

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ 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 14 мая 2026 г. № 7

о присуждении Соловьевой Анастасии Юрьевне,
гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» по специальности 1.5.4. Биохимии принята к защите 10 марта 2026 г. (протокол № 3) 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

Соловьева Анастасия Юрьевна 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 Анастасия Юрьевна поступила в очную аспирантуру ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В 2024 г. Соловьевой А.Ю. присвоена квалификация «Исследователь. Преподаватель-исследователь» (диплом об окончании аспирантуры 107705 0002694).

С 2020 г. по настоящее время Анастасия Юрьевна 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 «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования 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:

Попов Владимир Олегович, доктор химических наук, специальность 03.00.04. Биохимия, академик РАН, заведующий лабораторией инженерной энзимологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Официальные оппоненты:

Курочкин Илья Николаевич, доктор химических наук, специальности 02.00.15 - Кинетика и катализ, 03.00.23 - Биотехнология, профессор, заведующий лабораторией химической физики биоаналитических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук».

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».

Выбор официальных оппонентов обусловлен:

тем, что доктор химических наук Курочкин Илья Николаевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования ферментативного катализа и биотехнологии.

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

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

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Соловьевой А.Ю.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН) в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, академиком РАН, заведующим лабораторией геномной и белковой инженерией

ИХБФМ СО РАН Жарковым Д.О. и кандидатом химических наук, старшим научным сотрудником объединенного центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН Канажевской Л.Ю. и утвержденном директором ИХБФМ СО РАН доктором химических наук В.В. Ковалем, указала, что диссертационная работа Соловьевой А.Ю. 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 Соловьева А.Ю. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» является признанным отечественным научным центром и в своем составе имеет несколько подразделений, занимающихся исследованием структурной организации и механизмов функционирования макромолекул физико-химическими и структурными методами. Таким образом, сотрудники Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой и методологией диссертационной работы Соловьевой А.Ю.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Соловьевой А.Ю. 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. Britikov V. V., Bocharov E. V., Britikova E. V., Dergousova N. I., Kulikova O. G., **Solovieva A. Y.**, Shipkov N. S., Varfolomeeva L. A., Tikhonova T. V., Timofeev V. I., Shtykova E. V., Altukhov D. A., Usanov S. A., Arseniev A. S., Rakitina T. V., Popov V. O. Unusual Cytochrome c552 from Thioalkalivibrio paradoxus: Solution NMR Structure and Interaction with Thiocyanate Dehydrogenase // International Journal of Molecular Sciences - 2022. - Vol. 23, № 17. - P. 9969. **IF 4.9 (WoS).**
2. Varfolomeeva L. A., **Solovieva A. Y.**, Shipkov N. S., Sluchanko N. N., Boyko K. M., Khrenova M. G., Tikhonova T. V., Popov V. O. Relationship between the structure and physicochemical properties of cytochrome c546/556 from the bacterium Thioalkalivibrio paradoxus ARh1 // Biochemical and Biophysical Research Communications - 2025. - Vol. 778. - P. 152340. **IF 2.2 (WoS).**
3. **Solovieva A. Y.**, Kulikova O. G., Varfolomeeva L. A., Dergousova N. I., Boyko K. M., Khrenova M. G., Tikhonova T. V., Popov V. O. CopC as a potential metallochaperone delivering copper ions to the active site of a thiocyanate dehydrogenase // International Journal of Biological Macromolecules. - 2025. - Vol. 322. - P. 146801. **IF 8.5 (WoS).**
4. **Solovieva A. Y.**, Varfolomeeva L. A., Efimov N. N., Rotov A. V., Ugolkova E. A., Dergousova N. I., Tikhonova T. V., Popov V. O. Assembling a unique three-copper center of thiocyanate dehydrogenase *in vitro* // International Journal of Biological Macromolecules. - 2026. - Vol. 348. - P. 150768. **IF 8.5 (WoS).**

Результаты работы также были представлены в виде стендовых и устных докладов на 7 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 химических наук, профессора, заведующего лабораторией химической физики биоаналитических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук» **Курочкина Ильи Николаевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. 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.

