

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

проспект академика Лаврентьева, 8, г. Новосибирск 630090

тел.: (383) 363-51-50

факс: (383) 363-51-53

e-mail: niboch@niboch.nsc.ru

www.niboch.nsc.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения
Российской академии наук

д.х.н. Коваль В. В.

21 апреля 2026 г.

21.04.2026 № 15248-01-02/321

На № _____

ОТЗЫВ

ведущей организации 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

Диссертационная работа Соловьевой А. Ю. посвящена исследованию медь-зависимой тиоцианатдегидрогеназы (ТсДН) из галоалкалофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus*. Медь входит в число незаменимых микроэлементов для большинства живых организмов, выполняя роль кофактора в ферментативных процессах, связанных с дыханием, переработкой активных форм кислорода, метаболизмом азота и др. В тоже время способность меди катализировать образование гидроксил-радикала и вытеснять другие металлы из активных центров металл-зависимых ферментов за счет более высокого сродства создает проблему ее цитотоксичности. Для поддержания концентрации ионов меди на сверхнизком уровне в клетках сформировались сложные системы гомеостаза, включающие белки-транспортеры, медь-запасающие белки и специализированные металлошапероны, которые обеспечивают направленную доставку ионов меди к белкам-мишеням. Несмотря на значительный прогресс в изучении биогенеза медьсодержащих ферментов, для многих из них, в том числе обладающих высоким биотехнологическим потенциалом, механизмы сборки медных центров остаются неизученными. По этой причине исследование биогенеза многоядерных медных центров, формирование которых требует высокой точности координационного окружения и высокой согласованности белок-

белковых взаимодействий, остается весьма актуальным. Объект работы Соловьевой А. Ю. — белок TcDH — содержит в активном центре три иона меди и катализирует окисление тиоцианата с выделением цианата и элементарной серы. Эти свойства делают TcDH потенциальным биотехнологическим инструментом, направленным на разложение токсичных соединений из отходов угольной, горнодобывающей и химической промышленности. Представленная работа значительно расширяет и дополняет новыми экспериментальными данными существующие представления о путях формирования необычного трехъядерного медного активного центра фермента TcDH как *in vitro*, так и с участием потенциального белка-металлошаперона trCopC *in vivo*. Понимание механизмов сборки активного центра TcDH и идентификация белков-партнеров, участвующих в доставке ионов меди, не только имеют фундаментальное значение для биохимии металлопротеинов, но и открывают перспективы для разработки биотехнологических методов детоксикации тиоцианат-содержащих отходов.

Диссертация логично построена и включает классические разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложение. Общий объем работы составляет 125 страниц (включая приложение), диссертация содержит 44 рисунка, 14 таблиц (6 в основном тексте и 8 в приложении) и библиографический список из 197 наименований, что свидетельствует о хорошем уровне проработки темы и корректном включении полученных результатов в широкий научный контекст. Структура диссертации соответствует поставленным задачам и обеспечивает последовательное раскрытие содержания исследования. Следует отметить комплексный подход, используемый соискательницей для решения поставленных задач. С применением классических биохимических и спектроскопических методов детально охарактеризован активный центр самого фермента TcDH (порядок сборки трехъядерного медного центра, активность, кинетика активации–инактивации), а с применением масс-спектрометрии, рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР установлены и охарактеризованы клеточные партнеры TcDH, которые могут служить источником ионов Cu(I) и акцепторами электронов в каталитической реакции.

Научная новизна результатов не вызывает сомнений. В частности, впервые детально охарактеризована кинетика активации и инактивации TcDH. Проведено сравнительное исследование скорости активации апо-TcDH ионами Cu(I) и Cu(II). Показано, что активация ионами Cu(I) происходит практически мгновенно, тогда как

активация ионами Cu(II) требует длительной инкубации. Этот результат имеет важное физиологическое значение, указывая на то, что сборка медного центра *in vivo*, вероятно, происходит с участием восстановленной формы меди. Впервые охарактеризована кинетика инактивации фермента при удалении ионов меди хелатирующими агентами, демонстрирующая крайне медленную диссоциацию металла, что свидетельствует о высокой стабильности и низкой доступности активного центра. В работе предпринята попытка идентификации физиологических акцепторов электронов, образующихся в ходе катализа TcDH. Впервые выделены и охарактеризованы два одногемовых цитохрома *c* из периплазмы *T. paradoxus*. С применением методов ЯМР-спектроскопии и белкового докинга построена модель комплекса TcDH с цитохромом *c552* и предложен путь переноса электрона от сайта связывания меди к гему акцептора. С применением метода конкурентного титрования и ЭПР-спектроскопии охарактеризована эффективность и порядок связывания Cu(II) и Cu(I) с TcDH. Установлено, что три медных центра обладают различной аффинностью к Cu(II), тогда как аффинность к Cu(I) для всех трех сайтов близка. Оценка селективности активного центра по отношению к ионам Zn(II) подтвердила специфичность связывания именно ионов меди.

Не менее значимы результаты, относящиеся к характеристике предполагаемого переносчика ионов меди trCopC. Впервые выполнена функциональная характеристика trCopC как металлошаперона. Соискательница не только предположила на роль белка-транспортера металлов trCopC, ген которого локализован в одном кластере с геном TcDH, но и провела комплексный биохимический и структурный анализ белка trCopC. Методом конкурентного титрования показана высокая аффинность trCopC к ионам Cu(II) и Cu(I). Получены кристаллические структуры trCopC в комплексе с ионом Cu(II). К наиболее важным научным результатам диссертации следует отнести доказательство того, что Cu-связанная форма trCopC взаимодействует с TcDH и может служить донором меди при формировании активного центра фермента. Показано, что образование комплекса между TcDH и Cu(II)-trCopC термодинамически возможно, охарактеризованы параметры этого взаимодействия и прослежена передача меди, приводящая к сборке активного центра TcDH *in vitro*.

