

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
на диссертационную работу Соловьевой Анастасии Юрьевны  
**«МЕХАНИЗМ СБОРКИ ТРЕХЪЯДЕРНОГО МЕДНОГО ЦЕНТРА И  
ДЕТАЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИОЦИАНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ»**,  
представленную  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.4. Биохимия

**Актуальность темы**

Диссертационная работа посвящена исследованию тиоцианатдегидрогеназы, катализирующей реакцию окисления тиоцианата до цианата и элементной серы, и функциональных белков-партнёров этого фермента. В работе проведён детальный биохимический и структурный анализ медь-связывающего белка CopC *Thioalkalivibrio paradoxus* (tpCopC), который охарактеризован как металлошаперон, участвующий во встраивании ионов меди в активный центр тиоцианатдегидрогеназы *Tv. paradoxus* (tpTcDH). Диссертантом тщательно изучен процесс сборки трёхъядерного медного центра tpTcDH *in vitro*. Актуальность полученных данных несомненна, поскольку они позволяют расширить границы понимания гомеостаза меди и функционирования медных центров ферментов, а также и могут быть полезны при разработке биологических методов детоксикации тиоцианат-содержащих отходов, образующихся в процессах промышленного производства инсектицидов, коксовании угля, добычи золота.

**Теоретическая и практическая значимость исследования**

Исследование, проведённое Соловьевой А.Ю., имеет теоретическую значимость, поскольку даёт представление о механизме сборки *in vitro* уникального медного центра tpTcDH как при встраивании свободных ионов меди, так и при участии металлошаперона tpCopC. Полученные результаты являются важным этапом в понимании механизмов биогенеза сложных медь-содержащих ферментов. Поскольку тиоцианат присутствует в промышленных сточных водах, образующихся при производстве гербицидов, газификации угля и др., то тиоцианатдегидрогеназы, разлагающие тиоцианат до нетоксичных продуктов, могут широко использоваться в биотехнологических процессах биоремедиации.

**Характеристика разделов работы**

Диссертационная работа имеет стандартные разделы: «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение»,

«заключение», «выводы» и «список литературы». Работа изложена на 125 страницах и включает 44 рисунка и 6 таблиц, 197 ссылок и 1 приложение.

В главе «Обзор литературы» рассмотрена роль меди в биологических процессах и системы гомеостаза меди в грамотрицательных бактериях. Подробно описан импорт ионов меди через внешнюю мембрану и далее в цитоплазму через периплазматическое пространство. Представлены наиболее изученные системы экспорта ионов меди в периплазму (Cu efflux, Cu sensing и copper resistance/plasmid-borne copper resistance (cop/pcr)). CopC, один из белков Cop/pcr-системы, в дальнейшем будет детально изучен в рамках представляемой диссертационной работы. Автором рассмотрены механизмы сборки активных центров медь-содержащих ферментов *in vivo*. Подробно описаны особенности встраивания ионов меди в цитохром с-оксидазу с помощью металлошаперонов ScoI, PcuC и Cox1, в N<sub>2</sub>O-редуктазу (NosZ) с участием NosDFY и NosL, в Cu,Zn-супероксиддисмутазу с помощью шаперона CueP, в медь-содержащую нитритредуктазу с участием шаперона AssA, тирозиназу с помощью белка-шаперона “caddie”. Приведена также информация об объекте диссертационной работы, тиоцианатдегидрогеназе из бактерии *Tv. paradoxus*.

В главе «Материалы и методы» дано подробное описание используемых методов, материалов и объектов исследования. Раздел включает описание аналитических методов, процессов получения и очистки рекомбинантных белков (tpTcDH, цитохромов c552, c546/556, tpCopC). Описаны процессы активации апо-tpTcDH ионами Cu(II)/Cu(I) и последующее определение ферментативной активности, удаление ионов меди из tpTcDH из активного центра с использованием комплексообразующих лигандов. Описаны методики прямого и конкурентного титрования для определения стехиометрии и аффинности связывания ионов металлов с исследуемыми белками, представлено определение константы диссоциации комплекса tpTcDH/tpCopC методом изотермической калориметрии. Раздел, посвящённый структурным методам исследования, включает описание ЯМР, ЭПР и рентгеноструктурный анализа, который был применён к tpCopC. Описан метод молекулярно-динамического моделирования, применённый к связыванию Cu(I) с медь-связывающим сайтом tpCopC.

