

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 23 октября 2025 г. № 11
о присуждении Варфоломеевой Ларисе Александровне,
гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» по специальности 1.5.4. Биохимии принята к защите 26 июня 2025 г. (протокол № 8) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. №501/нк.

Соискатель

Варфоломеева Лариса Александровна в 2020 году окончила с отличием магистратуру кафедры биохимии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01 «Биология». 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).

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.

Диссертация «Структурное исследование трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы» выполнялась в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

Бойко Константин Михайлович, кандидат биологических наук, специальность 03.00.04. Биохимия, старший научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Официальные оппоненты:

Тищенко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, специальность 03.01.03 Молекулярная биология, 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, специальность 03.01.02 Биофизика, 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)».

Выбор официальных оппонентов обусловлен:

тем, что доктор биологических наук Тищенко Светлана Викторовна является одним из ведущих отечественных специалистов в области биохимических и структурных исследований функционирования медьсодержащих ферментов.

тем, что кандидат физико-математических наук, Мишин Алексей Викторович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования структур макромолекул методом рентгеноструктурного анализа.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Варфоломеевой Л.А.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» в своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук, профессором, заведующим кафедрой медицинской физики Института физики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Агановым А.В. и доктором физико-математических наук, профессором кафедры медицинской физики Института физики

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Усачевым К.С. и утвержденном первым проректором – проректором по научной деятельности ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» доктором физико-математических наук Д.А. Таюрским, указала, что диссертационная работа Варфоломеевой Л.А. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Варфоломеева Л.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» является признанным отечественным научным центром и в своем составе имеет несколько подразделений, занимающихся исследованием структурной организации и механизмов функционирования макромолекул методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и рентгеноструктурного анализа. Таким образом, сотрудники ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и, в частности, кафедры медицинской физики Института физики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой и методологией диссертационной работы Варфоломеевой Л.А.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Варфоломеевой Л.А. изложены в 4 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.04.2013 г. №842:

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. Molecular mechanism of thiocyanate dehydrogenase at atomic resolution // 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).**

Результаты работы также были представлены в виде стендовых и устных докладов на 13 всероссийских и международных конференциях и опубликованы в материалах этих конференций.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук» **Тищенко Светланы Викторовны** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопрос:

Замечания:

1. Для лучшего восприятия информации следовало бы ввести определение второй координационной сферы ионов меди и указать какие аминокислотные остатки к ней относятся.

2. В работе встречаются не совсем удачные определения, например, «медные ферменты» и «медные белки», в русской интерпретации всё же лучше заменить их на «медьсодержащие».

Вопрос:

1. Каковы, по мнению автора, структурные причины более низкой активности pmTcDH по сравнению с активностью tpTcDH?

Отзыв официального оппонента кандидат физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» **Мишина Алексея Викторовича** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

Замечания:

1. Существенных замечаний к работе не имеется, стоит отметить, что в ряде моментов возможно более подробное описание используемых методик.

2. Также присутствуют незначительные стилистические ошибки и неточности.

3. 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.

4. Так же работы могли бы дополнить данные по стабильности мутантных форм TcDH и анализ динамики активного центра методами молекулярного моделирования.

Отзыв ведущей организации **Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

Замечания:

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?

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Архипова Сергея Григорьевича, кандидата химических наук, старшего научного сотрудника Отдела синхротронных исследований для биологии и биомедицины ЦКП СКИФ Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН.

Отзыв Архипова Сергея Григорьевича замечаний не содержит.

Васиной Дарьи Владимировны, кандидата биологических наук, заведующего лабораторией энзимологии Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Отзыв Васиной Дарьи Владимировны замечаний не содержит.

Сольева Павла Николаевича, кандидата химических наук, ведущего научного сотрудника, руководителя лаборатории химической регуляции биокатализа Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Отзыв Сольева Павла Николаевича замечаний не содержит.

Слонимского Юрия Борисовича, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории белок-белковых взаимодействий ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Отзыв содержит следующее замечание по оформлению автореферата:

Малый размер названий аминокислотных остатков тиоцианатдегидрогеназ на рисунках 9 (стр. 15), 11 (стр.16) и 13 (стр. 18) усложняет их прочтение, что, однако, нисколько не умаляет ценности текста.

