



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32

www.fbras.ru, info@fbras.ru

23.10.2025

На №

№ 85-01-19/132

от

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального

государственного учреждения

«Федеральный исследовательский

центр «Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН

Д.Б.н. Федоров А.Н.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Соловьевой Анастасии Юрьевны «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

В июне 2019 года Соловьева Анастасия Юрьевна пришла в лабораторию инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» для выполнения научно-квалификационной работы магистра. В 2020 году Анастасия Юрьевна окончила магистратуру кафедры биохимии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01 «Биология». 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. 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). Все кандидатские экзамены сданы.

Научный руководитель – доктор химических наук, профессор, академик РАН Попов Владимир Олегович, заведующий лабораторией инженерной энзимологии, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

По результатам рассмотрения диссертации «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Данная работа посвящена изучению встраивания ионов меди в уникальный трехъядерный медный центр тиоцианатдегидрогеназы, а также поиску физиологического акцептора электронов реакции фермента. Результаты исследований позволили идентифицировать два потенциальных акцепторов электронов – цитохромы c552 и c546/556, а также сформулировать механизм формирования медного центра *in vitro*.

Медь – один из наиболее распространенных и важных переходных металлов для живых организмов, где он выступает в роли кофактора ферментов, связанных с такими жизненно важными функциями как дыхание, защита от окислительного стресса, метаболизм железа, биосинтез гормонов и нейротрансмиттеров и т.д. Однако высокая токсичность свободных ионов меди требует наличия в клетке специализированных систем, обеспечивающих безопасный транспорт, точное встраивание в белки-мишени и выведение избытка ионов меди. Нарушение регуляции гомеостаза ионов меди приводит к многочисленным сбоям в работе живых систем, вплоть до летального исхода. 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.

Особый научный и практический интерес представляют медь-содержащие ферменты с выраженным биотехнологическим потенциалом. Такие ферменты, как медь-зависимые оксидазы, уже нашли применение в биоремедиации, биоэлектронике и промышленном катализе. Однако для многих перспективных ферментов, включая бактериальную тиоцианатдегидрогеназу (TcDH), молекулярные механизмы активации и участвующие в этом процессе металлошапероны остаются неисследованными.

Данная работа направлена на восполнение этого пробела. В рамках комплексного подхода, включающего биоинформатический анализ, генно-инженерные, биохимические и структурные методы, было запланировано выявить белки-партнёры TcDH и детально изучить процесс сборки трехъядерного медного центра *in vitro*. Решение этой задачи имеет фундаментальное значение для понимания функционирования медного центра TcDH и гомеостаза меди и открывает перспективы для дальнейшего биотехнологического применения.

Целью данной работы является исследование деталей функционирования и механизма сборки трехъядерного медного центра тиоцианатдегидрогеназы (TcDH) *in vitro*.

Научная новизна

Впервые были выделены и охарактеризованы два одногемовых цитохрома c552 и c546/556 из *Thioalkalivibrio 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). Методом ЭПР-спектроскопии была установлена последовательность заполнения трех сайтов TcDH при добавлении ионов меди *in vitro*. 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*.

Теоретическая и практическая значимость

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.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор принимал непосредственное участие в постановке научных задач, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их представлении. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя является определяющей.

Степень достоверности

Достоверность представленных в диссертации Соловьевой А.Ю. данных и сделанных выводов обеспечена использованием современных методов исследования и сертифицированного оборудования. Эксперименты проводили в нескольких повторностях с постановкой контроля. Полученные данные были проанализированы с помощью современных программ и методов статистической обработки.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

Апробация работы

По материалам научной работы были опубликованы 4 статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на 7 всероссийских и международных конференциях (XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в ИБХ РАН в 2021 году, III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов в г. Сочи в 2021 году, XXXV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" в ИБХ РАН в 2023 году, 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» в г. Суздаль в 2023 году; V Международная школа по структурной биологии в ИБХ РАН в 2024 году; 14 Международная мультikonференция «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» в г. Новосибирск в 2024 году; Биомембраны 24 в МФТИ в 2024 году).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, и 7 тезисов, опубликованных в материалах международных и всероссийских конференций, которые приведены ниже.

Список публикаций

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science :

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).**

Тезисы докладов:

1. **Соловьева А.Ю.**, Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. Изучение механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методами стационарной кинетики // Сборник тезисов XXXIII Зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»: 8-11 февраля 2021 / под ред. д.х.н. Т.В. Овчинниковой, к.б.н. Е.А. Стукачевой, сост.: к.б.н. Стукачева Е.А. – С. 38
2. **Соловьева А.Ю.**, Хренова М.Г., Тихонова Т.В., Попов В.О. Исследование механизма действия тиоцианатдегидрогеназы методом ингибиторного анализа // Сборник тезисов «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «белки и пептиды», VII съезд физиологов СНГ»: 3-8 октября 2021 / под ред. А.Г. Габилова и М.А. Островского. – С.131.
3. **Соловьева А.Ю.**, Варфоломеева Л.А., Дергусова Н.И., Тихонова Т.В., Попов В.О. Необычные спектральные свойства одногемового цитохрома с из галоалкалофильных бактерий рода Thioalkalivibrio // Сборник тезисов XXXV Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии": 7-10 февраля 2023 / под редакцией д.х.н. Т.В. Овчинниковой, составители: Овчинникова Т. В., Шереметьева Э. В. - С.35.
4. **Соловьева А.Ю.**, Дергусова Н.И., Бочаров Э.В., Варфоломеева Л.А., Устинникова Т.Б., Тихонова Т.В., Попов В.О. Структурные исследования одногемовых

цитохромов с – потенциальных акцепторов электронов в реакции, катализируемой тиоцианатдегидрогеназой // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023 – С. 216.

5. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Dergousova N.I., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural features of cytochrome c that determine the splitting of Q-lines // V International school of structural biology « Structural biology: main problems and approaches to their solution» (IBCh RAS, Moscow, June 5-7, 2024) – 2024. – P. 80.

6. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Kulikova O. G., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural study of apo- and holo-CopC from *Thiokalivibrio paradoxus*// 14th International Multiconference «Bioinformatics of Genome regulation and Structure / Systems Biology» (BGRS/SB-2024) (Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, August 5-10, 2024) – 2024. – P. 544-545.

7. **Solovieva A.Y.**, Varfolomeeva L.A., Kulikova O. G., Tikhonova T.V., Popov V.O. Structural features of the copper-binding protein CopC from a haloalkaliphilic bacterium // International conference «Biomembranes'24» (MIPT, October 7-11, 2024) – 2024. – P. 239.

Рекомендуемые оппоненты:

Курочкин Илья Николаевич, доктор химических наук, 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, ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук».

Рекомендуемая ведущая организация

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

Диссертация «Механизм сборки трехъядерного медного центра и детали функционирования тиоцианатдегидрогеназы» Соловьевой Анастасии Юрьевны на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий инженерной энзимологии, молекулярных основ биотрансформаций, структурной

биохимии белка, белок-белковых взаимодействий и группы молекулярного моделирования Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», протокол № 5 от «16» октября 2025 года путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 34 человека. Результаты голосования: «за» - 34 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет.

Председатель совместного семинара лабораторий

Заведующая лабораторией молекулярных основ биотрансформаций,
кандидат технических наук

Т.В. Федорова

Секретарь

Младший научный сотрудник лаборатории
инженерной энзимологии

Л.А. Варфоломеева

23.8.25

