

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Варфоломеевой Ларисы Александровны "Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы", представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.4. Биохимия

Оппонент: Мишин А.В., к.ф.-м.н., старший научный сотрудник МФТИ, Физтех

Актуальность темы исследования

Диссертация посвящена структурному исследованию трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы (TcDH), фермента, участвующего в окислении тиоцианата у бактерий, таких как *Thioalkalivibrio paradoxus* и *Pelomicrobium methylophilum*. Изучение медьсодержащих ферментов, особенно их активных центров, представляет значительный интерес для биохимии и биофизики, поскольку эти ферменты играют ключевую роль в биологических окислительно-восстановительных процессах. Результаты исследования имеют потенциал для применения в биотехнологии, включая переработку серосодержащих соединений, и в фундаментальной науке для понимания молекулярных механизмов катализа. Для изучения механизма действия фермента использованы современные биофизические методы, такие как рентгеновская кристаллография и ЭПР-спектроскопия. Тема диссертации актуальна и соответствует современным направлениям биохимических исследований.

Теоретическая и практическая значимость результатов работы

Теоретическая и практическая значимость работы по структурному исследованию трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) заключается в углублении понимания молекулярных механизмов функционирования медьсодержащих ферментов, что способствует развитию фундаментальной биохимии и биофизики. Работа вносит значительный вклад в понимание структурных особенностей и механизма действия медьсодержащих ферментов. Применение рентгеновской кристаллографии для определения структуры фермента и его комплексов с субстратами и ингибиторами является важным шагом в изучении каталитического механизма. Данные ЭПР-спектроскопии дополняют структурную информацию, предоставляя сведения о состоянии ионов меди в активном центре.

Высококачественные структурные данные, полученные в диссертации, позволили детально описать архитектуру медного центра в двух конформациях, подтвердить модель связывания субстрата с помощью структур комплексов с ингибиторами и аналогами, а также выявить роль консервативных аминокислотных остатков в катализе, что обогащает теоретические представления о конформационных изменениях и

окислительно-восстановительных процессах в ферментах. На практике результаты исследования открывают перспективы для биотехнологических приложений, таких как биоремедиация промышленных стоков, содержащих тиоцианат (например, из горнодобывающей и металлургической отраслей), где TcDH может использоваться для эффективного разложения токсичных соединений в системах очистки сточных вод. Кроме того, понимание механизма TcDH способствует созданию искусственных катализаторов для экологически чистых процессов окисления серосодержащих веществ, что актуально для глобальных геохимических циклов и устойчивого развития.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов, сформулированных в диссертации

Диссертация основана на обширном экспериментальном материале, выполнена на высоком научном уровне с использованием современных методов и тщательным анализом данных, что обеспечивает **достоверность** полученных результатов.

Работа представляет собой комплексное исследование трехъядерного медного центра TcDH с использованием современных методов структурной биологии. Автору удалось определить трехмерную структуру фермента с разрешением 1.05 Å, что является значительным достижением, обладающим очевидной **научной новизной**. В диссертации впервые охарактеризована архитектура активного центра TcDH, включая два конформационных состояния (открытое и закрытое), и изучены комплексы фермента с ингибиторами и аналогами субстратов, такими как тиомочевина и селеноцианат. Была изучена система субстратных каналов и водородных связей, определяющих функциональность фермента.

Особое внимание уделено роли трехъядерного медного центра, сформированного при замачивании кристаллов в растворах с ионами меди (Cu^{2+} и Cu^{1+}). Исследование мутантных форм фермента (например, F436Q и H447Q) позволило выявить влияние координации медных ионов на каталитическую активность и конформационные изменения. Данные ЭПР-спектроскопии дополняют структурную информацию, предоставляя сведения о состоянии ионов меди в активном центре, что подчеркивает новизну исследования. Исследование вносит существенный вклад в понимание механизмов функционирования медьсодержащих ферментов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, заслуживает самой высокой оценки. Надежность результатов подкреплена использованием воспроизводимых экспериментов и достоверного статистического анализа. Уровень публикаций в престижных рецензируемых журналах и наличие докладов на международных конференциях с апробацией диссертационного исследования

подтверждает высокий уровень признания работы научным сообществом. Публикации в рецензируемых журналах и доклады на международных конференциях, таких как Biomembranes24 и POSTGENOM2024, свидетельствуют о признании результатов научным сообществом.

