

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ
ГЛАЗУНОВОЙ ОЛЬГИ АЛЕКСАНДРОВНЫ
«СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ
БАЗИДИОМИЦЕТОВ»,
ПРЕДСТАВЛЕННУЮ К ЗАЩИТЕ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА ХИМИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.01.04 БИОХИМИЯ.

Диссертация О.А. Глазуновой «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов» посвящена изучению лакказ из грибов базидиомицетов с различной величиной окислительно-восстановительного потенциала, сравнительной характеристике их пространственной структуры, физико-химических свойств, каталитического механизма.

Лакказы, найденные в грибах, насекомых, бактериях и археях, принадлежат к семейству голубых медь-содержащих оксидаз и катализируют одноэлектронное окисление широкого спектра полифенольных соединений, красителей и некоторых неорганических соединений с одновременным восстановлением молекулярного кислорода до воды. Лакказы относятся к гликопротеинам и содержат в молекуле до 40% углеводов. В катализируемой ферментами реакции участвуют четыре иона меди, расположенные в двух центрах T1 и T2/T3.

Лакказы находят широкое применение в качестве катализаторов в биотехнологии, органическом синтезе, при производстве лекарственных препаратов, в текстильной и пищевой промышленности, для деградации ксенобиотиков, биоремедиации почв и утилизации отходов ряда производств. Способность переносить электроны непосредственно с электрода на субстрат делает лакказы пригодными для разработки биотопливных элементов и миниатюрных источников питания для медицинских имплантатов. Важным преимуществом лакказ при

биотехнологическом применении является образование воды в качестве одного из продуктов реакции, благодаря чему производства с участием лакказ являются экологически чистыми.

Широкий спектр практического применения объясняет непрекращающийся поиск и изучение новых представителей этого класса ферментов, обладающих разными свойствами и разной субстратной специфичностью. Теоретический и практический интерес представляет и каталитический механизм восстановления молекулярного кислорода, протекающий в активном центре фермента.

Несмотря на огромное количество работ, посвященных лакказам, до сих пор нет полного понимания того, как влияет окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) фермента на его каталитические свойства, какие особенности структуры определяют величину окислительно-восстановительного потенциала, через какие промежуточные состояния протекает восстановление молекулярного кислорода в активном центре лакказы. Поэтому проведённые в диссертации О.А. Глазуновой исследования по поиску и характеристике новых лакказ из различных источников, изучению их пространственных структур и особенностей функционирования являются актуальными и имеют как практическую, так и теоретическую значимость.

Для структурно-функционального исследования диссидентом были выбраны лакказы из четырёх штаммов грибов базидиомицетов, обладающих высокой лигнолитической и лакказной активностью и относящихся к двум семействам. Поскольку процент сходства аминокислотных последовательностей между лакказами выбранных семейств не превышает 60%, ферменты из данных источников должны заметно различаться по свойствам. Диссидентом были выделены гомогенные препараты лакказы из грибов *Trametes hirsuta* (ThL) и

Coriolopsis caperata (CcL), которые характеризовались высоким значением ОВП, а полученные диссидентом впервые лакказы из грибов *Antrodiella faginea* (AfL) и *Steccherinum murashkinskyi* (SmL) имели среднее значение ОВП.

Применяя современные биохимические и физические методы, диссидент определил основные физико-химические характеристики ферментов и изучил их катализитические свойства. Были установлены изоэлектрические точки лакказ, молекулярные массы, содержание связанных углеводов, охарактеризованы спектры в ультрафиолетовой и видимой областях и ЭПР спектры, измерены термостабильность, температурные оптимумы активности, величина окислительно-восстановительного потенциала, скорости катализического окисления различных субстратов и pH-зависимости этих реакций окисления. Найдено, что лакказы AfL и SmL со средним значением ОВП обладают более высокой термостабильностью по сравнению с лакказами CcL и ThL с более высоким ОВП.

