



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

15.05.2025

На №

№

от

85-01-19/497



Д.Б.Н. Федоров А.Н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Варфоломеевой Ларисы Александровны «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Осенью 2018 года Варфоломеева Лариса Александровна пришла в лабораторию инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» для выполнения научно-квалификационной работы магистра. В 2020 году Лариса Александровна окончила магистратуру кафедры биохимии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01 «Биология». С 2020 г. по настоящее время Лариса Александровна работает в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника. В 2020 году Лариса Александровна поступила в очную аспирантуру ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В 2024 г. Варфоломеевой Л.А. присвоена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь» (диплом об окончании аспирантуры 107705 0002689). Все кандидатские экзамены сданы.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Бойко Конастантин Михайлович, старший научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По результатам рассмотрения диссертации «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Данная работа посвящена структурно-функциональной характеристике тиоцианатдегидрогеназы, важного метаболического фермента сероокисляющих бактерий, содержащего уникальный трехъядерный медный центр. Результаты исследований позволили детализировать механизм каталитической реакции тиоцианатдегидрогеназы.

Медь является важным микроэлементом, необходимым для жизнедеятельности всех живых организмов. Основная роль меди в биологических системах заключается в транспорте молекулярного кислорода и электронов, а также в катализе окислительно-восстановительных реакций. Медные ферменты катализируют окисление или восстановление широкого спектра низко- и высокомолекулярных субстратов, начиная от молекул газов и заканчивая биополимерами, и вовлечены в процессы аэробного и анаэробного нитратного дыхания, окисления серосодержащих неорганических соединений, деградации лигнина и полисахаридов, формирования посттрансляционных модификаций, синтеза пигментов, медиаторов и антибиотиков, гомеостаза железа, меди и селена. Многообразие выполняемых биологических функций меди как кофактора переносчиков и ферментов обусловлено тонкой настройкой электронного строения и окислительно-восстановительных свойств иона меди, что обеспечивается определенной геометрией координационной сферы и белкового окружения. Расширение данных о спектральных свойствах, строении и функционировании медных центров ферментов способствует установлению взаимосвязи между их архитектурой и каталитическими свойствами. Такие данные могут послужить отправной точкой в создании методами искусственного интеллекта и синтетической химии новых медных органических комплексов или активных центров ферментов, являющихся эффективными биокатализаторами реакций, не встречающихся в природе.

Данные об участии медных ферментов в метаболизме серосодержащих неорганических соединений появились не так давно. В частности, таким медным ферментом является тиоцианатдегидрогеназа (EC 1.8.2.7) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*tpTcDH*), которая катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементарной серы и содержит уникальный трехъядерный медный центр. На основании установленной кристаллической структуры и квантово-механических расчетов ранее был сформулирован гипотетический механизм каталитической реакции *tpTcDH*. Однако, экспериментально верифицировать предложенный механизм на основании имеющихся структурных данных не представлялось возможным в связи со

сложностью интерпретации в последних деталях тонкой структуры активного центра и отсутствием структур комплекса фермента с потенциальными ингибиторами. Предметом настоящей диссертационной работы является структурно-функциональная характеристика тиоцианатдегидрогеназ из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 и *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) с целью детализации механизма каталитической реакции.

Целью данной работы является структурно-функциональная характеристика тиоцианатдегидрогеназ из бактерий *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (*tpTcDH*) и *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) и уточнение механизма каталитической реакции.

Научная новизна

Впервые была установлена пространственная структура с атомным разрешением (1.05 Å) тиоцианатдегидрогеназы *pmTcDH* из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum*. Архитектура медного центра *pmTcDH* детально охарактеризована в двух конформациях. Впервые получены структуры комплексов *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. Методом точечного мутагенеза подтверждена значимая роль консервативных аминокислотных остатков фенилаланина и гистидина активного центра фермента для катализа. Охарактеризовано окислительно-восстановительное состояние медного центра *pmTcDH* методом спектроскопии ЭПР, и показано восстановление медного центра фермента при связывании селеноцианата. Все вышеперечисленные структурные данные способствовали детализации механизма функционирования тиоцианатдегидрогеназы.