В первой части следующей главы диссертации «Результаты и обсуждение» представлены результаты получения активной формы tpTcDH и определения кинетических параметров окисления тиоцианата с использованием нефизиологических и физиологических (цитохром c552) акцепторов электронов. Цитохром c552, ген которого расположен рядом с геном, кодирующим TcDH, получен в клетках *E.coli* в гем-содержащей

форме и охарактеризован. Структура цитохрома c552 определена методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии, методом белок-белкового докинга картирован участок взаимодействия TcDH с цитохромом c552.

Поскольку из *Tv. paradoxus* совместно с TcDH очищается цитохром c546/556, автором была проверена способность этого цитохрома быть акцептором электронов от trTcDH в реакции окисления тиоцианата и определена скорость такой реакции.

Вторая часть главы посвящена оценке активации trTcDH ионами Cu(II)/Cu(I) и исследованию кинетики инактивации фермента при удалении ионов меди из активного центра. Была проведена термодинамическая оценка связывания ионов металла в активном центре trTcDH.

Следующая часть диссертационной работы посвящена характеристике рекомбинантного tpCopC и определена его роль как металлошаперона trTcDH. Описана пространственная структура гомодимера tpCopC, проведено сравнение двух структур, полученных при pH 6.6 и pH 4.6 и моделирование связывания иона Cu(I) в медь-связывающем сайте. Исследовано взаимодействие Cu(II)-tpCopC и апоформы trTcDH.

В разделах «Заключение» и «Выводы» в краткой форме представлены этапы диссертационной работы и предположения, которые можно сделать на основе полученных результатов. Построение диссертационной работы логично, осмысленно, опечатки практически не встречаются.

Имеются несколько замечаний к главе «Материалы и Методы»:

- 1) Для успешного воспроизведения протокола очистки белка при описании градиентной элюции следует указывать не только конечные концентрации градиента (500 мМ имидазола или 1М NaCl), но и объём градиента.
- 2) Утверждается, что в кристаллизационной капле «соотношение белка к осадителю было 50:50». Видимо, имелось ввиду соотношение 1:1? Допущена также неточность, когда автор пишет, что кристаллы вымачивали в растворе, «содержащем 20% глицерин в качестве криопротектора», по всей видимости глицерин до 20% был добавлен к противораствору и такая смесь использовалась как криопротектор.
- 3) В диссертационной работе не указан код PDB (7O9U) для структуры цитохрома c552, определённой методом ЯМР-спектроскопии, хотя в автореферате он указан.

Кроме того, на мой взгляд, следовало обсудить роль пролина 291 (P256 у pmTcDH) в доступе ионов меди к активному центру trTcDH, поскольку

известно, что у гомологичного фермента этот аминокислотный остаток играет роль «ворот» в субстратный канал.

Работа заслуживает самой высокой оценки, все выносимые на защиту положения обоснованы. Исследования проведены на высоком уровне, с использованием широкого арсенала методов, экспериментальные результаты подробно изложены и разумно интерпретированы. Выводы чётко сформулированы. Полученные результаты существенно расширяют представление о механизмах сборки медь-содержащих ферментов и участвующих в этом процессе металлошаперонах.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были апробированы на конференциях, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science.

### **Заключение**

Диссертационная работа Соловьевой Анастасии Юрьевны «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановления правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор, Соловьёва А.Ю., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

### **Официальный оппонент:**

ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук (ИБ РАН), доктор биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология



Тищенко С. В.

142290, г. Пущино, ул. Институтская 4,

Телефон оппонента: +7(903)7541329

Электронная почта: sveta@vega.protres.ru

