

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Варфоломеевой Ларисы Александровны
«СТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО
ЦЕНТРА ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Медьсодержащие ферменты катализируют окисление или восстановление как низкомолекулярных (газы), так и высокомолекулярных (биополимеры) субстратов и вовлечены во многие процессы (нитратное дыхание, окисление серосодержащих неорганических соединений, деградация лигнина и полисахаридов, антибиотиков и др.). Получение новых данных о структуре активных центров этих ферментов способствует пониманию механизмов их функционирования.

Диссертационная работа посвящена исследованию медьсодержащего фермента тиоцианатдегидрогеназы, который катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы и содержит уникальный трехъядерный медный центр. Более ранние исследования позволили предложить гипотетический механизм каталитической реакции $tpTcDH$. В данной работе представлены структурно-функциональная характеристика и детальный механизм каталитической реакции двух бактериальных тиоцианатдегидрогеназ (из *Thioalkalivibrio paradoxus* ($tpTcDH$) и из *Pelomicrobium methylotrophicum* ($pmTcDH$)). Полученные диссертантом данные могут быть полезны при создании новых не встречающихся в природе эффективных биокатализаторов окислительно-восстановительных реакций.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Галоалкалифильная сероокисляющая бактерия *Th. paradoxus* и литоавтотрофная метилотрофная бактерия *P. methylotrophicum* способны использовать тиоцианат в качестве единственного источника энергии, азота и серы. Обе бактерии содержат недавно открытый медьсодержащий фермент тиоцианатдегидрогеназу. Ранее была определена структура тиоцианатдегидрогеназы из *Th. paradoxus*, активный центр которой содержал трехъядерный медный кластер. Однако, поскольку имело место двойникование и сильная анизотропия кристаллов, качество структуры было невысоким, кроме того, отсутствовали структурные данные о комплексах фермента с аналогами субстрата. Тем самым, для уточнения предложенного механизма функционирования тиоцианатдегидрогеназы требовались дальнейшие структурные исследования.

Известно, что дифракционное качество кристаллов может быть улучшено за счет использования различных мутантных форм или родственного фермента из другого организма. Структурные исследования фермента рmTcDH из другой бактерии (*P. methylotrophicum*) привели к получению совершенных кристаллов и определению структуры с атомарным разрешением (1.05 Å). В диссертационной работе описаны структуры рекомбинантного фермента рmTcDH в свободном состоянии и в комплексе с тиомочевинной. На основе этих структур удалось показать наличие двух конформаций фермента: с открытым и закрытым субстратным каналом активного центра. Высокое качество дифракционных данных позволило выявить тонкие различия в архитектуре трехъядерного медного центра в каждой из конформаций. Основываясь на геометрии координационного окружения ионов меди, автор указывает предположительный заряд этих ионов. Примечательно, что в комплексах фермента с лигандами: ингибитором (ионом тиомочевины) и молекулярным кислородом наблюдается закрытый активный центр. Структура комплекса тиоцианатдегидрогеназы с тиомочевинной позволила моделировать связывание фермента с субстратом (тиоцианатом). Предполагается, что окисленное состояние в обеих конформациях функционально и возникает в ходе каталитического цикла. Поскольку по данным спектроскопии ЭПР, восстановленное состояние активного центра при инкубации с субстратом не возникает, то предполагается, что структурные данные о восстановленном состоянии центра являются артефактом рентгеноструктурного эксперимента.

Полученные результаты представляют интерес как с точки зрения фундаментального исследования взаимосвязи структуры и функции фермента, так и с практической точки зрения применения тиоцианатдегидрогеназ. Поскольку тиоцианат присутствует в промышленных сточных водах, образующихся при производстве стали, добыче золота, коксовании угля, то тиоцианатдегидрогеназы, разлагающие тиоцианат до нетоксичных продуктов (серы и цианата), могут широко использоваться в биотехнологических процессах биоремедиации. Кроме того, полученные результаты могут быть полезны при конструировании сенсоров для анализа степени загрязнения окружающей среды промышленными отходами.

Характеристика разделов работы

Диссертационная работа имеет стандартные разделы: «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение», «заключение», «выводы» и «список литературы». Работа изложена на 138 страницах и включает 39 рисунков и 13 таблиц.

Во введении описана актуальность исследования медьсодержащих ферментов, представлена история структурных исследований тиоцианатдегидрогеназы, чётко указаны цели и задачи, научная новизна и ожидаемая практическая значимость диссертационной работы.

В главе «Обзор литературы» автор освещает спектральные и структурные методы исследования макромолекул, разбирает свойства иона меди в разной степени окисления, роль иона меди в катализе биологических окислительно-восстановительных реакций. Всесторонне представлен обзор медных центров ферментов (T1, T2 и T3 центры), обсуждаются структурные особенности и механизм восстановления кислорода в трёх- и биядерных активных центрах разных ферментов, описан уникальный четырёхнуклеарный центр редуктазы закиси азота. Автором дан подробный анализ дицистеиновых медных центров и центров с мотивом «гистидиновой скрепки». В заключение рассмотрены каталитические, спектральные и структурные свойства тиоцианатдегидрогеназы $trTcDH$, окисляющей тиоцианат по «цианатному» пути с накоплением серы в гранулах. Охарактеризованы первые кристаллы и первые пространственные структуры $trTcDH$, описан состав и геометрия уникального трехъядерного медного центра фермента. Указано, что из-за двойникования кристаллов не удалось получить структуры с атомным разрешением и определить функцию каждого иона меди активного центра. Отсутствие надёжных структурных данных о координировании ионов меди и расположении субстрата в активном центре не позволило представить детальный механизм каталитической реакции фермента.