Характеристика разделов работы

Диссертация написана в научном стиле, текст логичен и структурирован. Оформление соответствует классическому стилю и требованиям ВАК.

Работа включает 138 страниц, 39 рисунков и 13 таблиц, что свидетельствует о тщательной проработке материала. Работа имеет четкую структуру, строгий и последовательный характер изложения, достаточный для понимания иллюстративный материал, полноценные приложения.

Цели и задачи исследования четко сформулированы и соответствуют заявленной теме. Основная цель — структурное исследование трехъядерного медного центра TcDH — достигнута через улучшение качества кристаллов, определение структуры, анализ комплексов и изучение каталитического механизма.

Объект исследования: Трехъядерный медный центр тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* и *Pelomicrobium methylotrophicum*. Предмет исследования: Структурно-функциональные характеристики трехъядерного медного центра TcDH, включая его роль в каталитической активности и конформационные изменения. Актуальность, ожидаемая практическая значимость логично обоснованы.

Литературный обзор, включающий 210 источников, демонстрирует глубокий анализ существующих данных, охватывает ключевые работы по медьсодержащим ферментам, обеспечивая теоретическую основу исследования. Методы, описанные в диссертации, включают генетическую инженерию, экспрессию, выделение, очистку и характеризацию рекомбинантных форм фермента, кристаллизацию, сбор и обработку рентгеновских данных, а также функциональные тесты ферментативной активности, ЭПР-спектроскопию. Изложены все необходимые подробности, касающиеся методик проведения экспериментов, используемых реактивов и материалов.

В работе обсуждаются оригинальные экспериментальные данные и их анализ. Основные результаты включают в себя структурные модели исследуемого фермента в различных состояниях, включая комплексы с субстратами и ингибиторами. Данные ЭПР-спектроскопии подтверждают структурные наблюдения и предоставляют информацию о координационной сфере ионов меди. Обсуждение результатов проводится на высоком уровне с привлечением данных из литературы и сравнением с аналогичными системами.

Выводы суммируют основные результаты исследования и их значимость. Они соответствуют поставленным задачам и подкреплены представленными

экспериментальными данными и результатами их обработки. Положения выносимые на защиту также являются обоснованными.

Существенных замечаний к работе не имеется, стоит отметить, что в ряде моментов возможно более подробное описание используемых методик. Также присутствуют незначительные стилистические ошибки и неточности. Некоторые аспекты каталитического механизма могли бы быть дополнены анализом кинетических параметров реакции для более полного описания функциональности фермента. Рекомендуется в будущих исследованиях уделить внимание кинетическим характеристикам мутантных форм TcDH для дополнения структурных данных.

Так же работы могли бы дополнить данные по стабильности мутантных форм TcDH и анализ динамики активного центра методами молекулярного моделирования. Замечания не снижают научной ценности работы, но обозначают направления для будущих исследований.

В целом, работа заслуживает очень высокой оценки. Соискатель продемонстрировала большой объём экспериментальной работы, глубину анализа и навыки междисциплинарной колаборации (кристаллография, спектроскопия, биохимия и молекулярная биология). Содержание автореферата соответствует основным положениям и выводам диссертации. Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение

Диссертация Варфоломеевой Л.А. на тему «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» представляет собой завершённое исследование, вносящее значительный вклад в биохимию металлоферментов и полностью соответствует требованиям и критериям, предъявляемым ВАК к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия (пункты 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013), а ее автор, Варфоломеева Л.А., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент

Мишин Алексей Викторович, кандидат физико-математических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика, старший научный сотрудник, и.о. заведующего лаборатории структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком, Федерального государственного автономного образовательного

учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», (МФТИ, Физтех).



А.В. Мишин

01.09.2025

Адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, 9

Телефон: +79168100784

Электронная почта: mishinalexey@phystech.edu

Я, Мишин Алексей Викторович, даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ "Фундаментальные основы Биотехнологии" РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело и дальнейшую обработку.



А.В. Мишин

01.09.2025

«Подпись к.ф.-м.н. Мишина А.В. заверяю»

Ученый секретарь Ученого совета МФТИ, Физтех

Евсеев Е.Г.



01.09.2025