 7 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития современной биохимии и, в частности, представлений о функционировании грибных лакказ.