В главе «Материалы и методы» дано подробное описание используемых методов, материалов и объектов исследований. Раздел включает получение генно-инженерных конструкций $trTcDH$ и $pmTcDH$ «дикого типа» и с точечными заменами, их экспрессию в клетках *E.coli*, выделение и очистку белков. Представлены аналитические методы, которые использованы для характеристики $trTcDH$ и $pmTcDH$, описаны спектрофотометрический метод определения ферментативной активности и метод спектроскопии ЭПР в X-диапазоне. Подробно описаны кристаллографические методы исследования, для 11 структур представлена статистика сбора данных и их уточнения.

В первой части следующей главы диссертации «Результаты и обсуждение» представлены результаты по улучшению качества кристаллов $trTcDH$ с использованием методов генной инженерии. Из двух депонированных в банк PDB структур с заменами аминокислотных остатков, боковая группа которых участвует в формировании междимерных контактов в тетрамере, двойникование кристаллов преодолено лишь в структуре с

заменой K281A. Тем не менее, предел разрешения кристаллов мутантной формы trTcDH K281A не превышал 2 Å, что было по-прежнему недостаточно для детального изучения строения активного центра фермента. В результате было принято решение использовать для структурных исследований гомологичный фермент из *P. methylotrophicum* (pmTcDH). Были получены кристаллы и определена структура с атомным разрешением (1.05 Å).

Вторая часть главы посвящена детальному структурному анализу активного центра тиоцианатдегидрогеназы. В отличие от структуры trTcDH, в структуре pmTcDH удалось зафиксировать две конформации субъединиц в димере (с закрытым и открытым субстратным каналом). Интересно, что в большинстве структур trTcDH обе субъединицы димера находятся в открытой конформации, и только в структуре со связанным неидентифицированным лигандом обе субъединицы принимают закрытую конформацию. Специально для экспериментов по спектроскопии ЭПР была получена генетическая конструкция pmTcDH с отщепляемым белком SUMO на C-конце белка для предотвращения формирования дополнительного медного центра.

Следующим шагом работы было определение пространственных структур pmTcDH в комплексе с ингибитором (тиомочевина) и аналогом субстрата (селеноцианат). На основе анализа координационных сфер ионов меди активного центра pmTcDH с тиомочевинной было предположено, что центр со связанным лигандом находится в «окисленном» состоянии, аналогично состоянию свободного фермента. «Восстановленное» состояние может формироваться под воздействием рентгеновского излучения. На основании ориентации тиомочевины в закрытом активном центре pmTcDH была предложена модель связывания субстрата (тиоцианата). Структурные данные и спектры ЭПР pmTcDH при связывании селеноцианата позволили предположить состояния ионов меди активного центра (окисленное или восстановленное) в комплексе. В завершающей части работы проведён анализ двух структур функционально неактивных форм фермента: апоформы pmTcDH, не содержащей двух ионов меди, и trTcDH с заменой аминокислотного остатка в окружении иона меди Cu3 (F436Q). Полученные в работе структурные и спектральные данные для ферментов trTcDH и pmTcDH как «дикого типа», так и с точечными заменами, позволили детализировать механизм каталитической реакции тиоцианатдегидрогеназы. В разделах «Заключение» и «Выводы» суммированы полученные в работе научные результаты.

Построение диссертационной работы вполне логично, оформление и подача материала позволяет высоко оценить научные результаты. Однако есть некоторые замечания и вопрос.

1. Каковы, по мнению автора, структурные причины более низкой активности $pmTcDH$ по сравнению с активностью $tpTcDH$?
2. Для лучшего восприятия информации следовало бы ввести определение второй координационной сферы ионов меди и указать какие аминокислотные остатки к ней относятся.
3. В работе встречаются не совсем удачные определения, например, «медные ферменты» и «медные белки», в русской интерпретации всё же лучше заменить их на «медьсодержащие».

В целом работа заслуживает самой высокой оценки, все выносимые на защиту положения обоснованы. Исследования проведены на высоком методическом уровне, экспериментальные результаты подробно изложены и детально интерпретированы. Выводы логичны и чётко сформулированы. Полученные результаты существенно расширяют представления о функционировании активного центра тиоцианатдегидрогеназ. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были апробированы на конференциях, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science.

Заключение

Диссертационная работа Варфоломеевой Ларисы Александровны «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановления правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор, Варфоломеева Л.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии

наук (ИБ РАН), доктор биологических наук по специальности 1.5.3.
Молекулярная биология



Тищенко С. В.

142290, г. Пущино, ул. Институтская 4,

Телефон оппонента: +7(903)7541329

Электронная почта: sveta@vega.protres.ru

Я, Тищенко Светлана Викторовна, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.



Тищенко С.В.

Подпись д.б.н. Тищенко С.В. заверяю

Ученый секретарь Института белка РАН  Никонова Е.Ю.

1.09.2025

