

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Анастасии Юрьевны Соловьевой «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

Настоящая диссертация посвящена исследованию фундаментальной проблемы понимания механизмов направленного транспорта и встраивания ионов меди в активные центры ферментов. Важность этой проблемы связана с тем, что медь является 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. Многообразие выполняемых биологических функций меди как кофактора переносчиков и ферментов обусловлено особенностями строения электронных оболочек атомов меди и окислительно-восстановительных свойств ионов меди, что обеспечивает определенную геометрию координационной сферы и белкового окружения. Расширение данных о спектральных свойствах, строении и функционировании медных центров ферментов будет способствовать установлению взаимосвязи между их структурой и каталитическими свойствами. Такие данные могут послужить отправной точкой в создании новых органических комплексов или активных центров ферментов, содержащих медь и являющихся эффективными биокатализаторами реакций, не встречающихся в природе. Отмечу, что данные об участии ферментов, содержащих медь в активном центре, в метаболизме серосодержащих неорганических соединений появились не так давно. В частности, таким ферментом является тиоцианатдегидрогеназа (EC 1.8.2.7) из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (tpTcDH), которая катализирует реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы и содержит уникальный трехъядерный медный центр.

Учитывая сказанное выше, можно утверждать, что тема диссертационной работы Анастасии Юрьевны Соловьевой «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» представляется вполне актуальной и направлена на решение важной фундаментальной задачи, имеющей высокий инновационный потенциал.

В соответствии с выбранной темой соискатель провел исследование деталей функционирования и механизма сборки трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) *in vitro*. В рамках диссертационной работы были сформулированы и решены следующие задачи:

- поиск и характеристика потенциальных физиологических акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH.
- изучение кинетики активации TcDH при добавлении ионов Cu(II)/Cu(I) и кинетики инактивации при удалении ионов меди из активного центра TcDH.
- определение стехиометрии и аффинности связывания TcDH с ионами Cu(II)/Cu(I).
- изучение последовательности встраивания ионов меди в активный центр TcDH *in vitro*.
- биохимический и структурный анализ медьсвязывающего белка *tpCopC*, ген которого расположен в одном кластере с геном TcDH в геноме *Thioalkalivibrio paradoxus*.
- функциональная характеристика медьсвязывающего белка *tpCopC* как металлошаперона, участвующего во встраивании ионов меди в активный центр TcDH.

Диссертация содержит 3 главы, посвященные решению упомянутых выше задач. Кроме того, работа содержит введение, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации, список литературы, содержащий ссылки на 197 источников и приложение. Всего 125 страниц.

Введение посвящено обоснованию выбора темы исследования, актуальности работы, оценке степени разработанности темы, формулировке цели, задач, методологии и методам исследования. Во введении также формулируется научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, отмечены источники финансовой поддержки работы. Указано, что степень достоверности полученных результатов обеспечена использованием современных методов исследования и сертифицированного оборудования. Указаны публикации и апробация работы на конференциях, личный вклад автора, структура работы. Эта часть работы написано четко и ясно.

Анализ 1-ой главы (литературного обзора) позволяет сделать заключение, что автором проведено широкое исследование публикаций, посвященных системам транспорта и гомеостаза меди в грамотрицательных бактериях. Детально проанализированы механизмы сборки медных центров ферментов и роль периплазматических металлошаперонов в этом процессе. В обзоре описаны не только биохимические аспекты содержащих медь ферментов и особенности их сборки, но и методы, использующие хелатирующие агенты, оценки связывания ионов меди с белками с их особенностями. В конце литературного обзора сформулированы основные задачи работы. Безусловно положительное впечатление производит полный и широкий охват современных публикаций в рассматриваемых областях. В качестве замечания по этой части работы можно отметить краткие и не поясняющие суть некоторых рисунков подписи. Так на страницах 17, 23, 29 и 35 подписи к рисункам 2, 6, 9 и 14, соответственно, необходимо изложить более подробно.

Вместе с тем, спешу отметить, что высказанные замечания не искажают общего положительного впечатления от этой части работы.

Во второй главе перечислены материалы и использованные в работе инструментальные, расчетные и вычислительные методы, а также подробно

изложены методики получения и характеристики исследуемых образцов. Отмечу, что методическая часть изложена подробно и показывает высокий экспериментальный уровень работы.

