

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор – проректор по
научной деятельности Федерального
государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» (ФГАОУ ВО
«КФУ»)


Д.А. Гагарин
2025 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
(ФГАОУ ВО «КФУ»)

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 диссертационной работы

Медные ферменты – обширный класс белков, в активных центрах которых содержится ион меди в качестве кофактора. Благодаря уникальной способности меди легко переключаться между степенями окисления ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$), эти ферменты играют ключевую роль в разнообразных окислительно-восстановительных процессах и выполняют множество критически важных функций в биологических системах начиная от дыхания и метаболизма, до синтеза антибиотиков. Их каталитическая активность напрямую зависит от строения медного центра. Для получения наиболее полной картины о строении и функции ферментов применяются методы интегративной структурной биологии, основанные на комбинации нескольких методов таких как макромолекулярная кристаллография, электронная микроскопия и методы магнитного резонанса.

Работа Варфоломеевой Ларисы Александровны посвящена изучению аспектов функционирования медного центра тиоцианатдегидрогеназы методами спектроскопии ЭПР и рентгеновской кристаллографии. Тиоцианатдегидрогеназа катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы и содержит уникальный трехъядерный медный центр. Данный фермент потенциально может быть использован для разработки новых подходов биоремедиации для обезвреживания промышленных стоков, содержащих токсичные тиоцианаты. Информация о пространственном строении медных центров ферментов необходима для установления взаимосвязи между архитектурой активного центра и его каталитическими свойствами, механизмов протекания ферментативных реакций, а также рационального дизайна новых эффективных биокатализаторов, что несомненно является актуальной и значимой задачей для современной синтетической биологии и биотехнологии.

Структура диссертации

Диссертационная работа Варфоломеевой Л.А. построена по традиционной схеме и состоит из списка сокращений, введения, трёх глав, заключения, выводов, списка

опубликованных работ по теме диссертации и списка цитируемой литературы из 210 литературных источников. Работа изложена на 138 страницах.

Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

Содержание диссертации

Во Введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, описана научная новизна, практическая значимость полученных результатов и непосредственный вклад автора в проведенное исследование.

Первая глава представляет собой Обзор литературы, в котором изложены основные положения о спектральных и структурных методах исследования макромолекул таких как спектроскопия ЭПР и рентгеновская кристаллография. Описаны свойства ионов меди различных степеней окисления и их роль в катализе биологических окислительно-восстановительных реакций. Подробно рассмотрена организация различных медных центров ферментов. Приведены результаты существующих исследований тиоцианатдегидрогеназы из *Thioalkalivibrio paradoxus*. Автор провел всесторонний анализ как методов, так и объектов исследования. Текст главы хорошо структурирован и сопровождается качественными иллюстрациями, позволяющими вникнуть в материал. Проведен анализ большого количества публикаций (приведено 195 ссылок в первой главе), что дает полное представление об имеющейся на данный момент информации о современном состоянии исследований ферментов с медными центрами.

Вторая глава диссертационной работы посвящена Материалам и методам, в ней подробно раскрыты все основные аспекты использованных автором методик работы. Приведено описание получения генно-инженерных конструкций, протоколов экспрессии генов и рекомбинантного синтеза ферментов и определения ферментативной активности. Подробно описаны все параметры экспериментов по спектроскопии ЭПР, кристаллизации белков методом диффузии паров, а также параметры сбора и обработки дифракционных данных для решения структур методом рентгеноструктурного анализа.

Третья глава описывает полученные в работе Результаты и их обсуждение. В начале главы приводятся данные об изменении дифракционных свойств кристаллов тиоцианатдегидрогеназы из *Thioalkalivibrio paradoxus* (tpTcDH) методом точечного мутагенеза. Генно-инженерный подход по улучшению качества кристаллов tpTcDH путем точечного мутагенеза поверхностных остатков не привел к положительному результату, поэтому далее в главе приводятся результаты структурных исследований гомологичного фермента из другого микроорганизма – тиоцианатдегидрогеназы из *Pelomicrobium methylophilum* (pmTcDH). Аминокислотные последовательности tpTcDH и pmTcDH имеют степень идентичности ~ 69 % и все десять аминокислотных остатков активного центра, а также участки полипептидной цепи, формирующие стенки активного центра и субстратного канала консервативны у обоих ферментов. В результате методом рентгеноструктурного анализа установлены структуры с высоким разрешением как свободной холоформы фермента pmTcDH, так и структура комплекса pmTcDH с ингибитором тиомочевой кислоты и аналогом субстрата селеноцианата. На основе данных спектроскопии ЭПР была получена информация о состоянии трехъядерного медного центра pmTcDH после связывания селеноцианата и образования мостикового комплекса двух ионов меди Cu^{2+} и Cu^{3+} с атомом селена. Кроме того, было показано влияние ионов меди в активном центре на упаковку и конформацию молекул pmTcDH в кристалле. Методом