В ходе работ соискательницей использован широкий арсенал современных физико-химических, биохимических и структурных методов анализа. Особого внимания заслуживает скрупулезный подход соискательницы к определению констант диссоциации комплексов белков с ионами меди. Подробно описаны и применены на практике два различных подхода к определению термодинамических параметров: метод

прямого и конкурентного титрования. Наглядно и убедительно продемонстрировано преимущество метода конкурентного титрования для изучения высокоаффинных взаимодействий. Использование набора хорошо охарактеризованных хелатирующих агентов (цинкон, ЭДТА, гидроксипропилен-ЭДТА, батокупроиндисульфоновая и бицинхоновая кислоты, феррозин) позволило получить надежные термодинамические параметры, согласующиеся с данными ЭПР и структурного анализа.

Результаты диссертационной работы вносят существенный вклад в фундаментальную биохимию металлоферментов и расширяют представления о молекулярных механизмах созревания сложных медьсодержащих ферментов. Данные о последовательности сборки трехъядерного медного центра TcDN важны для глубокого понимания процессов формирования сложных металлокластеров в периплазматическом пространстве бактерий. Доказательство того, что белок trCopC, традиционно рассматриваемый как компонент систем гомеостаза меди (импорт/детоксикация), способен выполнять функцию специализированного металлошаперона, меняет сложившиеся взгляды на функциональную пластичность белков семейства CopC. Соискательницей был получен концептуально важный результат — показана необходимость восстановления Cu(II) до Cu(I) для эффективного переноса металла с trCopC на TcDN, что указывает на сопряжение процессов сборки металлопротеинов с окислительно-восстановительным статусом периплазмы.

Практическая значимость рассматриваемого исследования связана с возможностью использования установленных закономерностей при разработке биотехнологических подходов, основанных на применении микроорганизмов, окисляющих тиоцианат, а также при направленном конструировании металлопротеинов с заданными свойствами. Разработанные в ходе выполнения диссертации подходы к определению высокоаффинного связывания ионов металлов с белками могут быть использованы в лабораториях, занимающихся металлопротеомикой и структурной биохимией. Полученные кристаллические структуры trCopC депонированы в базу данных Protein Data Bank (коды 8YTQ, 8YTR) и могут служить основой для структурно-функциональных исследований других представителей семейства CopC.

Замечания к работе немногочисленны и носят в основном технический и методический характер:

- 1) Для более точного анализа точек перегиба при титровании стоило бы использовать статистические методы (например, метод сегментированной

регрессии). В частности, из рис. 28а не очевидно, что с белком быстро связываются именно 1,6 ион-эквивалента; на глаз можно говорить и о переломе в точке 1 ион-эквивалента, и о более сложной зависимости с двумя точками излома.

- 2) На рис. 26б отсутствуют кривые аппроксимации, которые есть на всех остальных панелях рис. 26.
- 3) Учитывая то, что оптимальные значения рН для роста бактерий рода *Thioalkalivibrio* составляют около 10, и биохимические эксперименты также проводили при щелочных рН, в работе хотелось бы видеть более подробное обсуждение биологической значимости структур периплазматического белка CopC, полученных при рН 6,6 и 4,6.

Указанные замечания никак не умаляют общего положительного впечатления от работы. Выводы диссертации полностью соответствуют поставленным задачам и обоснованы экспериментальными данными. Положения, выносимые на защиту, аргументированы и подтверждены результатами, представленными в трех главах диссертации. Автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации. Результаты диссертационной работы Соловьевой А. Ю. представлены в 4 статьях, в том числе опубликованы в двух работах с первым авторством, что свидетельствует о личном вкладе соискательницы в проведенное исследование.

Результаты работы могут представлять интерес для Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Института белка РАН, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского при МГУ имени М.В. Ломоносова, Института цитологии РАН, Института молекулярной генетики РАН, Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирского государственного университета и других организаций, занимающихся исследованиями в области структурно-функциональной энзимологии.

Заключение

Диссертация Соловьевой Анастасии Юрьевны «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» является завершенным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком экспериментальном уровне. В работе решена важная научная задача – установлен

механизм сборки уникального трехъядерного медного центра белка TcDN, определены кинетические и термодинамические параметры связывания ионов меди, идентифицирован и функционально охарактеризован металлошаперон trCopC, обеспечивающий направленный перенос меди на апофермент. Таким образом, диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в актуальной редакции), а ее автор Соловьева Анастасия Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на межлабораторном научном семинаре Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (протокол № 98 от 20 апреля 2026 г.).

Отзыв составили:

Зав. лабораторией геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН
д. б. н. по специальности 03.00.04 – Биохимия
академик РАН

Жарков Д. О.

с.н.с. объединенного центра геномных, протеомных и
метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН
к. х. н. по специальности 03.01.04 – Биохимия

Канажевская Л. Ю.

630090 Новосибирск, пр-кт академика Лаврентьева, 8

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

www.1bio.ru

niboch@1bio.ru

Я, Жарков Дмитрий Олегович, 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 соискателя и дальнейшую обработку.


Жарков Д. О.

Я, Канажевская Любовь Юрьевна, 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 соискателя и дальнейшую обработку.


Канажевская Л. Ю.

Подписи Жаркова Д. О. и Канажевской Л. Ю. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.

20 апреля 2026 года


Логашенко Е. Б.