На примере 20 монофенольных соединений и четырёх красителей с разной структурой изучены катализитические свойства лакказ и прослежены корреляции между катализитическими свойствами и значением ОВП. Для семи природных субстратов лакказ определены катализитические параметры и pH-зависимость реакций ферментативного окисления этих субстратов. Показано, что лакказы со значительно меньшей скоростью катализируют окисление субстратов с ОВП выше 700 мВ. Однако лакказы с высоким значением ОВП катализируют окисление субстратов с высоким ОВП с большей скоростью, чем лакказы со средним ОВП. Таким образом, разность между ОВП лакказы и потенциалом окисления субстрата оказалась определяющей для скорости окисления простых фенольных субстратов с потенциалом выше 700 мВ. Для простых фенольных субстратов с потенциалом окисления ниже 700 мВ такой зависимости не

обнаружено и диссертант полагает, что в этом случае главное влияние на скорость реакции могут оказывать особенности строения субстрат-связывающего кармана.

Значительная часть работы посвящена исследованию пространственных структур лакказ методом рентгеноструктурного анализа. Диссидентом были выращены пригодные для структурного исследования кристаллы трёх лакказ из *A. faginea*, *S. murashkinskyi* и *C. caperata* и установлены пространственные структуры ферментов из *A. faginea* и *C. caperata* с высоким разрешением, а лакказы из *S. murashkinskyi* – со сверхвысоким разрешением ($0,95\text{\AA}$). Следует отметить, что структура фермента из *S. murashkinskyi* является в банке данных единственной лакказой, установленной с разрешением меньше 1\AA . Структура лакказы из *C. caperata* решена для фермента с удалённым из центра T2/T3 ионом меди Cu₂ и для фермента с восстановленным центром T2. В молекуле ферментов локализованы центры гликозилирования и определено строение присоединённых углеводных цепей. Проведён детальный анализ элементов структуры, влияющих на каталитические свойства фермента. Локализованы ионы меди в одноядерном T1 центре и в трёхядерном центре T2/T3, где происходит восстановление молекулярного кислорода до воды, описаны координационные сферы ионов меди.

Показано, что ближайшее окружение центра T1 сходно в разных лакказах, а основные различия в строении трёхядерных центров T2/T3 связаны с различиями в количестве кислородных лигандов, в координации и заселённости ионов меди. Для лакказы *C. caperata* с удалённым ионом меди Cu₂ в центре T2/T3 найдены условия встраивания ионов меди в этот центр, что может быть использовано для реактивации лакказ.

Важные результаты получены при исследовании элементов структуры, влияющих на каталитические свойства лакказ. Для десяти лакказ с разным

значением ОВП, структура которых была установлена с разрешением лучшим, чем 2 \AA , диссертант сравнил строение вариабельных цепей, образующих вторую координационную сферу иона меди в центре T1 и обнаружил, что строение вариабельных петель, окружающих центр T1, коррелирует с величиной ОВП фермента. На основании проведённого анализа диссертант установил, что по площади доступности растворителю консервативных участков петель из окружения меди в центре T1 можно оценивать ОВП лакказ базидиомицетов с известной пространственной структурой.

Значительным достижением диссертанта является уточнение механизма восстановления кислорода в кристалле лакказы методами рентгеноструктурного анализа и сериальной монокристальной кристаллографии. Для этого эксперимента диссертантом был выращен кристалл лакказы *S. murashkinskyi* столь высокого дифракционного качества, что от него удалось собрать 16 дифракционных наборов высокого разрешения при возрастающих дозах поглощённого рентгеновского излучения. После расшифровки и сравнения пространственных структур, изменения в координации ионов меди в центре T2/T3, обнаруженные на контрольных стадиях процесса, были соотнесены со степенью окисления ионов, идентифицирована природа и количество кислородных лигандов, образующихся на последовательных стадиях реакции, и предложен уточнённый механизм процесса восстановления кислорода до воды в активном центре фермента.