Теоретическая и практическая значимость

Высокое качество структурных данных позволило подробно описать архитектуру медного центра тиоцианатдегидрогеназы в двух конформациях. Впервые полученные структуры комплексов фермента с ингибитором тиомочевинной и аналогом субстрата селеноцианатом подтверждают ранее предложенную модель связывания субстрата. В представленной работе продемонстрирована возможность получения полного трехъядерного медного центра настаиванием кристаллов апоформы *pmTcDH* солями меди Cu^{+2} и Cu^{+1} . Показано влияние ионов меди в активном центре на упаковку молекул и конформацию субъединиц димера *pmTcDH* в кристалле. В работе продемонстрирована важность консервативного у ряда тиоцианатдегидрогеназ аминокислотного остатка фенилаланина для осуществления конформационных переходов в процессе катализа. Результаты работы внесли значительный вклад в расширение знания об устройстве уникального трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназ, а также о функционировании фермента и механизме каталитической реакции, что дополняет общее понимание роли иона меди как кофактора в биологических окислительно-восстановительных процессах.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор принимал непосредственное участие в постановке научных задач, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их представлении. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя является определяющей.

Степень достоверности

Достоверность представленных в диссертации Варфоломеевой Л.А. данных и сделанных выводов обеспечена применением современных методов исследования и использованием высококачественных реактивов и оборудования. При проведении экспериментов были поставлены необходимые контроли. Одиннадцать пространственных структур соответствовали требованиям качества, предъявляемым к кристаллическим структурам макромолекул банком данных PDB (www.rcsb.org), и были депонированы в PDB с кодами 8BPN, 8P3L, 8P3M, 8Q9X, 8Q9Y, 8YOU, 8YU5, 8YU6, 8Z75, 8Z76, 8Z77.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

Апробация работы

По теме научной работы было опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных и всероссийских 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 мультиконференция 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.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

По материалам диссертационной работы опубликовано четыре статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и тринадцать тезисов, опубликованных в материалах международных и всероссийских конференций, которые приведены ниже.

Список публикаций

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science :

1. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Kulikova O.G., Dergousova N.I., Rakitina T.V., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Probing the role of a conserved phenylalanine in the active site of thiocyanate dehydrogenase // Crystals. – 2022. – Vol. 12. – P. 1787. **IF 2.6 (WoS).**
2. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Дергоусова Н.И., Дороватовский П.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Улучшение дифракционных свойств кристаллов тиоцианатдегидрогеназы // Кристаллография. – 2023. – Т. 68(6). – С. 888-893. **IF 0.7 (WoS).**
3. **Varfolomeeva L.A.**, Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Khrenova M.G., Tikhonova T.V., Popov V.O. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 279. – P. 135058. **IF 7.0 (WoS).**
4. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Н. И. Дергоусова, Миняев М.Е., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Влияние ионов меди на упаковку и конформацию тиоцианатдегидрогеназы в кристалле // Кристаллография. – 2025. – Т. 70(1). – С. 10-17. **IF 0.7 (WoS).**

Тезисы докладов:

1. **Varfolomeeva L.A.**, Polyakov K.M., Komolov A.S., Rakitina T.V., Tikhonova T.V., Popov V.O. Crystallization and structure analysis of the mutant forms of thiocyanate dehydrogenase from *Thioalkalivibrio paradoxus* // Biocatalysis: Fundamentals and applications. Abstracts of 12th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications” (Saint-Petersburg, June 24-28, 2019) – 2019. – P. 122.

2. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Тихонова Т.В., Попов В.О. Кристаллизация и структурный анализ мутантных форм тиоцианатдегидрогеназы из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* с заменами K281A и K264A, K267A // Сборник тезисов II Межвузовской студенческой конференции «Студенческий биохимический форум – 2020» (9–10 февраля 2020, МГУ) – 2020. – С. 21-22.
3. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Комолов А.С., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Модификация поверхностных остатков тиоцианатдегидрогеназы (TCDH) предотвращает двойникование кристаллов фермента // Сборник тезисов «XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2021, ИБХ РАН). – 2021. – С. 8.
4. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Цаллагов С.И., Шабалин И.Г., Хренова М.Г., Бойко К.М., Ракитина Т.В., Хаген В.Р., Тихонова Т.В., Попов В.О. Новый медьсодержащий фермент тиоцианатдесульфуразы – от структурных исследований к механизму действия // Сборник тезисов “III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «белки и пептиды». VII Съезд физиологов СНГ” (Сочи – Дагомыс, Россия 3–8 октября 2021). – 2021. – Т. II. – С. 122.
5. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестройки медного кластера тиоцианатдегидрогеназы из *Hydrogenophila bacterium* в процессе каталитической реакции на основе рентгеноструктурных данных с атомным разрешением // Сборник тезисов «XXXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (8–11 февраля 2022, ИБХ РАН). – 2022. – С. 13.
6. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Ракитина Т.В., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Консервативный остаток f436 не участвует в сборке медного кластера активного центра, но стабилизирует конформацию последнего в тиоцианатдегидрогеназе // Сборник тезисов “Актуальные аспекты современной микробиологии XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Сателлитная конференция для молодых ученых «Современная структурная биология» (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва, 16–18 ноября 2022 г.) – 2022. – С. 48-49.
7. **Варфоломеева Л.А.**, Поляков К.М., Соловьева А.Ю., Шипков Н.С., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Перестроение трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы в процессе катализа // Сборник тезисов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, Россия 25-29 июня 2023) – 2023. – Т. I. – С. 52.
8. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. The subunits in a dimer of thiocyanate dehydrogenase function independently // V International school of structural biology « Structural biology: main

problems and approaches to their solution» (IBCh RAS, Moscow, June 5-7, 2024) – 2024. – P. 84.

9. **Varfolomeeva L.A.**, Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. De-tails of the structure and function of the bacterial thiocyanate dehydrogenase with the unique copper active site // 14th International Multiconference «Bioinformatics of Genome regulation and Structure / Systems Biology» (BGRS/SB-2024) (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, August 5-10, 2024) – 2024. – P. 619-620.
10. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Copper ions influence thiocyanate dehydrogenase crystal packing and subunit conformation // International conference «Biomembranes'24» (MIPT, October 7-11, 2024) – 2024. – P. 112.
11. **Varfolomeeva L.A.**, Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Khrenova M.G., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural basis of thiocyanate oxidation in the trinuclear copper center of thiocyanate dehydrogenase // VI International scientific and practical conference «POSTGENOM'2024», XI Russian symposium «Proteins and peptides», Russian-Chinese life sciences congress (Moscow region, «Patriot», October 29 – November 2 2024) – 2024. – P. 348.
12. **Варфоломеева Л.А.**, Ефимов Н.Н., Ротов А.В., Уголкова Е.А., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Детали функционирования трехъядерного медного центра тиоциа-натдегидрогеназ // Сборник тезисов Конференции Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ (г. Москва, 20-22 февраля 2025) – 2025.
13. **Варфоломеева Л.А.**, Соловьева А.Ю., Ефимов Н.Н., Ротов А.В., Уголкова Е.А., Дергоусова Н.И., Бойко К.М., Тихонова Т.В., Попов В.О. Характеристика свойств медных центров белков trCupC и pmTcDH методом спектроскопии ЭПР // Сборник тезисов XV Конференции молодых ученых по общей и неорганической химии (ИОНХ им. Н.С. Курнакова, г. Москва, 8-11 апреля 2025) – 2025.

Рекомендуемые оппоненты:

Тищенко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук».

Мишин Алексей Викторович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Рекомендуемая ведущая организация

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

Диссертация «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» Варфоломеевой Ларисы Александровны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

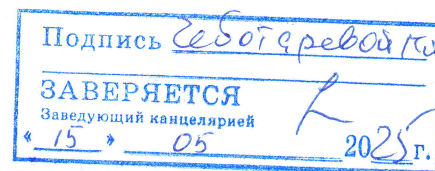
Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий инженерной энзимологии, биотехнологии ферментов, структурной биохимии белка и белок-белковых взаимодействий Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и лаборатории химии координационных полиядерных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук», протокол № 4 от «10» апреля 2025 года. Присутствовало на семинаре – 27 человек. Результаты голосования: «за» - 27 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет.

Председатель совместного семинара лабораторий

Заместитель заведующего лабораторией структурной биохимии белка,

доктор биологических наук

Н.А. Чеботарева



Секретарь

Младший научный сотрудник лаборатории

инженерной энзимологии,

кандидат химических наук

А.К. Бакунова

15.05.2025