Изложению собственно результатов работы автора посвящена третья глава. Автором были измерены кинетические параметры (КМ и v_{max}) реакции окисления тиоцианата до цианата с образованием двух электронов, которую катализирует TcDH, с нефизиологическими акцепторами электронов. Возможная роль акцептора электронов в реакции TcDH *in vivo* была исследована для двух белков – цитохромов c552 и c546/556. Было показано, что оба цитохрома способны принимать электроны в реакции, катализируемой TcDH. Эксперименты по кинетике активации TcDH показали, что процесс встраивания ионов Cu(I) в активный центр фермента является быстрым процессом по сравнению с ионами Cu(II). Исходя из разницы в скоростях активации с помощью Cu(II)/Cu(I), автором выдвинуто предположение, что сборка активного центра TcDH *in vivo* происходит с участием ионов Cu(I). Удаление ионов меди из активного центра TcDH приводит к медленному снижению ферментативной активности (7-14 суток) даже в присутствии лигандов, обладающих более высокой аффинностью к ионам Cu(II) и Cu(I) по сравнению с TcDH. Для объяснения этого факта автор разумно предполагает, что это связано с низкой доступностью активного центра TcDH, располагающегося на дне узкого субстратного канала на расстоянии 12 Å от поверхности глобулы, такая малодоступность активного центра может являться важным фактором сохранения кофактора у медных ферментов как конечных акцепторов меди *in vivo*.

Показано, что TcDH демонстрирует высокую аффинность к ионам меди в двух степенях окисления, что важно для предотвращения потери ионов в ходе каталитического цикла окисления/восстановления. Согласно полученной оценке, значения $\log KD$ трех сайтов TcDH для ионов Cu(II) лежат в диапазоне $-11,7 \geq \log KD \geq -16,4$ при pH 9,5, причем аффинность

сайтов увеличивается в ряду $Cu_3 \ll Cu_1 \approx Cu_2$. Все три сайта TсDH также способны связывать ионы Cu(I) со средним значением $\log KD = -13,0 \pm 0,3$ при pH 9,5.

Методом ЭПР-спектроскопии был изучен процесс встраивания ионов меди в активный центр TсDH. Показано, что на первом этапе медь встраивается в сайт Cu_2 , находящийся ближе всех к субстратному каналу, а затем распределяется между сайтами Cu_1 и Cu_2 ввиду их близкой аффинности к ионам Cu(II). Последним заполняется сайт Cu_3 , что связано с более низкой аффинностью сайта по сравнению с Cu_1 и Cu_2 из-за нетипичной для иона Cu(II) координации.

В качестве металлошаперона, участвующего в сборке активного центра TсDH *in vivo*, был изучен белок *tpCopC*, относящийся к широко распространенному у бактерий семейству медь-связывающих белков. Подробная биохимическая характеристика показала, что *tpCopC* демонстрирует высокую аффинность как к ионам Cu(II) ($\log KD = -16,3 \pm 0,6$ при pH 7,4), так и ионам Cu(I) ($\log KD = -11,1 \pm 0,2$ при pH 7,4). Методом рентгеноструктурного анализа было показано, что ион Cu(II) координируется в мотиве «гистидиновая скрепка» с участием аминокислотной группы и имидазольного кольца концевой H31, боковых групп консервативных остатков D140 и H142 и молекулы воды. Из результатов QM/MM MD, ион Cu(I) может быть координирован боковыми цепями H142, H31 и D140 в тригональной геометрии, благоприятной для иона Cu(I).

TсDH и Cu(II)-*tpCopC* образуют комплекс с $\log KD = -5,7 \pm 0,3$, и в комплексе происходит передача связанного иона меди между белками. В окисленных условиях наблюдается перенос в активный центр TсDH около $0,5 \pm 0,2$ ионов меди на субъединицу от Cu(II)-*tpCopC*, тогда как в восстановленных – $2,4 \pm 0,1$ ионов меди, причем в последнем случае активность TсDH достигает максимального значения. Таким образом, механизм передачи иона меди от *tpCopC* к TсDH, как предполагает автор, включает стадию промежуточного восстановления Cu(II)-*tpCopC* до Cu(I)-

tpCopC с последующим образованием комплекса TсDH - Cu(I)-*tpCopC*, в котором вследствие значительно более низкого сродства *tpCopC* к ионам Cu(I) происходит перенос ионов меди в активный центр TсDH по градиенту роста аффинности. Вопрос о восстановителе, участвующим в данном процессе, автор оставляет открытым.

При знакомстве с экспериментальными данными у меня возник ряд вопросов и замечаний.

На Рис. 24., описывающем характеристики нативного цитохрома с_{546/556} спектры поглощения приведены в т.н. условных единицах. Принято приводить спектры в оптических плотностях, которые пропорциональны концентрации вещества, поэтому и возникает вопрос зачем использовать абсолютно непонятные и неопределенные у.е. для спектров поглощения.