2. 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 Тгр 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).

3. На Стр. 82 рассмотрено определение стехиометрии и аффинности ТсДН к ионам Cu(I) при конкурентном титровании с использованием лигандов В_с и В_с_а, которые образуют окрашенные комплексы $[Cu(I)-(Вс_а/Вс_с)_2]^{3-}$ с известным сродством. Необходимо описать способ экспериментального определения (вычисления) точек перегиба на Рис. 30 для более четкого понимания логики определения стехиометрии.

4. 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?

5. Экспериментальные спектры *a*, *b* 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?

6. 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*, *b* и *z*, *d* 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*, *b* и *z*, *d* в 2-х компонентном приближении, а *v* и *e* в 3-х компонентном.

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

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 пожелание:

Замечания:

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 объем 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 цитохром с552, определенной методом ЯМР-спектроскопии, хотя в автореферате он указан.

Пожелание:

1. Следовало обсудить роль пролина 291 (P256 у рmTcdH) в доступе ионов меди к активному центру trTcdH, поскольку известно, что у гомологичного фермента этот аминокислотный остаток играет роль «ворот» в субстраты канал.

Отзыв ведущей организации **Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

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. 266 отсутствуют кривые аппроксимации, которые есть на всех остальных панелях рис. 26.

3. Учитывая то, что оптимальные значения pH для роста бактерий рода *Thioalkalivibrio* составляют около 10, и биохимические эксперименты также проводили при щелочных pH, в работе хотелось бы видеть более подробное обсуждение биологической значимости структур периплазматического белка CopC, полученных при pH 6,6 и 4.6.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Борщевского Валентина Ивановича, доктор физико-математических наук, руководитель лаборатории структуры и динамики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ)

Отзыв содержит следующие замечания по оформлению автореферата:

Автор использует нестандартную форму записи констант в виде отрицательных значений логарифма константы диссоциации. В биохимической литературе традиционно принято указывать либо саму размерную величину, либо отрицательный логарифм этой величины, который имеет положительное значение. В связи с этим хотелось бы уточнить у автора, чем обусловлен выбор такого способа записи.

Кроме того, в работе встречается небольшое число опечаток, орфографических и синтаксических ошибок. Например:

- Предложение на странице 3: «В связи с этим, понимание механизмов направленного транспорта и встраивания ионов меди в ферменты, что в клетке осуществляет специальный класс белков – металлошапероны, является актуальной задачей не только для фундаментальной науки, но и для медицины» требует переформулировки. Кроме того, слово «металлошапероны» употреблено в грамматически несогласованной форме.

- В предложении на странице 4: «ТсДН катализирует окисление тиоцианата – стабильного соединения, образующегося в различных промышленных процессах, как производство гербицидов и инсектицидов, газификация и коксование угля, добыча золота» пропущено слово «таких».

- Выражения на странице 20: «названный мотивом “гистидиновая скрепка”» «в наиболее узко~~м~~» содержат ошибки в написании слов.

Клячко Натальи Львовны, доктора химических наук, профессора, заведующего кафедрой химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Отзыв Клячко Натальи Львовны замечаний не содержит.

Страховской Марины Глебовны, доктора биологических наук, профессора кафедры синтетической биологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова.

Отзыв Страховской Марины Глебовны 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.

С вопросами выступали:

проф., д.х.н. Бовин Н.В., проф., д.б.н. Шумянцева В.В., д.б.н. Агафонов М.О., д.б.н. Терёшина В.М., проф., д.б.н. Юрина Н.П..

В дискуссии приняли участие:

д. фарм. наук Макаров В.А., проф., д.б.н. Левицкий Д.И..