С вопросами выступали:

Проф., д.х.н. Бовин Н.В., проф., д.х.н. Варламов В.П., д.б.н. Марданов А.В., д.б.н. Терёшина В.М., проф., д.б.н. Шумянцева В.В., проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б., к.б.н. Слонимский Ю.Б.

В дискуссии приняли участие:

Д.х.н. Безсуднова Е.Ю., член-корр. РАН, проф., д.б.н. Гусев Н.Б.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Точечная замена T169A на поверхности не привела к изменению упаковки молекул *tpTcDH* в кристалле и исчезновению двойникования. Точечная замена K281A на поверхности привела к изменению упаковки молекул фермента в кристалле и исчезновению двойникования. Точечный мутагенез не способствовал улучшению дифракционных свойств кристаллов *tpTcDH* для исследования деталей устройства активного центра.

2. Благодаря атомному разрешению (1.05 Å), охарактеризован трехъядерный медный центр тиоцианатдегидрогеназы из *Pelomicrobium methylotrophicum* (*pmTcDH*) в двух конформациях фермента, открытой и закрытой. Открытая конформация соответствует свободной форме фермента, закрытая конформация – форме фермента со связанным субстратом. Архитектура активного центра *pmTcDH* в закрытой и открытой конформациях отличается координационной сферой ионов меди, расположением каталитического аминокислотного остатка E253 и ионов меди Cu2 и Cu3.

3. Впервые установлены структуры комплексов *pmTcDH* с ингибитором тиомочевинной (с разрешением 1.1 Å) и аналогом субстрата селеноцианатом (с разрешением 1.8 Å). На основании полученных структурных данных подтверждена модель ориентации субстрата и переходного состояния в активном центре фермента. Атом серы/селена выполняет роль мостикового лиганда ионов меди Cu2 и Cu3, а атом азота координирует ион меди Cu1.

4. В отсутствие ионов меди молекулы апоформы *pmTcDH* принимают закрытую конформацию в кристалле. Формирование полного трехъядерного медного центра в структуре апоформы происходит при настаивании кристаллов растворами, содержащими ионы Cu^{+2} и Cu^{+1} . Ионы меди активного центра влияют на упаковку и конформацию субъединиц *pmTcDH* в кристалле.

5. Замена консервативного аминокислотного остатка F436 активного центра на глутамин приводит к полной потере ферментативной активности *tpTcDH*. Данный аминокислотный остаток важен в процессе конформационного перехода при закрытии/открытии субстратного канала.

6. Уточнены роли каждого из ионов меди трехъядерного центра *TcDH* и детализирован механизм каталитической реакции. Ион меди Cu1 участвует в правильном позиционировании атома азота субстрата, а ионы меди Cu2 и Cu3 – в последующем окислении субстрата. Каталитический аминокислотный остаток E253 участвует в активации нуклеофила и переносе протона.

Научная новизна работы:

- Впервые установлена пространственная структура с атомным разрешением (1.05 Å) тиоцианатдегидрогеназы *pmTcDH* из бактерии *Pelomicrobium methylotrophicum*;

- Охарактеризована архитектура медного центра *pmTcDH* в деталях для двух конформаций;
- 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;
- 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;
- Детализация механизма функционирования тиоцианатдегидрогеназы.

Практическая значимость работы:

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} . В ходе исследований были депонированы одиннадцать пространственных структур в банк данных PDB. Результаты работы внесли значительный вклад в расширение знания об устройстве уникального трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы, а также о функционировании фермента и механизме каталитической реакции, что дополняет общее понимание роли иона меди как кофактора в биологических окислительно-восстановительных процессах и может найти свое применение при дизайне синтетических биокатализаторов в биотехнологии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- Использованные методы исследования и проведенные расчеты корректны;
- Достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- Выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя заключался:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке основных публикаций по теме диссертации совместно с соавторами и научным руководителем автора.

Заключение

Диссертация Варфоломеевой Л.А. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые

на защиту, опубликованы в ведущих рецензируемых журналах (4 статьи) и материалах 13 международных и всероссийских конференций. Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 23 октября 2025 года диссертационный совет принял решение присудить Варфоломеевой Лариса Александровне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 10 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени - 19,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета
ФИЦ биотехнологии РАН
д.х.н., профессор

Ученый секретарь диссертационного совета
ФИЦ биотехнологии РАН
к.б.н.



Б.Б. Дзантиев

А.Ф. Орловский

«23» октября 2025 г.