

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Глазуновой Ольги Александровны «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

Диссертационная работа Глазуновой Ольги Александровны посвящена исследованию свойств крайне интересного объекта – фермента – лакказы. Лакказа (ЕС 1.10.3.2, пара-бензендиол:кислород оксидоредуктаза) является одним из первых ферментов, которые были описаны и изучены в качестве отдельных действующих агентов. Лакказа принадлежит к семейству медьсодержащих оксидаз и катализирует окисление различных соединений, в первую очередь фенолов, кислородом, который в ходе реакции восстанавливается до воды. В настоящее время описано и изучено множество лакказ из различных организмов. Гены, кодирующие лакказу, обнаружены в геномах сотен организмов – грибов, бактерий, растений. Лакказа активно применяется на практике – в пищевой, текстильной промышленности, для деградации ксенобиотиков, химического синтеза. Этим обуславливается высокий интерес исследователей к этому ферменту и постоянный поиск его новых продуцентов. Несмотря на большое количество исследований, посвящённых лакказе, до настоящего времени остаётся ещё много неясного в механизме функционирования фермента, особенностях взаимодействия с различными субстратами, его физиологических функциях. Таким образом, исследование лакказы из новых продуцентов-базидиомицетов *Antrodia faginea* и *Steccherinum murashkinskyi*, изучение закономерностей окисления субстратов и восстановления кислорода этим ферментом относится к фундаментальным проблемам, что определяет ценность проведенного исследования для общей биохимии, актуальность и важность выполненной работы. Задачи, сформулированные в диссертации, соответствуют цели исследований, вполне конкретны и логичны в последовательности их решений.

Оформление диссертации соответствует установленным требованиям, она состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и примененных методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. В целом диссертация содержит 138 страниц, которые включают помимо текста 38 рисунков и 17 таблиц. Список литературы насчитывает 277 ссылок.

Во введении диссертантом представлена общая характеристика поставленной при выполнении диссертационной работы проблемы, обоснована актуальность, сформулированы цели и задачи исследования.

Обзор литературы основан на большом количестве источников, содержит большой объём информации об исследуемом объекте, в том числе новейшие данные. Обзор написан сжато, ёмко, даёт прекрасное представление о распространении лакказы в природе, молекулярных и каталитических свойствах лакказы. Обзор демонстрирует прекрасную осведомлённость автора обо всех последних находках в исследуемой им области. Полно изложены основные сведения о структуре лакказ – начиная с первичной структуры и заканчивая трёхмерной. Подробно рассмотрен механизм действия фермента, как окисления субстрата, так и восстановления кислорода. При этом автор в обзоре литературы не только описывает известные положения, но и отмечает дискуссионные моменты. Например, в разделах, посвященных структуре комплексов лакказы с субстратами (раздел 1.5.5) и механизму восстановления кислорода (раздел 1.6).

Материалы и методы исследования описаны в достаточно объёме и обеспечивают получение качественных результатов в проведённой работе. Диссертант владеет современными методами микробиологии, биохимии, структурной биологии, что обеспечивает высокий уровень проведённых исследований и достоверность полученных результатов. Широта спектра методов, примененных в ходе выполнения диссертационной работы, свидетельствует о высоком уровне подготовки диссертанта.

Результаты исследования и их обсуждение изложены в 12 разделах третьей главы диссертационной работы. В ходе проведения исследований Глазунова О.А. использовала методически различные подходы, однако, все полученные ей результаты логически связаны в единую концепцию и хорошо согласуются между собой. Диссертант проводит исследование по схеме «обнаружение объекта исследования – его получение и характеристика – исследование молекулярных механизмов действия».