На Рис. 28. результаты приведены после обработки исходных спектров флуоресценции. Хотелось бы видеть первичные экспериментальные данные (спектры поглощения и спектры флуоресценции) для понимания вопроса о коррекции интенсивности флуоресценции остатков Trp на самопоглощение в системе при титровании в области 300 – 400 нм. Кроме того, на рис.28 не указаны интервалы ошибок при определении отношения изменение интенсивности флуоресценции (F/F₀).

На Стр. 82 рассмотрено определение стехиометрии и аффинности TсDH к ионам Cu(I) при конкурентном титровании с использованием лигандов Vcs и Vca, которые образуют окрашенные комплексы [Cu(I)-(Vca/Vcs)₂]³⁻ с известным сродством. Необходимо описать способ экспериментального определения (вычисления) точек перегиба на Рис. 30 для более четкого понимания логики определения стехиометрии.

Несмотря на то, что ЭПР исследования выполнены на высоком профессиональном уровне, к этой части работы возникли некоторые замечания.

Предполагается, что структура сайтов и лигандное окружение меди (II) в исследованных белках не изменяется при понижении температуры до 100 или даже до 20 К. Насколько обосновано данное предположение?

Экспериментальные спектры *a*, *б* на рисунке 31 (страница 84) идентичны. Также идентичны спектры *г*, *д* на том же рисунке. Разница в значениях магнитно-резонансных параметрах меди (II) сайта В (Cu1) с инкубированным одним и двумя эквивалентами меди незначительна, и ее можно рассматривать, как погрешность моделирования (табл. П1 и П2). Аналогичное утверждение верно и для параметров меди в сайте А (Cu2). Однако некоторые значения магнитно-резонансных параметров меди в этих же сайтах (А (Cu2) и В (Cu1)) с инкубированными тремя эквивалентами меди отличаются существенно. Например, $g_x=2.016$ для сайта В (Cu1) в табл. П2 (страница 124, два эквивалента меди) и $g_x=2.030$ для сайта В (Cu1) в табл. П3 (три эквивалента меди), или $A_z=170 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ для сайта В (Cu1) в табл. П2 (два эквивалента меди) и $A_z=192 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$ для сайта В (Cu1) в табл. П3 (три эквивалента меди). Это погрешность определения параметров или изменение лигандного окружения меди в данном сайте?

Экспериментальные спектры *в* и *е* на рисунке 31 (страница 84) характеризуются широкими линиями, по-видимому, обусловленными диполь-дипольным/обменным взаимодействием ионов меди, которое почему-то не учитывается при моделировании. Такие спектры хорошо моделируются в приближении суперпозиции 2-х сигналов от ионов меди, в то время как спектры *a*, *б* и *г*, *д* лучше будут моделироваться в приближении сигналов от 3-х и более ионов меди с разными лигандами. Хотелось бы знать, какие характерные особенности экспериментальных спектров ЭПР однозначно указывают на необходимость моделировать *a*, *б* и *г*, *д* в 2-х компонентном приближении, а *в* и *е* в 3-х компонентном.

На странице 62 в формулах 19 и 20 вместо $g_y \beta B_y S_y$ указано $g_z \beta B_y S_y$.

Вместе с тем, высказанные замечания не искажают общего положительного впечатления от работы А.Ю. Соловьевой. Результаты,

полученные автором, содержат очевидные признаки научной новизны и имеют неоспоримую практическую значимость.

По материалам диссертации были опубликованы 4 статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работ, изложенных в диссертации, были представлены в виде стендовых и устных докладов на 7 всероссийских и международных конференциях

Изучение диссертации, автореферата и опубликованных автором работ позволяет сделать вывод о том, что исследование проведено соискателем самостоятельно, диссертация написана лично автором, на высоком научном и профессиональном уровне, с использованием современных методов научных исследований и цифровых технологий, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты, выдвигаемые на публичную защиту, является законченным научным трудом, имеющим теоретическое и практическое значение. Опубликованные работы в достаточной степени отражают содержание и основные результаты, полученные автором диссертации.

Таким образом, проведенное в диссертационной работе А.Ю. Соловьевой «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» исследование предоставляет фундаментальные знания о механизме сборки уникального трехъядерного медного центра TсDH, который отличается по своей архитектуре от активных центров других известных медьсодержащих ферментов.

На основании изложенного считаю, что диссертационная работа «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. - Биохимия и требованиям пп. 9-11, 13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Соловьева

Анастасия Юрьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

**Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор,
директор ФГБУН «Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»
119334, Москва, ул. Косыгина д.4,
+7(499) 137-64-20, director@sky.chph.ras.ru**



И.Н. Курочкин

24.04.2026

Подпись И.Н. Курочкина удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН
кандидат биологических наук



Скалацкая С.И.