точечного мутагенеза аминокислотных остатков в активном центре TcDH были получены варианты фермента с неполным медным центром TcDH путем замены координирующих гистидинов для установления роли ионов меди в ферментативной реакции. В конце главы дано описание результатов структурных исследований деталей первых этапов каталитической реакции TcDH, включая этапы связывания субстрата в активном центре, активации атакующей молекулы воды и нуклеофильной атаки.

В разделе Заключение сделано обобщение всех полученных результатов, после чего формулируются Выводы работы и приводится список использованной литературы.

Научная новизна

Научная новизна работы состоит в получении новых данных о механизме функционирования фермента тиоцианатдегидрогеназы. Методом рентгеновской кристаллографии с атомарным разрешением была описана архитектура медного центра. Впервые получены структуры комплексов тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Pelomicrobium methylophilum* (pmTcDH) с ингибиторами и аналогом субстрата, и подтверждена ориентация субстрата в активном центре фермента. Установлено влияние ионов меди активного центра фермента на упаковку и конформацию pmTcDH в кристалле. На основе точечного мутагенеза подтверждена значимая роль консервативных аминокислотных остатков фенилаланина и гистидина активного центра фермента для катализа. Методом спектроскопии ЭПР охарактеризовано окислительно-восстановительное состояние медного центра и показано его восстановление при связывании ферментом селеноцианата. Полученные данные существенно дополняют имеющуюся информацию о функционировании медных ферментов и вносят вклад в понимание биологических функций меди как кофактора.

Практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в получении с атомарным разрешением архитектуры медного центра тиоцианатдегидрогеназы в двух конформациях. Впервые получены структуры комплексов фермента с ингибитором тиомочевинной и аналогом субстрата селеноцианатом, что подтверждает ранее предложенную модель связывания субстрата. Продемонстрирована возможность получения полного трехъядерного медного центра настаиванием кристаллов апоформы pmTcDH солями меди Cu^{+2} и Cu^{+1} , а также показано влияние ионов меди в активном центре на упаковку молекул и конформацию субъединиц димера pmTcDH в кристалле. Результаты работы существенно расширили знания об устройстве и принципах действия уникального трёхъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназ и вносят важный вклад в общую картину того, как ионы меди функционируют в качестве кофактора в ключевых окислительно-восстановительных процессах живых организмов. По результатам исследований в международный банк данных PDB (Protein Data Bank) депонированы одиннадцать структур с кодами 8BPN, 8P3L, 8P3M, 8Q9X, 8Q9Y, 8YOU, 8YU5, 8YU6, 8Z75, 8Z76, 8Z77.

Практическая значимость работы заключается в возможности применения разработанных подходов для изучения механизмов действия других медных ферментов, что, несомненно, важно для создания новых биокатализаторов, биосенсоров и ферментов для очистки окружающей среды от токсичных загрязнителей.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в работе результаты могут быть полезными при планировании научных исследований ферментов. Результаты работы могут быть использованы в научных и научно-образовательных организациях, занимающихся исследованиями белков, например,

в Институте биоорганической химии РАН (Москва), МГУ имени М.В.Ломоносова (Москва), Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск), в Казанском (Приволжском) федеральном университете, Санкт-Петербургском государственном университете, Новосибирском государственном университете. Результаты диссертационной работы можно рекомендовать для использования в образовательном процессе подготовки курсов лекций для студентов и аспирантов, обучающихся по специальностям «Молекулярная биология», «Биофизика», «Биохимия».

Достоверность полученных результатов

Достоверность научных положений, выводов и заключений, сформулированных в диссертации, подтверждена использованием комплементарных методов структурной биологии и биохимии. В работе применялись современные методы геной инженерии для разработки генетических конструкций; методы рекомбинантного синтеза белков и их очистки методом хроматографии. Полученные белки исследовали с помощью современных физико-химических методов, таких как спектроскопия ЭПР и белковая кристаллография.