Автором диссертации проведён первичный отбор продуцентов лакказы среди грибов – базидиомицетов, и отобраны два наиболее эффективных продуцента лакказы – *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Исследованы свойства ферментов, обнаружено, что они обладают высокой термостабильностью, что является благоприятным фактором в возможном практическом использовании лакказы. Идея о важном значении разницы окислительно-восстановительного потенциалов субстрата и T1 иона меди активного центра лакказы были развиты ранее некоторыми исследователями. Эти идеи были существенно развиты Глазуновой О.А., которая в ходе работы обнаружила, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ фактором, определяющим скорость реакции, является окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказы. В ходе выполнения работы были решены пространственные структуры лакказ с высоким разрешением. Отдельной задачей, решённой в ходе выполнения работы, необходимо отметить проведённые исследования по встраиванию в молекулу лакказы иона меди из центра T2. Известно, что ион меди T2 активного центра весьма легко «выпадает» из молекулы фермента. Большое количество трёхмерных структур в базе данных PDB не имеют T2 медного центра. Поэтому предложенный диссертантом метод встраивания восстановленного иона меди в T2 центр фермента позволяет получать лакказу с полным набором ионов меди в активном центре и исследовать его структуру в нативном состоянии. Отдельным плюсом работы является предложенный Глазуновой О.А. способ приблизительной оценки окислительно-

восстановительного потенциала T1 центра лакказ, который базируется на анализе доступности растворителю консервативных участков окружения иона меди T1 центра. Таким образом, данные, полученные диссертантом, не только являются описательными, но и обладают способностью предсказывать свойства изучаемого объекта. Важным моментом в изучении механизма действия лакказ является приложенный диссертантом значительно уточнённый механизм восстановления кислорода до воды в активном центре фермента. Таким образом, представленные Глазуновой О.А. данные содержат новые сведения о структуре и механизме действия лакказ.

Полученные экспериментальные и теоретические результаты резюмированы в разделе «Заключение» и представлены в шести выводах, полностью соответствующих поставленным задачам и цели исследования. В ходе выполнения диссертационной работы на основании анализа свойств и структуры лакказ базидиомицетов автором создана уточнённая модель механизма действия фермента. Данная модель крайне интересна и хорошо согласуется с существующими представлениями о механизме действия медьсодержащих оксидаз. Диссертация изложена четким и ясным языком и не вызывает вопросов по излагаемым методам, результатам и их трактовке.

Хотелось бы выразить некоторые пожелания/замечания к выполненной работе.

1. В качестве пожелания хотелось бы указать необходимость более подробного освещения в «Литературном обзоре» реакций лакказы с участием медиаторов, поскольку данные реакции имеют большое фундаментальное и прикладное значение.
2. 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 жёлтым цветом.

Тем не менее, указанные замечания не умаляют научной ценности проделанной работы и не затрудняют понимания изложенного материала.

Диссертация Глазуновой Ольги Александровны «Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, представляет законченное, оригинальное научное исследование, выполненное автором лично.

Диссертация является завершенной научно-квалификационной работой, которая вносит ценный вклад в современную биохимию. Она написана хорошим литературным языком, прекрасно оформлена и иллюстрирована. Выводы сделанные на основе экспериментальных данных диссертанта логичны и вполне соответствуют поставленной цели и задачам исследования, их достоверность не вызывает сомнений. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные материалы диссертации Глазуновой О.А. адекватно представлены в научных публикациях, в том числе в 7 статьях в научных журналах, входящих в перечень ВАК и в базу Web of Science. Ключевые данные представлены диссертантом также на международных и всероссийских конференциях, что подтверждает её личный вклад в выполнение всего объёма диссертационного исследования, в получении всего массива экспериментальных результатов и в подготовку статей по теме.

Диссертационная работа Глазуновой О.А. производит исключительно благоприятное впечатление своим фундаментальным характером, широким спектром задействованных методов и подходов, тщательностью выполненных поисковых работ и анализа, а также новизной полученных результатов. Диссертация, несомненно, должна быть квалифицирована как законченное научное исследование, в котором соискатель решены все поставленные задачи. По своей актуальности, научной новизне и значимости полученных результатов диссертация, представленная на соискание учёной степени кандидата химических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой и полностью отвечает требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства Российской

Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года с изменением Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 года № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а ее автор Глазунова Ольга Александровна достойна присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Официальный оппонент



Лисов Александр Викторович

кандидат биологических наук (специальность - 03.01.04 Биохимия)

Зам. директора по научным вопросам

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук (структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Почтовый адрес: 142290, Россия, г. Пущино, пр-т Науки, 5

E-mail: ssl208@rambler.ru

Тел.: 8 (4967) 73-26-77

Подпись Лисова Александра Викторовича заверяю

Начальник отдела кадров ФИЦ ПНЦБИ РАН



Левченко Г.Н.

« 05 » сентября 2019 г.