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

1. Два одногемовых цитохрома с552 и с546/556 из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* способны выполнять роль физиологических акцепторов электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH.
2. Встраивание ионов Cu(I) в активный центр TcDH *in vitro* происходит быстрее (<1 мин), чем ионов Cu(II) (~ 24 часа). Удаление ионов меди из активного центра TcDH с помощью высокоаффинных лигандов ионов меди является кинетически медленным процессом (~7-14 дней) в зависимости от лиганда и его концентрации.
3. TcDH обладает высокой аффинностью к ионам Cu(II) с $\log K_D$ в интервале - (11,7 – 16,4). Аффинность сайтов медного центра к ионам Cu(II) увеличивается в ряду Cu3 << Cu1 ≈ Cu2. TcDH обладает высокой аффинностью к ионам Cu(I) со средним значением $\log K_D = -13,0 \pm 0,3$ для трех сайтов медного центра.
4. Сборка медного центра TcDH *in vitro* происходит в следующей последовательности: сначала одновременно заполняются сайты Cu2 и Cu1, а впоследствии – сайт Cu3.
5. Медь-связывающий белок *tpCopC* из бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* демонстрирует высокую аффинность как к ионам Cu(II) ($\log K_D = -16,3 \pm 0,6$), так и к ионам Cu(I) ($\log K_D = -11,1 \pm 0,2$). Связанный ион Cu(II) координируется амино- и боковой группами остатка H31, боковыми группами остатков D140, H142 и молекулой воды в аксиальном положении в квадратно-пирамидальной геометрии. Ион Cu(I) связывается в том же сайте боковыми группами H31, D140 и H142 в тригональной геометрии.
6. TcDH и Cu(II)-*tpCopC* образуют комплекс с $\log K_D = -5,7 \pm 0,3$. Cu(II)-*tpCopC* способен передавать и встраивать три иона меди в активный центр TcDH через промежуточную стадию восстановления до Cu(I)-*tpCopC*, т.е. выполнять роль металлошаперона TcDH *in vitro*.

Научная новизна работы:

- Впервые были выделены и охарактеризованы два одногемовых цитохрома с552 и с546/556 из *Tv. paradoxus*, которые могут являться физиологическими акцепторами электронов в реакции окисления тиоцианата, катализируемой TcDH;

- Исследованы процессы встраивания ионов Cu(II)/Cu(I) в активный центр TcDH с термодинамической и кинетической точек зрения;
- Оценены скорости активации/инактивации фермента TcDH при добавлении/удалении ионов меди активного центра;
- Определены стехиометрия и аффинность связывания ионов Cu(II)/Cu(I) в трехъядерном медном центре TcDH (сайты Cu1, Cu2 и Cu3).
- Установлена последовательность заполнения трех сайтов TcDH при добавлении ионов меди *in vitro* методом ЭПР-спектроскопии;
- Проведен структурно-биохимический анализ медь-связывающего белка *tpCopC*, ген которого находится в ближайшем геномном окружении гена TcDH;
- Впервые подтверждена способность *tpCopC* играть роль металлошаперона при встраивании ионов меди в активный центр TcDH *in vitro*.

Практическая значимость работы:

Проведенное исследование предоставляет фундаментальные знания о механизме сборки уникального трехъядерного медного центра TcDH, который отличается по своей архитектуре от активных центров других известных медь-содержащих ферментов. Подробное исследование процесса встраивания *in vitro* как свободных ионов меди, так и при участии металлошаперона *tpCopC*, создает необходимую основу для дальнейшего изучения процессов созревания медного центра TcDH *in vivo*. Результаты, представленные в данной работе, вносят значительный вклад в понимание механизмов биогенеза сложных медь-содержащих ферментов.

Особую практическую значимость работа приобретает в контексте биотехнологического применения. TcDH катализирует окисление тиоцианата – стабильного соединения, образующегося в различных промышленных процессах, как производство гербицидов и инсектицидов, газификация и коксование угля, добыча золота. Исследование механизмов формирования функционально активного фермента является важнейшим этапом для разработки эффективных биологических методов детоксикации тиоцианат-содержащих отходов.

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.