Основные результаты диссертационной работы отражены в публикациях. По теме работы опубликовано 4 четыре статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конференциях: 12-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» в г. Санкт-Петербург в 2019 году; II Межвузовская студенческая конференция «Студенческий биохимический форум – 2020» в МГУ в 2020 году; XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2021 году; XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2022 году; VII Съезд биохимиков России в Сочи – Дагомыс в 2022 году; Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» в ФИЦ Биотехнологии РАН в 2022 году; 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» в г. Суздаль в 2023 году; V Международная школа по структурной биологии в ИБХ РАН в 2024 году; 14 Международная мультikonференция Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология в г. Новосибирск в 2024 году; Биомембраны 24 в МФТИ в 2024 году; XI Российский симпозиум «Белки и пептиды» в ПСБ «Патриот», Московская область в 2024 году; Конференция Физико-химическая биология в МГУ в 2025 году; XV Конференция молодых ученых по общей и неорганической химии в ИОНХ им. Н.С. Курнакова РАН в 2025 году.

Замечания по работе

К работе нет замечаний принципиального характера, которые повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов. Тем не менее, стоит отметить несколько недочетов:

1. В разделе «уникальный трехъядерный медный центр trTcDH » для подтверждения, что центр именно трехъядерный следовало привести сравнение спектров ЭПР для фермента с одним связанным ионом и двумя ионами.
2. Проводились ли измерения спектров ЭПР при понижении температуры вплоть до гелиевых? Это позволило бы потенциально разделить вклады от разных парамагнитных центров.
3. В тексте не указано почему при обработке данных РСА положение части атомов уточнялось в изотропном приближении, а части атомов в анизотропном приближении?

4. Каким образом в ходе эксперимента удалось преодолеть трудности, связанные с нестабильностью соединений меди(I) и их склонностью к диспропорционированию, для успешного проведения процедуры настаивания кристаллов?

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной и теоретической работе.

Заключение

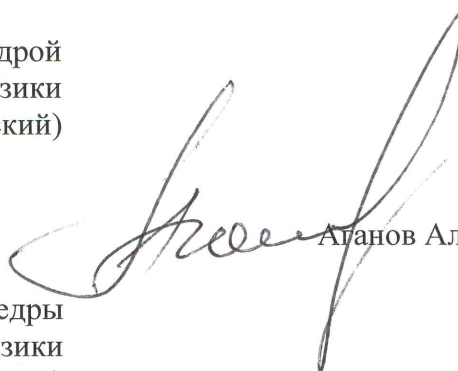
Диссертационная работа Варфоломеевой Л. А. «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» является законченной, выполненной с использованием современных методов, научно-квалификационной работой, направленной на решение актуальных задач в области исследования ферментов. Полученные автором и представленные в диссертации результаты в полной мере свидетельствуют о решении поставленных задач. Научные положения, основные результаты и выводы, изложенные в работе, аргументированы, достоверны и обоснованы.

Данная диссертационная работа соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями в последней редакции от 25.01.2024), предъявляемым к кандидатским диссертациям, и заслуживает высокой оценки, а автор диссертации, Варфоломеева Лариса Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Диссертационная работа Варфоломеевой Ларисы Александровны «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана и утверждена на расширенном заседании кафедры медицинской физики Института физики ФГАОУ ВО КФУ 26 июля 2025 г. (Протокол № 15).

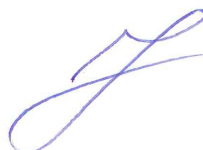
Отзыв ведущей организации подготовлен

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой
медицинской физики Института физики
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
e-mail: Albert.Aganov@kpfu.ru
телефон: +7 (843) 233-76-34



Аганов Альберт Вартанович

д.ф.-м.н., профессор кафедры
медицинской физики Института физики
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
e-mail: k.usachev@kpfu.ru
телефон: +7 (843) 233-76-01



Усачев Константин Сергеевич

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

(ФГАОУ ВО «КФУ»)

Адрес организации:

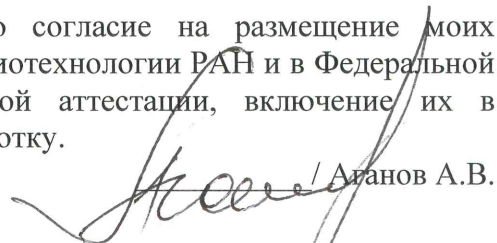
420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, КФУ

Телефон организации 8 843 233 74 00

Адрес электронной почты организации public.mail@kpfu.ru

Web сайт организации https:// kpfu.ru/

Я, Аганов Альберт Вартанович, 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.

 / Аганов А.В.

Я, Усачев Константин Сергеевич, 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.

 / Усачев К.С.

Подпись д.х.н. Аганова А.В. и д.ф.-м.н. Усачева К.С. заверяю