Диссертационная работа построена по классической схеме и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение и список литературы. Работа изложена на 138 страницах и включает в себя 38 рисунков и 17 таблиц. Список литературы содержит 277 источников.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, описана новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость, приведены основные положения, выносимые на защиту, а также сведения об апробации работы и степени достоверности полученных результатов.

В разделе «Литературный обзор» обобщены имеющиеся данные о распространении и функции лакказ, об их физико-химических и катализических свойствах, рассмотрены структура лакказ и механизм их действия. В отдельном разделе литературного обзора автор анализирует работы, посвященные исследованию восстановления лакказ под действием рентгеновского излучения. Помимо этого, литературный обзор содержит сведения о возможностях практического применения лакказ. Автор хорошо знаком с публикациями по теме своего исследования и приводит всю необходимую информацию, которая позволяет оценить вклад автора в развитие данной тематики.

Раздел «Материалы и методы» содержит исчерпывающее описание методик, использовавшихся в работе, что позволяет воспроизвести полученные результаты и показывает, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне и достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор подробно описывает полученные в работе результаты. В первой части приведены данные о культивировании и очистке исследуемых ферментов, о сравнении физико-химических и катализических свойств четырех исследуемых лакказ, обладающих различными окислительно-восстановительными потенциалами. Во второй части работы описаны структуры исследуемых лакказ в сравнении с другими известными на данный момент структурами лакказ базидиомицетов. В третьей части описано проведённое

диссидентом исследование методом сериальной монокристальной кристаллографии процесса ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды в активном центре лакказы *S. murashkinskyi* под действием ионизирующего рентгеновского излучения.

В разделе «Заключение» автор на основании большого объема экспериментальных данных делает обоснованные выводы. Выводы четко сформулированы и соответствуют поставленным в работе задачам. Материалы диссертационной работы были отражены в семи публикациях в изданиях, входящих в международные реферативные базы Web of Science и Scopus, и представлены на девяти зарубежных и отечественных конференциях. Материал диссертации четко изложен и хорошо иллюстрирован.

К диссертации имеются некоторые замечания.

При исследовании степени доступности консервативных участков петель во второй координационной сфере центра Т1 не указано как именно рассчитана доступная площадь поверхности.

При введении иона меди Cu²⁺ в центр Т2/Т3 лакказы *C. caperata* диссидент использовал настаивание кристаллов в криорастворе, содержащем насыщенную концентрацию соли CuCl₂. 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 её следовало бы снизить, чтобы замедлить разрушение кристалла?

На рисунке 10 (стр. 34) пропущены индексы, приведённые в подписи.

В таблице 10 (стр. 76) значение полноты набора для последнего слоя лакказы *S. murashkinskyi* превышает среднее значение по набору.

Однако указанные замечания не снижают общее отличное впечатление от работы, которая по объёму проведённых экспериментов и значению полученных результатов заслуживает самой высокой оценки.

При выполнении работы диссертант продемонстрировал свободное владение широким спектром биохимических и физических методов, умение расшифровать и интерпретировать многокомпонентные синтезы электронной плотности с переменным числом лигандов, способность детально анализировать сложный экспериментальный материал, что говорит о профессиональном мастерстве диссертанта и его хорошей теоретической подготовке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

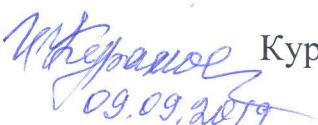
Диссертация Глазуновой О.А. является законченной научно-квалификационной работой и соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Результаты, представленные в диссертации, полностью соответствуют специальности 03.01.04 Биохимия.

Исходя из вышеизложенного, диссертация Глазуновой О.А. «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов» полностью отвечает требованиям, изложенными в пункте 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 №842 (с изменениями от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Главный научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»,

доктор химических наук

(специальность 02.00.10 Биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ)

 Куранова Инна Петровна
09.09.2019

119333, Москва, Ленинский пр., 59

Тел. 84991356220

e-mail: inna@ns.crys.ras.ru

Подпись И.П. Курановой заверяю

Ученый секретарь ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

